

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SCHMALLEMBERG VİRÜSÜNÜN VERO HÜCRE HATTI ÜZERİNE
APOPTOTİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Emel AKSOY
VETERİNER HEKİM**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR**

2020 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SCHMALLENBERG VİRÜSÜNÜN VERO HÜCRE HATTI ÜZERİNE
APOPTOTİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Emel AKSOY
VETERİNER HEKİM**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR**

**Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
(Proje No: 2015/52) tarafından desteklenmiştir.**

2020 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/01/2020

İmza

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ
Kırıkkale Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Şükrü TONBAK
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Harun ALBAYRAK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	xiv
Çizelgeler	xvi
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ	3
1.1. Schmallenberg Virüs	3
1.1.1. Etiyoloji	3
1.1.2. Epidemiyoloji	14
1.1.3. Ekonomik Etki	19
1.1.4. Patogenez ve İmmünite	20
1.1.5. Klinik ve Patolojik Bulgular	28
1.1.6. Tanı	36
1.1.6.1. Virüs İzolasyonu ve Çoğaltılması	36
1.1.6.2. Moleküler Tanı	38
1.1.6.3. Serolojik Tanı	40
1.1.7. Koruma ve Kontrol	44
1.2. Apoptozis	48

1.2.1. Fizyolojik Apoptozis	51
1.2.2. Patolojik Apoptozis	52
1.2.3. Apoptoziste Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler	53
1.2.4. Apoptoziste Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler	54
1.2.4.1. Kaspazlar	55
1.2.5. Apoptozis Yolakları	57
1.2.5.1. Dış Yolak	57
1.2.5.2. İç Yolak	58
1.2.5.2.1. Mitokondrial Dış Membran Permeabilizasyon (MOMP) Aktivasyonu	59
1.2.5.2.1.1. Bcl-2 Ailesi Proteinleri	59
1.2.5.2.2. Mitokondrial Dış Membran Permeabilizasyonu (MOMP) Sonrası Biyokimyasal Değişimler	62
1.2.5.3. Apoptozisin Genetik Kontrolü	63
1.2.5.4. Apoptozisin Belirlenmesi	64
1.2.5.4.1. Mitokondrial Değişiklikler	65
1.2.5.4.2. Sitoplazmik Değişiklikler	65
1.2.5.4.3. Hücre Membran Değişiklikleri	66
1.2.5.4.4. DNA Değişiklikleri	66
1.3. Virüsler ve Apoptozis	68
1.3.1. Apoptozisi Engelleyen Virüsler	68
1.3.2. Apoptozisi Tetikleyen Virüsler	71
2. GEREÇ VE YÖNTEM	76
2.1. Hücre Kültürü	76
2.2. Schmallenberg Virüsünün İdentifikasyonu	76
2.2.1. RNA İzolasyonu	77
2.2.2. Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu (cDNA Sentezi)	77
2.2.3. Konvansiyonel PZR ve Jel Elektroferez	78
2.3. Virüsün Üretilmesi	79

2.4. Plak Titrasyon Deneyi	80
2.5. Vero Hücre Hattına İnokulasyonlar	82
2.6. Hücrelerde Apoptozisin Belirlenmesi	82
2.6.1. DNA Fragmentasyon Deneyi	82
2.6.2. Annexin V/PI Boyama	83
2.6.3. Kaspaz Aktivasyon Deneyi	84
2.6.4. Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Genlerin Ekspresyon Analizi	85
2.6.4.1. RNA İzolasyonu	85
2.6.4.2. Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu (cDNA Sentezi)	86
2.6.4.3. Real-time PZR	87
2.7. İstatistiksel Analiz	88
2.8. Grafiklerin ve Şekillerin Hazırlanması	89
3. BULGULAR	91
3.1. Schmallerberg Virüsün Üretilmesi ve Titrasyonu	91
3.2. Schmallerberg Virüsün Vero Hücrelerine 0,1 ve 0,01 MOI Enfeksiyonları	94
3.3. DNA Fragmentasyonu	96
3.4. Annexin V/PI Boyama	98
3.5. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 Aktivasyonu	101
3.6. Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Genlerin Ekspresyonu	105
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	112
KAYNAKLAR	128
ÖZGEÇMİŞ	159

ÖNSÖZ

Schmallenberg virüsü, 2011 yılında Almanya’da keşfedilmiş olan ve evcil ruminantlarda abortlara, ölü doğumlara ve konjenital malformasyonlara neden olan bir etkindir. Keşfinden bu yana Schmallenberg virüsü ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, virüsün moleküler patogenezi ile ilgili literatürde çok az bilgi mevcuttur. Virüslerin moleküler patogenezlerindeki önemli etkilerinden birisi de hücre ölümüdür. Virüslerin, enfekte ettikleri hücrelerdeki yaşam/ölüm döngüsü bakımından en fazla müdahil oldukları ölüm biçimi ise apoptozistir.

Bu tez kapsamında Schmallenberg virüsünün Vero hücresindeki apoptotik etkisi araştırılmıştır. Apoptozisin belirlenmesinde, DNA fragmentasyonu, kaspaz aktivasyonu, Annexin V/PI boyama, anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyonları incelenmiş ve virüsün farklı dozları ile farklı enfeksiyon saatleri karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, Schmallenberg virüsünün üretilmesinde, titrasyonunda ve aşı hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan Vero hücre hattındaki moleküler patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlanmıştır.

Bilgisi, bilimsel vizyonu, deneyimi ile doktora eğitimim boyunca yetişmemdeki büyük katkısı ve emeği geçen, bana sabır ve özveriyle destek olan tez danışmanım, değerli hocam Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR’a;

Doktora eğitimim sırasında ilgilerini esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat YILDIRIM’a; Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ’a;

Tezimin istatistiksel analizlerinde yardımını esirgemeyen İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Ekonometri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Latif ÖZTÜRK’e teşekkür ederim.

Her zaman ve koşulda bana destek veren annem Nebahat BIYIKLI’ya, babam Ahmet BIYIKLI’ya;

Koşulsuz sevgisi ve sabrı ile daima yanımda olan, hayat arkadaşım, kıymetli eşim Canbek AKSOY’a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 2015/52 numaralı proje ile destekleyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
£	İngiliz Sterlini
°C	Derece Celcius
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
€	Euro (Avro)
293FT	SV40 büyük T antijeni ile transforme edilmiş insan embriyonik böbrek hücresi
A549	Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücre hattı
aa	Aminoasit
AGP	1-asit glikoprotein
AIF	Apoptosis inducing factor (Apoptozis indükleyici faktör)
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)
Apo-1	Apoptosis antigen 1 (Apoptozis antijen 1)
Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death (Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti)
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer (Bcl-2 homolog antagonist katili)
Bax	Bcl-2-associated X protein (Bcl-2 ilişkili X proteini)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B hücre lenfoma 2)

Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large (B hücre lenfoması ekstra büyük proteini)
BH	Bcl-2 homoloji
BHK-21	Baby Hamster Kidney-21 (Bebek hamster böbrek hücre hattı)
BHV-1	Sığır herpesvirüs tip 1
Bid	BH3 interacting-domain death agonist (BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti)
Bik	Bcl-2-interacting killer (Bcl-2 etkileşimli katil)
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bcl-2 etkileşimli hücre ölüm aracısı)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı)
bp	Base Pair (Baz Çifti)
BSR-T7/5	T7 RNA polimeraz eksprese eden BHK-21 hücre hattı
BST-2 (Tetherin)	Bone marrow stromal antigen 2
BVDV	Bovine viral diarrhea virus (Sığır viral diyare virüsü)
CAD	Caspase-activated DNase (Kaspaz aktive DNAaz)
CARD	Caspase recruitment domain (Kaspaz güçlendirme alanı)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA (komplementer DNA)
cm ²	Santimetre Kare
<i>c-MYC</i>	Cellular Myelocytomatosis (Hücreyel myelositomatozis onkogeni)
CO ₂	Karbondioksit
cp	Sitopatik
CPT-Tert	Simian virüs 40 T antijeni ve insan telomeraz tersine transkriptazı (human telomerase reverse transcriptase; hTERT) ile immortalize edilmiş

	koyun koroid pleksus hücre hattı
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals (Aşılı hayvanlar ile enfekte hayvanları ayırma)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
DR	Death Receptor (Ölüm reseptörü)
DTT	Dithiothreitol
EAV	Equine arteritis virus (At arteritis virüsü)
EBV	Epstein-Barr virüsü
EHV-1	Equine herpesvirus type 1 (At herpesvirüs tip 1)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzime bağlı immünosorbent deneyi)
Eomes	Eomesodermin
FADD	Fas-associated death domain (Fas-ilişkili ölüm alanı)
Fas	FS-7-associated surface antigen (FS-7-ilişkili yüzey antijeni)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötal Sığır Serumu)
FISH	Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead box protein 3
g	gram
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz)
Gata3	GATA binding protein 3
Gc	Glikoprotein C
Gn	Glikoprotein N
GNAL	Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha
HAE/CTVM9	<i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i> hücre hattı
HAZV	Hazara virüs
hBST2	İnsan BST-2

HeLa	Henrietta Lacks'a ait serviks kanseri hücre hattı
Hep2	HeLa kökenli hücre hattı
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan immün yetmezlik virüsü)
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase (hidroksimetilbilan sentaz)
HmLu-1	Golden hamster lung (Golden hamster akciğer hücre hattı)
Hp	Haptoglobin
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz)
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
HTNV	Hantaan virüs
HUEL	Çözünen taşıyıcı aile üyesi 30
HuH7	Human hepatocellular carcinoma cells (İnsan karaciğer karsinoma hücre hattı)
HUVEC	Primary human umbilical vein endothelial cells (İnsan göbek kordon venası primer endotelyal hücre hattı)
IAP	Inhibitor of apoptosis protein (Apoptozis inhibe edici protein)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi)
IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (İnterferonla indüklenen tetratrikopeptit tekrarlarına sahip protein 2)
IFN	İnterferon
IFNAR ^{-/-}	Type I interferon receptor knock-out mice (Tip I interferon reseptörü knock-out fare)
Ig	İmmunglobulin
IL	İnterleukin (İnterlökin)

IRF	Interferon Regulatory Factor (İnterferon Düzenleyici Faktör)
ISG	Interferon-stimulated gene (İnterferon-stümüle gen)
ISH	<i>In situ</i> hibridizasyon
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
kb	Kilo Baz
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
KKKA	Kırım-Kongo kanamalı ateşi
KSHV	Kaposi sarkoma herpesvirüs
L segmenti	Large segment
LAMP	Loop Mediated Isothermal Amplification (Loop aracılı izotermal amplifikasyon)
LARD	Lymphocyte-associated receptor of death (Lenfosit ilişkili ölüm reseptörü)
log	Logaritma
M	Molar
M segmenti	Medium segment
MAC	Mitochondrial apoptosis-induced channel (Mitokondriyal apoptozis-indükleyici kanal)
MDA	Malondialdehid
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney (Madin-Darby sığır böbrek hücre hattı)
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (Madin-Darby köpek böbrek hücre hattı)
MDFI	MyoD family inhibitor (MyoD ailesi inhibitörü)
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
miRNA	mikroRNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MOI	Multiplicity of Infection

MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization (Mitokondrial dış membran permeabilizasyonu)
mRNA	Messenger RNA
MVA	Modifiye Vaccinia virüs Ankara
MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 (İnterferonla indüklenen GTP-bağlayıcı Mx1 proteini)
N protein	Nükleokapsid proteini
nep	Sitopatik olmayan
ng	Nanogram
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü)
nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
Noxa	Damage (hasar) kelimesinin Latincesi (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)
NS	Non-structural (yapısal olmayan)
NSm	M segmentinden kodlanan yapısal olmayan protein
NSs	S segmentinden kodlanan yapısal olmayan protein
nt	nükleotit
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (2'-5'-oligoadenilat sentetaz 1)
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2 (2'-5'-oligoadenilat sentetaz 2)
OD	Optical Density (Optik Dansite)
PARP	Poly ADP (adenosine diphosphate) ribose polymerase (Poli ADP riboz polimeraz)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik kan mononükleer hücre)
PBS	Phosphate Buffer Saline
pfu	Plaque Forming Unit (Plak oluşturan ünite)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PI	Propidium Iodide (Propidyum iyodür)

PK	Pozitif Kontrol
pmol	Pikomol
PS	Fosfatidilserin
PTV	Punta Toro virüs
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>Rb</i>	Retinoblastoma geni
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase (RNA-bağımlı RNA polimeraz)
RIP	Receptor-interacting protein (reseptör etkileşimli protein)
RK13	Rabbit kidney cell (Tavşan böbrek hücre hattı)
RNA	Ribonükleik Asit
RNAaz	Ribonükleaz
RoR γ t	Retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t
RPS3A	40S ribosomal protein S3a
RSAD2 (Viperin)	radical SAM domain-containing 2
RT-PZR	Tersine Transkripsiyon (Reverse Transcription) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RVFV	Rift Valley fever virus (Rift Vadisi humması virüsü)
S segmenti	Small segment
SAA	Serum amiloid A
SBV	Schmallenberg virüs
SK-6	Swine Kidney-6 cell (domuz böbrek hücre hattı)
SMAC/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI
spp	Species Plural (Alt Tipler)
SW13	İnsan adrenal korteks adenokarsinoma hücre hattı
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
T-bet	T-box expressed in T cells
TBP	TATA-box bağlayıcı protein

TCID ₅₀	Doku Kùltürü Enfeksiyöz Doz 50
Th	T helper (Yardımcı T hücre)
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptörü
TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25
TOK	Total Oksidan Kapasite
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand)
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand reseptörü)
Treg	Regülatör T hücresi
TRICK	TRAIL receptor inducer of cell killing
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick End Labelling
UV	Ultraviyole
V	Volt
VDAC	Voltage-dependent anion channel (Voltaj-bağımlı anyon kanalları)
Vero	Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı
vFLIP	viral FLICE-inhibitory proteins
Vpr	Viral protein regulatory

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Orthobunyavirüslerin genom yapısı ve segmentlerinden kodlanan proteinler	4
Şekil 1.2. SBV virion yapısı	8
Şekil 1.3. Schmallerberg virüsü intrauterin enfeksiyonu ile ilişkili konjenital malformasyonlar	30
Şekil 1.4. Temel hücre ölümü tipleri	49
Şekil 3.1. SBV'nin Vero hücre hattına inokulasyonundan 48 saat sonra oluşturduğu sitopatik etkinin mikroskopik görünümü	91
Şekil 3.2. SBV konvansiyonel RT-PZR sonucu	92
Şekil 3.3. SBV'nin Vero hücresi kullanılarak 12 kuyucuklu hücre kültür pleytinde yapılan plak titrasyon deney sonucu	93
Şekil 3.4. SBV'nin Vero hücresi kullanılarak 24 kuyucuklu hücre kültür pleytinde yapılan plak titrasyon deney sonucu	93
Şekil 3.5. SBV 0,1 MOI ile enfekte Vero hücrelerinin farklı saatlerdeki mikroskopik görünümleri	95
Şekil 3.6. SBV 0,01 MOI ile enfekte Vero hücrelerinin farklı saatlerdeki mikroskopik görünümleri	95
Şekil 3.7. SBV 0,1 MOI ile enfekte edilen hücrelerin agaroz jel elektroforez ile DNA fragmentasyon analizi	97
Şekil 3.8. SBV 0,01 MOI ile enfekte edilen hücrelerin agaroz jel elektroforez ile DNA fragmentasyon analizi	98
Şekil 3.9. Akan hücre ölçe analizinde hücrelerin Annexin V ve PI boylarla boyanma şekline göre değerlendirilmesi	99
Şekil 3.10. SBV 0,1 MOI ile enfekte edilen Vero hücrelerinin akan hücre ölçe analiz sonuçları	100
Şekil 3.11. SBV 0,01 MOI ile enfekte edilen Vero hücrelerinin akan hücre ölçe analiz sonuçları	101

Şekil 3.12. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre kaspaz-3 aktivasyonu	103
Şekil 3.13. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre kaspaz-8 aktivasyonu	104
Şekil 3.14. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre kaspaz-9 aktivasyonu	105
Şekil 3.15. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre <i>Bak</i> geni ekspresyonundaki değişimler	107
Şekil 3.16. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre <i>Bax</i> geni ekspresyonundaki değişimler	108
Şekil 3.17. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre <i>Bcl-2</i> geni ekspresyonundaki değişimler	109
Şekil 3.18. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre <i>Bcl-XL</i> geni ekspresyonundaki değişimler	110
Şekil 3.19. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre <i>Puma</i> geni ekspresyonundaki değişimler	111

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1. SBV'nin S, M ve L segmentlerinden kodlanan proteinlerin açık okuma çerçeveleri (ORF) ve uzunlukları	5
Çizelge 1.2. Erişkin koyun, keçi ve sığırlarda SBV ilişkili klinik bulgular	28
Çizelge 1.3. SBV'nin koyun, keçi ve sığır fötüslerinde neden olduğu makroskopik ve mikroskopik patolojik bulgular	32
Çizelge 1.4. Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi (NCCD) tarafından tanımlanan hücre ölümü tipleri ve genel özellikleri	50
Çizelge 1.5. Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik bazı proteinler	60
Çizelge 2.1. SBV S segmentine özgül primer sekansları	78
Çizelge 2.2. Tez kapsamında incelenen genlere özgül primer sekansları	87

ÖZET

Schmallenberg virüsü (SBV) 2011 yılında Almanya’da keşfedilen, ruminantlarda ateş, ishal, süt veriminde azalma, abort ve konjenital malformasyonlarla seyreden bir hastalık tablosuna yol açan bir virüsdür. Etken *Peribunyaviridae* ailesinin *Orthobunyavirus* cinsinde yer alan, negatif polariteli segmentli bir RNA virüsüdür. İlk keşfinden bu yana SBV ile ilgili pek çok çalışma yapılmasına karşın SBV’nin *in vitro* apoptotik etkisi detaylıca araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında, SBV’nin ile ilgili pek çok çalışmada yaygın olarak kullanılan Vero hücre hattında, SBV’nin apoptozise neden olup olmadığı farklı yöntemler ile araştırıldı.

Bu tez çalışmasında, SBV Vero hücrelerinde üretildi, plak titrasyon ile viral titre belirlendi ve Vero hücreleri 0,1 ve 0,01 MOI SBV ile enfekte edildi. SBV enfeksiyonlarından 0, 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48 ve 72 saat sonra hücreler toplandı. Toplanan hücrelerde apoptozisin belirlenmesi için DNA fragmentasyon deneyi, akan hücre ölçerde (flow sitometri) Annexin V/PI boyama, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 aktivasyonları ve real-time RT-PZR ile bazı pro-apoptotik (Bak, Bax, Puma) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xl) genlerin ekspresyonunda meydana gelen değişimler incelendi. Tez çalışması ile ilk defa, SBV’nin Vero hücre hattında apoptozisi hem iç yolak hem de dış yolak aracılığıyla indüklediği, apoptozis indüklenmesinde zamanın ve virüs titresinin etkili olduğu belirlendi. Gen ekspresyon analizlerine göre SBV, Puma geni aracılığıyla hücrelerde apoptozisi indükleyebileceği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile Vero hücrelerinde SBV enfeksiyonunun apoptozise neden olduğu, bu apoptozisin hem iç yolak hem de dış yolak aracılığıyla gerçekleştiği ve SBV kaynaklı apoptozisin moleküler patogenezinde Puma geninin etkili olduğu belirlenmiştir. Daha ayrıntılı moleküler çalışmalar ile SBV’nin neden olduğu apoptozisin moleküler patogenezi aydınlatılmaya ihtiyaç duymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Schmallenberg virüs, apoptosis, Vero hücre hattı, DNA fragmentasyon, Annexin V/PI, akan hücre ölçer, kaspaz, gen ekspresyonu, Puma

SUMMARY

Schmallenberg virus (SBV), discovered in 2011 in Germany, is associated with clinical manifestations as fever, diarrhea, reduced milk yield, abortions and congenital malformations in ruminants. The agent is classified in *Orthobunyavirus* genus of *Peribunyaviridae* family and has negative-sense three-segmented RNA. Unless many studies performed with SBV to date, there is no detailed research about *in vitro* apoptotic effect of SBV. In this PhD dissertation, whether SBV induces apoptosis in Vero cell line, widely used in SBV studies, with using different methods.

SBV was propagated in Vero cells, viral titer was determined by plaque titration assay, and Vero cells were infected with 0.1 and 0.01 MOI of SBV. Cells infected with SBV were collected in 0, 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48 and 72 hours. For investigation of apoptosis, DNA fragmentation assay, flow cytometry analysis with Annexin V/PI staining, caspase-3, caspase-8, caspase-9 activation, and expression analysis of pro-apoptotic (Bak, Bax, Puma) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xl) genes with real-time RT-PCR were performed. According to results of the thesis, SBV induces apoptosis in Vero cells via both intrinsic and extrinsic pathways and this induction is depending to infection time and viral dose. Gene expression analyses reveal that SBV induce apoptosis mainly by Puma gene.

In conclusion, for the first time with this thesis, SBV infection leads to apoptosis in Vero cells, this apoptosis induction is maintained by intrinsic and extrinsic pathways, and Puma gene is effective in molecular pathogenesis of SBV-induced apoptosis. The molecular pathogenesis of apoptosis induced by SBV is needed to be clarified with more detailed molecular studies.

Key Words: Schmallenberg virus, apoptosis, Vero cell line, DNA fragmentation, Annexin V/PI, flow cytometry, caspase, gene expression, Puma

1. GİRİŞ

1.1. Schmallerberg Virüs

1.1.1. Etiyoloji

İkibinonbir yılının sonlarında Almanya ve Hollanda’da sığırlarda ateş, süt veriminde azalma ve ishal bulgularına rastlanmıştır. Hasta hayvanların pestivirüs, sığır herpesvirüs-1, şap, mavi dil, epizootik hemorajik hastalık, Rift Vadisi humması, üç gün hastalığı virüsleri yönünden negatif olması neticesinde söz konusu hastalık tablosunun yeni bir hastalık olabileceği düşünülmüş ve alınan kan örnekleri metagenomik analiz ile incelenmiştir. Yapılan sekans ve filogenetik analizler sonucunda hasta hayvanlara ait örneklerde, *Peribunyaviridae* ailesinin *Orthobunyavirus* cinsine ait yeni bir virüs tespit edilmiştir. Bu virüs, ilk pozitif örneğin alındığı yer olan Schmallerberg kasabasına atfen “Schmallerberg virüsü” olarak adlandırılmıştır (Hoffmann ve ark. 2012).

Schmallerberg virüsü (SBV) Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi’nin (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 2018b sınıflandırmasına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (ICTV 2018):

Alem: *Riboviria*

Şube: *Negarnaviricota*

Alt şube: *Polyploviricotina*

Sınıf: *Ellioviricetes*

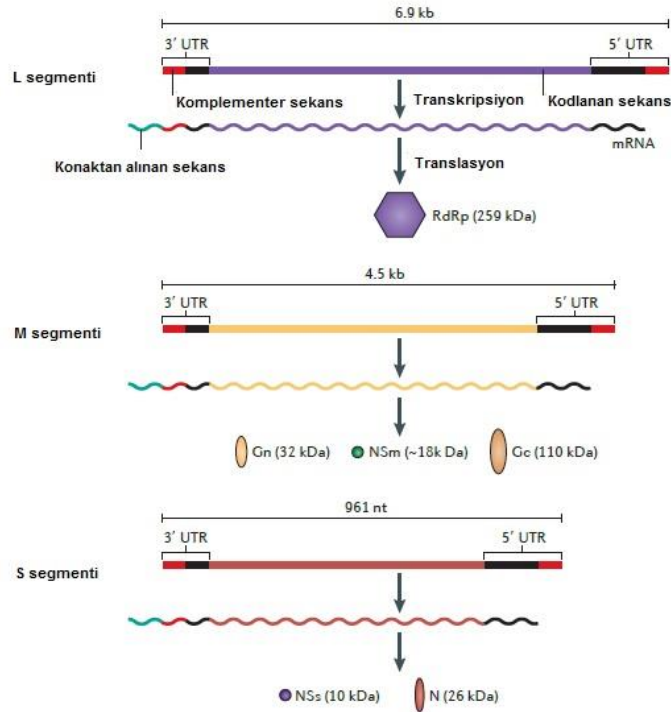
Takım: *Bunyavirales*

Aile: *Peribunyaviridae*

Cins: *Orthobunyavirus*

Tür: Schmallenberg orthobunyavirus

Diğer orthobunyavirüsler gibi SBV de 3 segmentli bir RNA genomuna sahiptir. Bu segmentler büyüklüklerine göre L (large), M (medium) ve S (small) olarak adlandırılmaktadır. SBV L segmenti 6865 nükleotit (nt) uzunluğundadır ve RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp; RNA-dependent RNA polymerase) enzimini kodlamaktadır. 4415 nt uzunluğunda olan M segmentinde, glikoprotein N (Gn) ve glikoprotein C (Gc) olarak isimlendirilen iki viral glikoprotein ile bir tane yapısal olmayan (non-structural) NSm proteini kodlanmaktadır. Bu proteinler bir poliprotein olarak sentezlenir ve translasyon sonrası Gn-NSm-Gc dizisinde parçalanır. Viral nükleokapsid (N) proteini ile yapısal olmayan bir protein olan NSs ise 830 nt uzunluğundaki S segmentinden kodlanmaktadır (Şekil 1.1; Çizelge 1.1) (Hoffmann ve ark. 2012, Elliot 2014).



Şekil 1.1. Orthobunyavirüslerin genom yapısı ve segmentlerinden kodlanan proteinler. kb: Kilobaz, nt: nükleotit, UTR: untranslated region (transle olmayan

bölge), L segment: Large (büyük) segment, mRNA: messenger RNA (mesajcı RNA), RdRp: RNA-dependent RNA polymerase (RNA-bağımlı RNA polimeraz), M segment: Medium (orta) segment, Gn: glikoprotein N, NSm: yapısal olmayan protein M, Gc: glikoprotein C, S segment: Small (küçük) segment, NSs: yapısal olmayan protein S, N: Nükleoprotein (Elliot (2014) makalesinden Türkçeleştirilmiştir).

Çizelge 1.1. SBV'nin S, M ve L segmentlerinden kodlanan proteinlerin açık okuma çerçeveleri (ORF) ve uzunlukları (Çizelge, SBV referans suşu olan BH80/11-4'e ait HE649914.1, HE649913.1 ve HE649912.1 GenBank erişim numaralarındaki veriler kullanarak hazırlanmıştır).

Segment	Protein	ORF	Protein uzunluğu
S (830 nt)	N	23-724 nt	233 aa
	NSs	48-323 nt	91 aa
M (4415 nt)	Gn	90-935 nt	282 aa
	NSm	936-1385 nt	150 aa
	Gc	1593-4037 nt	815 aa
L (6864 nt)	RdRp	16-6780 nt	2254 aa

SBV'nin **nükleoproteini (N)**, S segmentinin 23.-724. nükleotitleri arasındaki açık okuma çerçevesinde (ORF; open reading frame) kodlanmaktadır (Gouzil ve ark. 2016). SBV N proteini 233 aa uzunluğundadır (Çizelge 1.1). N proteini, viral üç segmenti sarmalayarak ribonükleoprotein (RNP) kompleksini oluşturur (Elliot 2014) (Şekil 1.2). SBV N proteininin kristalizasyon analizinde, protein promotörünün iki alan (N-terminal alan ve C-terminal alan) ile iki esnek koldan (N-terminal kol ve C-terminal kol) oluştuğu belirlenmiştir. Esnek kollar, proteinin gövdesinden dışarı doğru uzanmaktadır. N-terminal alan ve C-terminal alan arasındaki yüksek oranda pozitif yüklü yarık kısım ise genomik RNA bağlayıcı bölgeyi teşkil etmektedir (Dong ve ark. 2013). SBV N proteini tetrametik olarak bulunmaktadır ve proteinin çapı 10 nm'dir (Ariza ve ark. 2013, Dong ve ark. 2013). Tetramer yapısı için gerekli oligomerizasyonda hem N-terminal kol hem de C-terminal kol etkilidir ve viral RNA sentezinde önemli role sahiptir (Dong ve ark. 2013).

SBV **NSs proteini**, S segmentinin 48.-323. nükleotitleri arasında yer alan ORF'den kodlanmaktadır ve toplam 91 aa uzunluğundadır (Çizelge 1.1). NSs

proteininin N- ve C-terminal uçları ile 33-51. aminoasitlerini kapsayan merkez bölgesi yüksek oranda düzensiz olduğu bulunmuştur (Gouzil ve ark. 2016). NSs proteini, konakçı hücrenin gen ekspresyonunu, hücresel protein sentezini inhibe etmekte ve konakçı interferon yanıtına (özellikle IFN β) karşı koymaktadır (Varela ve ark. 2013, Barry ve ark. 2014). SBV'nin konakçı hücrenin gen ekspresyonunu ve hücresel protein sentezini inhibe edici özelliğinin en önemli bölgesi NSs proteininin C-terminal bölgesi olarak tanımlanmıştır. NSs proteininin, hücrede RNA polimeraz II'nin RPB1 altünitesini degrade ederek protein sentezini ve antiviral yanıtı engellediği belirlenmiştir. NSs proteini ayrıca hücrelerde apoptozisin uyarılmasında da etkili olarak bulunmuştur (Barry ve ark. 2014). SBV NSs proteini, enfekte hücrenin çekirdeğinde ve özellikle çekirdekçikte lokalize olmaktadır. NSs proteininin 33-51. aminoasitleri arasında yer alan bölge, çekirdekçik lokalizasyon sinyali (NoLS; nucleolar localization signal) içermektedir. NSs proteini, çekirdekçik markırları olan B23 ve fibrilların gibi proteinlerle kolokelize olmaktadır ve enfekte hücrenin çekirdekçığının bozulmasına neden olmaktadır (Gouzil ve ark. 2016). NSs proteininin, NSm ve Gc proteinlerinin hücre içi dağılımına etki etmediği belirlenmiştir (Kraatz ve ark. 2018). SBV enfeksiyonunu takiben NSs proteininin etkilediği konakçı gen ekspresyonu transkriptom analizi ile incelenmiştir. NSs geni silinmiş virüsle (SBV Δ NSs) enfekte hücrelerde 649 gen farklı eksprese edilmiş, incelenen genlerin %78,7'i artış göstermiş ve bu genlerin çoğunluğu antiviral ve IFN stimüle genler olduğu belirlenmiştir. Vahşi tip SBV ile enfekte hücrelerde ise 9 gen farklı ekspresyon göstermiştir. Farklı eksprese edilen bu 9 gen (RSAD2, ISG15, OAS1, OAS2, IFIT2, MX1, GNAL, RPS3A, MDFI), interferon sinyalizasyonu, interferon düzenleyici faktörler (IRF; Interferon regulatory factors), desen tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors), CDK5 (Cyclin-dependent kinase 5; Siklin-bağımlı kinaz 5) sinyalizasyonu, IL1 sinyalizasyonu gibi pek çok yolda etkilidir (Blomström ve ark. 2015).

SBV M segmenti, sırasıyla **Gn, NSm ve Gc proteinlerini** bir poliprotein olarak kodlanmaktadır. **Gn** proteini, 90.-935. nt arasındaki ORF'den kodlanır ve 282 aa uzunluğunda bir proteindir (Çizelge 1.1). Gn proteini viral yüzey glikoproteinidir ve Gc proteini ile birlikte yüzey çıkıntılarını oluşturur (Şekil 1.2). Tip I integral membran proteini olan Gn proteini sistein amino asiti yönünden zengindir. Gn

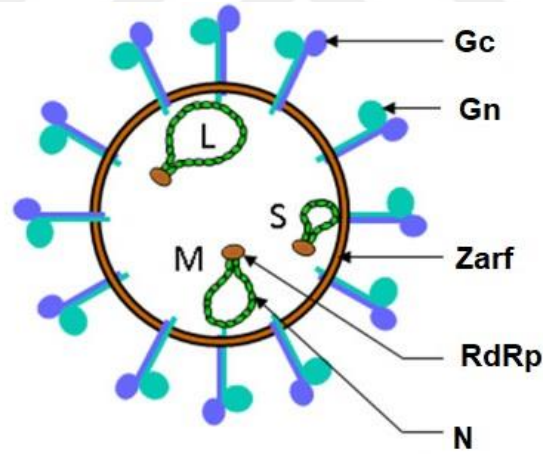
proteini, Gc proteininin Golgi kompleksine gitmesi için şaperon protein görevi görmektedir (Elliot 2014).

M segmentinden kodlanan yapısal olmayan protein **NSm**, 936.-1385. nt arasındaki ORF'den kodlanmaktadır. NSm 150 aa'ten oluşur ve bir transmembran proteindir (Çizelge 1.1). NSm, üç hidrofobik transmembran alanı (alan I, III ve V) ve iki hidrofobik olmayan alandan (alan II ve IV) oluşmaktadır. Alan I 7-29, alan II 30-57, alan III 58-75, alan IV 76-135 ve alan V ise 136-157 arasındaki aminoasitlerden meydana gelmektedir. Bu alanlardan II, III, IV ve V'in silinmesi SBV'nin çoğalma özelliklerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı için NSm proteininin enfeksiyöz virüs oluşumunda gerekli olmadığı bulunmuştur. SBV ile enfekte hücrelerde NSm hücre içinde diffüz biçimde yayılım göstermektedir ve NSm ile Gc proteini Golgi bölgesinde kolokalizasyon olmaktadır. NSm proteininin IV alanı, NSm proteininin hücre içi dağılımından ve Gc proteini ile kolokalizasyonundan sorumlu olarak bulunmuştur (Kraatz ve ark. 2018).

SBV **Gc** proteini, M segmentinin 1593.-4037. nt arasında kodlanmaktadır ve 815 aa uzunluğundadır (Çizelge 1.1). Gc proteini, Gn proteini ile birlikte viral yüzeyden 18 nm çıkıntı yapan üç ayaklı bir piramit yapısındadır (Şekil 1.2). Gc ve Gn proteinleri endoplazmik retikulumda heterodimer oluşturmaktadır (Elliot 2014, Hellert ve ark. 2019). Gc proteininin amino ucu (230 aa) hem poliklonal hem de monoklonal SBV özgül antikorları ile nötralize edilebilmektedir (Roman-Sosa ve ark. 2016). Aynı zamanda bu uç 4 adet disülfid bağı içermektedir. Disülfid bağlarının 1, 2 ve 4 numaralılarında oluşturulan mutasyonlar proteinin sekresyonunu engellemekte iken 3 numaralı disülfid bağındaki mutasyon ise protein sekresyonuna etki etmemektedir. Buna karşın, 3 numaralı disülfid bağı Gc özgül hiperimmün serumların nötralizan etkisi için kritik öneme sahip epitoplardan oluşumunda etkilidir. Gc proteininin amino ucu, iki adet N-glikozilasyon bölgesine sahiptir (NGlyc-1 ve NGlyc-2). NGlyc-1 bölgesinde glikozilasyona sahip olmayan protein hücre içinde kalmakta ve monoklonal antikorlar ile reaktif değildir (Roman-Sosa ve ark. 2017). Gc proteininin N-terminal ucunun yapısal analizi sonucunda, bu bölgenin iki alandan oluştuğu anlaşılmıştır. Biri 27 kDa ağırlıkta α -helikal "baş" bölgesi, diğeri ise 19 kDa ağırlığındaki özdeş iki adet bitişik β -sandviç yapısına sahip olan "sap" bölgesidir. Gc

proteininin N-terminal ucundaki “baş” bölgesi (465-702 aa) V harfi biçimindeki yapının ilk kolunu oluşturmaktadır. Bu alan, yaklaşık $6,5 \times 4,0 \times 3,5$ nm boyutlarında ve 27 kDa ağırlığında bir moleküler kütleyle sahip α -helikal bir demettir. Dört disülfid bağı ile iç kısmından stabilize edilmektedir. Elipsoidal yapıya sahip olan baş bölgesi, yüzeyinden çıkıntı yapan N493 ve N686 pozisyonlarında olmak üzere iki adet N-bağlantılı karbonhidrat zinciri taşımaktadır. Orthobunyavirüsler arasında bu baş bölgesinin aminoasit benzerliği oldukça düşüktür (Hellert ve ark. 2019).

SBV **RdRp** enzimi, L segmentinin 16.-6780. nt arasından kodlanan 2254 aa uzunluğunda bir proteindir (Çizelge 1.1). RdRp enzimi, RNP kompleksine bağlanmaktadır ve hem transkripsiyon hem de replikasyonda etkili bir enzimdir (Elliot 2014) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. SBV virion yapısı (Doceul ve arkadaşları (2013) makalesinden Türkçeleştirilmiştir).

SBV mRNA'sı da diğer Simbuvirüslerin mRNA'ları gibi poli(A) kuyruğu içermemektedir. *In silico* analizler, S segmenti için mRNA terminalinin hemen üstünde korunmuş bir saç tokası (hairpin) yapısını ve mRNA sonlandırma bölgesinden 6-10 nükleotit aşağısında yer alan tahmini bir sonlandırma sinyalinin (5'-GCAAGGC-3') ortaya çıkarmıştır. Bu transle olmamış bölgelerin (NTR; non-

translated region) Simbu serogrup virüsleri arasında oldukça korunmuş oldukları ortaya konulmuştur. Simbu serogrup virüslerinde yapısal olarak korunmuş olan hairpin yapısının 9-11 nükleotit aşağısında korunmuş tahmini bir sonlandırma sinyali (5'-GCN₁₋₃GC-3') bulunmuştur. SBV S segmenti için transkripsiyon sonlandırma sinyali ise 5'-GCAARGC-3' olarak tanımlanmıştır. M segment mRNA sonları ise Simbu serogrup virüsleri arasında çeşitlilik göstermektedir. SBV M segmentinde transkripsiyon, cRNA sonundan önce 32-84 nükleotitinde kesilmiş mRNA'ları serbest bırakan 53 nükleotitlik bir bölge boyunca sona ermektedir. SBV L segmenti mRNA'sında ise kesilme bulunmamıştır. SBV RdRP mRNA transkripsiyonunu başlatmak için şapka çalma (cap-snatching) stratejisini kullanmaktadır. SBV, viral gRNA kalıbı ile eşleşmesi için konakçı lider RNA'larının 1 veya 2 nükleotitini kullanmaktadır. SBV'nin şapka çalma modelinde, RdRP kesim bölgesinde herhangi bir nükleotit seçmemektedir ve konakçı lider RNA terminalinde her dört nükleotit de bulunabilmektedir. Ancak, sadece terminal üç nükleotide (A, G veya U) sahip olan lider RNA'lar transkripsiyonu başlatabilmektedir. Bazı bunyavirüslerce kullanılan "prime and realign" mekanizması, SBV mRNA'larının %70'inde gözlenmiştir. SBV'nin bu yöntemi, lider RNA'nın 3' ucuna komplementer nükleotitler ilave ederek transkripsiyon etkinliğini arttırmak için kullandığı düşünülmektedir (Coupeau ve ark. 2013a).

Diğer segmentli genoma sahip olan virüslerde olduğu gibi Bunyavirüslerde de çok sayıda genetik reassortment meydana gelmektedir. Reassortment ile bir virüsün yeni varyantları veya yeni virüsler ortaya çıkabilmektedir. Örneğin Rift Vadisi humması virüsü (RVFV) ile Bunyamwera virüs arasında reassortment bildirildiği gibi, RVFV'ye ait yeni varyantların da reassortment ile ortaya çıktığı bildirilmiştir (Bowen ve ark. 2001, Sall ve ark. 1999, Freire ve ark. 2015). Bir Bunyavirüs olan SBV'nin de reassortment ile meydana gelmiş olabileceği speküle edilmiştir. Yanase ve ark. (2012) yaptığı bir çalışmada SBV S ve L segmentlerinin Shamonda virüsten, M segmentinin Sathuperi virüsten almış olabileceği bildirilmiştir. Nükleotit benzerliği bakımından SBV S segmenti %96,4-96,7 oranında Shamonda virüse, M segmenti %81,8-82,2 oranında Sathuperi virüse, L segmenti ise %89,5-94,1 oranında Shamonda virüse yakındır (Yanase ve ark. 2012). Benzer şekilde, Goller ve ark. (2012) yapmış olduğu çalışma ile SBV'nin S segmentinin %97,7 ve L segmentinin

%92,9 oranında Shamonda virüse, M segmentinin ise %82,1 oranında Sathuperi virüse nükleotit dizilimi açısından benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Goller ve ark. 2012). Tüm bu veriler neticesinde SBV'nin, Shamonda ve Sathuperi virüslerle reassortant bir virüs olarak meydana geldiği düşünülmektedir.

SBV ve bazı diğer Orthobunyavirüsler arasında gerçekleşebilecek reassortment potansiyelleri *in vitro* olarak test edilmiştir. Yapılan çalışmada viral RNA polimerazın (L) ve nükleokapsit (N) proteininin aynı virüsten köken alması, yani reassortment gerçekleşmesi için S ve L segmentinin aynı virüsten gelmesi gerektiği ortaya konulmuştur. SBV'nin N ve L proteinleri ile Akabane virüs, Bunyamwera virüs, Oropouche virüs, Oya virüs, Perdoes virüslerin M segmenti arasında reassortment potansiyeli bulunmuştur. Bu virüsler arasında Oropouche virüs ile SBV arasında tespit edilen yüksek reassortment potansiyeli nedeniyle S ve L segmentleri SBV'den gelen, M segmenti ise Oropouche virüsten gelen yeni reassortant bir virüsün ortaya çıkmasının mümkün olduğu ve meydana gelecek bu yeni virüsün insanları enfekte etme özelliğinde olabileceği belirtilmektedir (Tilston-Lunel ve ark. 2017).

Zarflı virüslere karşı geniş ölçüde inhibitör etkili bir interferon-stimüle gen (ISG) olan BST-2'nin (Bone marrow stromal antigen 2), SBV konakçı spektrumunda etkili olup olmadığı araştırılmıştır. İnsan BST-2 (hBST2) ile transfekte hücrelerde SBV enfeksiyonunun sınırlı olarak geliştiği belirlenmiştir. hBST2nin, SBV'nin polimeraz aktivitesine etki etmediği ancak Gc/N protein oranını etkileyerek viral zarf oluşumunu engellediği ortaya konulmuştur. hBST2'nin aynı zamanda Akabane ve Sathuperi virüsünün de replikasyonunu sınırladığı, ancak insanlarda enfeksiyona neden olan Oropouche ve La Crosse virüsünün replikasyonuna ise etki etmediği belirlenmiştir. Bu sebeple çalışma sonuçlarına göre BST-2'nin, orthobunyavirüslerin konakçı spektrumunun belirlenmesinde tür spesifik olarak etkili olduğu bulunmuştur (Varela ve ark. 2017).

SBV, interferon yetersiz bir hücre hattı olan CPT-Tert hücre hattında 32 kez seri pasajlandığında "SBVp32" olarak adlandırılan izolat elde edilmiş ve bu izolatın *in vivo* patojenitesinin orijinal izolata göre çok daha yüksek olduğu bulunmuştur.

SBV ile enfekte edilen yavru fareler 7 gün içinde ölürken, SBVp32 ile enfekte edilen fareler 4-5 gün içinde öldüğü görülmüştür (Varela ve ark. 2013). Yapılan bir başka çalışmada ise vahşi tip SBV ile SBVp32 arasında S segmentinde 4 adet (66., 124., 167., 319. nt); M segmentinde 9 adet (1016., 1239., 1502., 1894., 2011., 2236., 2411., 2506., 2575. nt) ve L segmentinde 4 adet (130., 3044., 3858., 4078. nt) nükleotit farklılıkları olduğu belirlenmiştir (Varela ve ark. 2016).

SBVp32 reassortantları ile yapılan bir çalışmada, SBVp32'ye ait M segmentini içeren tüm reassortantların *in vivo* patojenitesi yüksek olduğu belirlenmiş ve SBVp32'nin yüksek patojenitesi M segmenti ile ilişkilendirilmiştir. SBVp32'nin L segmentini içeren reassortantlar vahşi tip SBV ile aynı patojeniteye sahip olarak bulunur iken S segmentini içeren reassortantların attenüe oldukları belirlenmiştir. S segmentinin 167/142 (N/NSs) pozisyonundaki nükleotitin A→G mutasyonunun (SBV-S-A167G) virüste attenüasyona, IFN yanıtını engelleme özelliğinin kaybolmasına ve hücrel protein sentezini durdurma özelliğinin ortadan kalkmasına neden olduğu saptanmıştır. SVBp32'nin S segmentinde meydana gelen ve attenüasyonla sonuçlanan bu mutasyona (SBV-S-A167G) rağmen, SBVp32'nin patojenitesinin vahşi tip virüse göre daha yüksek olmasının nedeni M segmentinde meydana gelen mutasyonlar olduğu belirlenmiştir. SBVp32'nin M segmentinin, defektli S segmentine rağmen hücrel protein sentezini durdurabildiği saptanmıştır. SBVp32 M segmentindeki 1894., 2236. ve 2411. nükleotitlerde meydana gelen mutasyonların, S segmentindeki mutasyondan kaynaklanan defektin (hücrel protein sentezini durdurma özelliğinin yok olması) kompanse edilmesinde etkili oldukları saptanmıştır. Ancak SBVp32'nin M segmentindeki mutasyonların, S segmentindeki mutasyondan kaynaklanan IFN yanıtını engelleme özelliğinin kaybolmasını kompanse edemediği bildirilmiştir (Varela ve ark. 2016).

Farklı yıllarda koyunlardan elde edilen SBV izolatlarının S segmentinin sekans analizleri yapıldığında, mutasyonların N/NSs overlap bölgesi olan 57-332 nükleotitler arasında yoğunlaştığı belirlenmiştir. S segmentinde gerçekleşen sinonim (aminoasitte değişikliğe neden olmayan) ve non-sinonim (aminoasitte değişikliğe neden olan) nükleotit değişiklik sayıları ile “non-sinonim nükleotit değişikliği/sinonim nükleotit değişikliği” oranları hesaplandığında, bu oran N

proteininde 1,2 iken Ns proteininde 6 olarak belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda SBV'nin N proteininin korunmuş olduğu ancak NSs proteininin mutasyona açık olduğu bildirilmiştir (Coupeau ve ark. 2016). SBV'nin İsviçre ve Almanya izolatlarının sekans analizi sonrasında, M segmentinin 2100-2300 nükleotitleri arasında ve 3' ucundaki sekanslarda mutasyonların olduğu bildirilmiştir. L segmentinde ise 3' ve 5' uçlardaki sekanslar ile 2000. nükleotit civarında mutasyonların yoğunlaştığı ve meydana gelen tüm mutasyonların sessiz olduğu belirlenmiştir (Hofmann ve ark. 2015). Almanya'nın farklı bölgelerindeki koyun, keçi ve sığırlardan elde edilen 24 adet SBV izolatı sekansları yönünden karşılaştırıldığında, M segmentinin 1483-1864. nükleotitleri arasındaki bölgede mutasyonların yoğunlaştığı belirlenmiştir (Fischer ve ark. 2013a). Bu bağlamda, M segmenti tarafından kodlanan Gc proteininin N-terminal bölgesinin mutasyonlara açık olduğu bildirilmiştir (Fischer ve ark. 2013a, Coupeau ve ark. 2013b).

SBV'nin *in vivo* genetik stabilitesi, aynı çiftlikteki iki farklı hayvanın serum örneklerinden izole edilen SBV izolatlarının sekans analizi yapılarak karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiş ve tüm genomda (üç segmentte) izolatlar arasında toplam 12 nükleotit değişikliği bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında, aynı sürüde farklı SBV suşlarının sirküle olabileceği belirtilmiştir. SBV'nin *in vitro* genetik stabilitesi ise, virüsün SK-6 hücrelerinde 10 kez pasajlanmasının ardından araştırıldığında, tüm genomda toplam 2-5 nükleotit değişikliği saptanmıştır (Hofmann ve ark. 2015). Yine SBV'nin hem *in vivo* hem *in vitro* genetik stabilitesinin incelendiği bir başka çalışmada, aynı sürüdeki iki kuzunun merkezi sinir sistemi dokularından elde edilen SBV sekansları hem birbirleri ile hem de referans SBV suşu (BH80/11-4) ile karşılaştırılmıştır. Mutasyonların en sık görüldüğü sekanslar M segmentinin 1394-2562. nükleotitleri arası olarak bulunmuş ve bu bölge “çok değişken bölge (hypervariable region)” olarak tanımlanmıştır. S ve L segmentinde ise az sayıda mutasyona rastlanılmıştır. Aynı sürüdeki farklı kuzulardan elde edilen sekanslar arasındaki farklılık, SBV'nin farklı suşlarının aynı sürüde sirküle olabileceğini göstermiştir. Kuzulardan elde edilen bu virüslerin BHK-21 hücresindeki seri pasajlanmasının ardından izolatların birinde (Na1) toplam 4 mutasyon, diğerinde (Na2) ise toplam 20 mutasyon belirlenmiştir (Coupeau ve ark. 2013b).

Farklı hayvan türleri ve *Culicoides* cinsi sivrisineklerden elde edilen SBV izolatları sekans yönünden kıyaslandığında, en fazla nükleotit değişimi koyun izolatlarında saptanmıştır. *Culicoides*'lerden elde edilen izolatlarda ise az sayıda nükleotit değişimi bulunmuş ve meydana gelen bu değişimlere memelilerden elde edilen SBV izolatlarında rastlanılmadığı rapor edilmiştir (Keşik-Maliszewska ve ark. 2018). Bir başka çalışmada ise, SBV'ye ait en fazla sekans çeşitliliğinin koyunlarda belirlenmesinde; hayvan türünün değil, SBV izolatının köken aldığı doku tipinin (kan, serum, organ gibi) etkili olduğu bildirilmiştir. Keşik-Maliszewska ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada da olduğu gibi, viremik sığır kan örneklerinde SBV izolatlarının genetik farklılık göstermediği, ancak fetal doku kökenli SBV izolatlarının ise fazla oranda sekans çeşitliliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda incelenen izolatların köken aldığı örnek tipinin, SBV sekans çeşitliliğine etki edebileceği rapor edilmiştir (Wernike ve Beer 2019).

SBV'nin farklı sıcaklıklardaki muhafaza edilmesine göre enfektivitesinin korunma süreleri bir çalışmada araştırılmıştır. Buna göre SBV 37°C'de muhafaza edildiğinde birkaç gün içinde, 28°C'de muhafaza edildiğinde ise birkaç hafta içinde enfektivitesini kaybetmektedir. Çalışma sonuçlarına göre SBV'nin -20°C'de saklanması viral titrenin bir ay boyunca korunmasını sağlamakta iken -70°C'de saklama ise 1 yıl boyunca viral titreyi korumaktadır (Wernike ve Beer 2016).

Simbu serogrubunda yer alan bazı virüslerin BHK-21 hücre hattında birbirlerinin enfeksiyon oluşturmalarını inhibe edip etmedikleri araştırılmıştır. BHK-21 hücreleri, SBV'nin iki farklı suşu (D495/12-1, D495/12-2), Sathuperi virüs, Douglas virüs, Shamonda virüs, Simbu virüs, Sabo virüs, Peaton virüs veya Aino virüs ile enfekte edilmiş, ardından farklı saatlerde SBV referans suşu olan BH80/11-4 ile ko-enfeksiyon yapılmıştır. Shamonda virüsün, enfeksiyondan 16. saatten itibaren SBV enfeksiyonunu inhibe ettiği görülmüştür. SBV'nin diğer iki farklı suşu (D495/12-1, D495/12-2), Sathuperi virüs, Douglas virüs, Simbu virüs, Sabo virüs, Peaton virüs ve Aino virüs ise enfeksiyonun 24. saatinden itibaren SBV enfeksiyonunu engellediği belirlenmiştir. Viral interferensin, genetik ve serolojik yakınlıktan bağımsız olarak hem SBV'nin farklı suşları hem de Simbu serogrubunun diğer virüsleri arasında gerçekleşebildiği rapor edilmiştir (Wernike ve ark. 2016).

1.1.2. Epidemiyoloji

SBV enfeksiyonu ilk olarak Almanya'nın Kuzey Ren-Vestfalya (North Rhine-Westphalia) eyaletine bağlı Schmalleberg kasabesindeki sığırlarda keşfedilmiştir (Hoffmann ve ark. 2012). Bu keşfin ardından Avrupa'nın pek çok ülkesinde SBV yönünden taramalar ve epidemiyolojik araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. SBV enfeksiyonunun görüldüğü ülkeler arasında; İngiltere (Anonim 2012a), İskoçya (Anonim 2013a), Galler (Anonim 2012b), İrlanda (Bradshaw ve ark. 2012), Belçika (Saegerman ve ark. 2014), Almanya (Hoffmann ve ark. 2012), Hollanda (van den Brom ve ark. 2012), Avusturya (Steinrigl ve ark. 2014), İtalya (Monaco ve ark. 2013), Fransa (Sailleau ve ark. 2013a), İspanya (Balseiro ve ark. 2015), Portekiz (Esteves ve ark. 2016), Lüksemburg (Anonim 2012c), Danimarka (Rasmussen ve ark. 2014), İsviçre (Balmer ve ark. 2014), Polonya (Larska ve ark. 2013a), İsveç (Chenais ve ark. 2015), Norveç (Wisløff ve ark. 2014), Finlandiya (Anonim 2012d), Türkiye (Azkur ve ark. 2013), Lübnan (Abi-Rizk ve ark. 2017), Yunanistan (Chaintoutis ve ark. 2014), Macaristan (Fehér ve ark. 2017) yer almaktadır.

Avrupa kıtasının haricinde SBV enfeksiyonu Afrika kıtasında Tanzanya (Mathew ve ark. 2015), Mozambik (Blomström ve ark. 2014), Etiyopya (Sibhat ve ark. 2018), Namibya (Molini ve ark. 2018), Nijerya (Oluwayelu ve ark. 2018) ülkelerinde saptanmıştır. Son zamanlarda ise SBV enfeksiyonu varlığı Çin, Rusya ve Azerbaycan'da da bildirilmiştir (Zhai ve ark. 2018, Bouchemla ve ark. 2018, Zeynalova ve ark. 2019).

Ülkemizde SBV enfeksiyonu ilk kez Azkur ve arkadaşları (2013) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden toplanan sığır, koyun, keçi ve manda kanlarında SBV özgül antikor yanıtı ticari ELISA kiti ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda Türkiye'deki SBV seroprevalansı %24,5 olarak belirlenirken;

sığırlarda %39,8, koyunlarda %1,6, keçilerde %2,8, mandalarda %1,5 oranında seropozitiflik saptanmıştır (Azkur ve ark. 2013). Marmara Bölgesi'nde yapılan bir çalışma ile aborte olmuş sığır ve koyun fötüslerinde SBV genom varlığı gösterilmiş ve sekans sonucunda Türkiye izolatının diğer SBV izolatları ile %100 homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir (Yılmaz ve ark. 2014). Kırıkkale'de yapılan bir çalışmada, sığırlarda SBV özgül antikor varlığı virüs nötralizasyon testi ile araştırılmış ve %24,1 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada SBV genom varlığı ise %3,3 olarak belirlenmiştir. Kırıkkale SBV izolatının sekansı sonucunda Avrupa'daki SBV izolatları ile %98-99 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Tonbak ve ark. 2016). Kırıkkale'de yetiştirilen koyunlarda yapılan bir çalışma sonucuna göre SBV seroprevalansı koyunlarda %0,38 olarak belirlenmiştir (Macun ve ark. 2017). Sivas ilindeki koyunlarda SBV seroprevalansı ise %0,27 olarak bulunmuştur (Elmas ve ark. 2018). Afyonkarahisar ilindeki sığırlarda SBV seropozitifliği %13,51 oranında rapor edilmiştir (Bıyıklı ve ark. 2017).

Azkur ve arkadaşları (2013), SBV enfeksiyonunun Türkiye'deki varlığının retrospektif olarak incelemişler ve SBV'nin ilk olarak ortaya çıktığı yıl olan 2011 yılından önce de Türkiye'de sirküle olabileceğini göstermişlerdir (Azkur ve ark. 2013). Retrospektif bir başka çalışmada, 1961-2010 yılları arasında Almanya'da toplanan beyin dokusu örnekleri SBV genomu ve proteinleri yönünden tarandığında ise hiçbir pozitifliğe rastlanılmamıştır. Yazarlar bu sonuçlara göre, SBV enfeksiyonunun tropikal veya subtropikal bölgelerden Avrupa'ya yayılmış olabileceğini iddia etmişlerdir (Gerhauser ve ark. 2014). Güney Afrika'da 2006 ve 2008 yıllarında artrogripozis, tortikollis, kifozis, brachygnatia, hidrosefalus gibi malformasyonlara sahip kuzularda teşhis için Wesselsbron, mavidil ve Akabane virüsleri yönünden tarama yapmış fakat her üç virüs de negatif sonuç vermiştir. Bunun üzerine tipik malformasyonlara sahip olan bu vakalara, Akabane virüsün yeni bir suşunun neden olabileceği düşünülmüştür. Fakat 2011 yılında SBV'nin Avrupa'daki keşfinden sonra, Güney Afrika'daki bu vakalara SBV'nin neden olabileceği akıllara gelmiştir. Ancak, vakalara ait örneklerin halihazırda mevcut olmaması ve SBV yönünden incelenememesinden dolayı bu soru henüz yanıt bulamamıştır (Leask ve ark. 2013).

SBV enfeksiyonunun coğrafik dağılımında irtifanın etkili olup olmadığı da bazı araştırmacılar tarafından araştırılmış ve SBV enfeksiyonunun yüksek irtifaya sahip bölgelerde de rastlanıldığı belirlenmiştir. İspanya'nın 2000 metreden yüksek dağlık bölgelerinde bulunan evcil ve yabani ruminantlardaki serolojik tarama sonrasında SBV özgül antikör varlığı tespit edilmiştir (Fernández-Aguilar ve ark. 2014). Portekiz'deki 2000 metre irtifaya sahip bölgede yetiştirilen koyunlarda da SBV seroprevalansı 2015 yılında %4,2, 2016 yılında %6 olarak belirlenmiştir (Esteves ve ark. 2018).

SBV enfeksiyonu evcil ve vahşi ruminantlarda görölmektedir. SBV konakçıları arasında evcil ruminantlardan sığır, koyun, keçi ve manda yer almaktadır (Hoffmann ve ark. 2012, Azkur ve ark. 2013). Yapılan kapsamlı bir çalışmada; kızıl tilki (*Vulpes vulpes*), rakun köpeği (*Nyctereutes procyonoides*), rakun (*Procyon lotor*), sansar (*Martes spp.*), sıçangiller (Muridae), avurtlaklar (Cricetidae) ve sivri faregiller (Soricidae) ailelerine ait küçük memeliler ile yaban domuzu (*Sus scrofa*), Avrupa muflonu (*Ovis orientalis musimon*), karaca (*Capreolus capreolus*), alageyik (*Dama dama*), kızıl geyik (*Cervus elaphus*), sika geyiği (*Cervus nippon*) SBV özgül antikör varlığı bakımından incelenmiştir. Bu hayvanlar arasında Avrupa muflonu, karaca, alageyik, kızıl geyik, sika geyiği ve yaban domuzu SBV seropozitif sonuç verirken, karnivorlar (kızıl tilki, rakun köpeği, rakun, sansar) ve küçük memeliler (sıçangiller, avurtlaklar, sivri faregiller) ise SBV seronegatif olarak belirlenmiştir (Mouchantat ve ark. 2015). Başka araştırmalarda, çengel boynuzlu dağ keçisi (*Rupicapra rupicapra*), kızıl geyik, alageyik, karaca, Avrupa muflonu ve Avrupa bizonu (*Bison bonasus*) SBV özgül antikör yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (Chiari ve ark. 2014, Larska ve ark. 2014). Fransa ve Hollanda'daki bazı hayvanat bahçelerinde bulunan pek çok türdeki vahşi ve egzotik ruminantlarda da SBV yönünden seropozitiflik belirlenmiştir (Laloy ve ark. 2016).

SBV'nin köpeklerde de enfeksiyon yapabileceğine dair bazı veriler mevcuttur. İsveç'te bir köpekte SBV özgül antikörler hem ELISA ile hem de serum nötralizasyon testi ile belirlenmiştir (Wensman ve ark. 2013). Fransa'daki bir çalışmada ise bir barınaktaki 5 köpek yavrusunda ataksi, ekzotropya (gözlerde dışa kayma), kafa sallama, gelişim geriliği gibi bulgular gözlenmiş ve bu yavrulardan 4

tanesi 5-6 haftalık yaşta ölmüştür. Hayatta kalan 3 aylık yavrudan kan örnekleri ve nekropsi sonrası doku örnekleri toplanmıştır. Alınan örnekler köpek koronavirüsü, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* ve canine minute virüs yönünden PZR ile test edildiğinde hiçbir etken yönünden pozitifliğe rastlanılmamıştır. Bunun üzerine yavrudan ve anneden alınan kan örnekleri ile SBV için virüs nötralizasyon testi yapılmış ve SBV özgül antikor bakımından yavrunun negatif annesinin ise pozitif olduğu belirlenmiştir. Aynı sonuçlar ticari ELISA kiti ile de teyit edilmiştir. Beyin dokusu örneğinden yapılan real-time RT-PZR ve konvansiyonel RT-PZR ile SBV genom yönünden pozitiflik saptanmıştır. Amplikonların sekanslanması ve BLAST analizi sonrasında, ruminant kökenli bir SBV izolatu ile köpek izolatının S segmentinin %100 benzediği belirlenmiştir (Sailleau ve ark. 2013b). SBV enfeksiyonunun köpeklerde de oluşabileceğini gösteren çalışmaların yanı sıra, farklı çalışmalarda köpeklerde ve bazı karnivorlarda SBV pozitifliğine rastlanılmadığı da bildirilmiştir. Örneğin bir çalışmada incelenen kızıl tilki, rakun köpeği, rakun, sansar gibi yabancı karnivorla SBV özgül antikor bakımından seronegatif olarak belirlenmiştir (Mouchantat ve ark. 2015). Yine, Belçika'daki 132 köpek serolojik olarak ELISA kiti ile incelendiğinde hiçbir köpekte SBV özgül antikor yönünden pozitifliğe rastlanılmadığı bildirilmiştir (Garigliany ve ark. 2013).

Yaban domuzlarında SBV özgül antikor yanıtı belirlenmesine rağmen (Mouchantat ve ark. 2015, Kęsik-Maliszewska ve ark. 2017), domuzlarda yapılan deneysel SBV enfeksiyonu sonucunda hayvanlarda SBV özgül antikor yanıtı olduğu ancak domuzların SBV replikasyonu ve bulaşmasında etkili rol oynamadıkları bulunmuştur (Poskin ve ark. 2014a). Atlarda SBV seropozitifliği ilk defa İran'daki yapılan serolojik inceleme sonrasında %5 olarak rapor edilmiştir (Rasekh ve ark. 2018).

SBV enfeksiyonunun varlığı insanlarda da araştırılmıştır. Koyun sürülerinin hayvan bakıcıları ve çobanlarda yapılan kapsamlı incelemeler sonucunda bu kişilerde SBV genomuna ve SBV özgül antikorlara rastlanılmadığı rapor edilmiştir (Ducomble ve ark. 2012). SBV salgını çıkan sığır, koyun ve keçi çiftliklerindeki toplam 301 kişide nötralizan antikor taraması yapıldığında da negatif sonuç elde edildiği

bildirilmiştir (Reusken ve ark. 2012). Tüm bu bilgiler ışığında SBV enfeksiyonunun zoonoz olmadığı anlaşılmıştır.

Yapılan pek çok çalışma ile *Culicoides* cinsi sinekler SBV'nin potansiyel vektörü olarak tanımlanmıştır. Danimarka'daki bir çalışmada 2011 yılında yakalanan *C. obsoletus* grup (*C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*) sivrisineklerde SBV genomu belirlenmiştir (Rasmussen ve ark. 2012). Hollanda ve İtalya'daki araştırmalarda da *Culicoides obsoletus* kompleksinde yer alan sivrisinekler SBV genomu yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (Goffredo ve ark. 2013, Elbers ve ark. 2015). Bir başka çalışmada ise obsoletus kompleksine ilaveten *C. punctatus* örneklerinde de SBV genomuna rastlanmış ve bu sivrisineğin de potansiyel SBV vektörü olabileceği rapor edilmiştir. SBV'nin *Culicoides obsoletus* kompleksi ve *C. punctatus* sineklerinde transovarial olarak bulaşabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Larska ve ark. 2013b). Belçika'da yapılan bir çalışma ile *C. obsoletus* complex, *C. obsoletus* s.s., *C. dewulfi*, *C. chiopterus* ve *C. pulicaris* türleri SBV genomu yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (De Regge ve ark. 2012). İspanya'da sahadan toplanan sivrisineklerin SBV genom yönünden taranması sonucunda SBV epidemiyolojisinde obsoletus kompleks sivrisineklerinin etkili olduğu belirlenmiştir. Öte yandan *Culicoides obsoletus* kompleksi ve *C. imicola* türünün SBV ile deneysel enfeksiyonu yapılan bir çalışmada *Culicoides imicola* türünün SBV enfeksiyonuna daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Pagès ve ark. 2018). Fransa'da ise *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. imicola*, *Culicoides pulicaris*, *Culicoides newsteadi*, *Culicoides lupicaris* ve *Culicoides nubeculosus* türleri SBV yönünden pozitif bulunmuştur (Ségard ve ark. 2018). Kuzey Avrupa'da yaygın bir sivrisinek türü olan *Culex pipiens*'in ise SBV epidemiyolojisinde rolü olmadığı rapor edilmiştir (Manley ve ark. 2015).

SBV, enfekte boğaların spermaları ile de yayılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, enfekte boğaların spermalarında SBV genomu tespit edilmiş ve enfekte boğaların semenleri ile virüsü saçtıkları da gösterilmiştir (Hoffmann ve ark. 2013, van der Poel ve ark. 2014a). İlaveten enfekte boğa spermalarının enfeksiyöz olduğu, hem farelerde hem de sığırlardaki deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Schulz ve ark. 2014, Ponsart ve ark. 2014). Polonya'da 2013-2015 yıllarında toplanan 131 adet

boğa sperma örneklerinin RT-PZR ile incelenmesi sonucunda %5,3 oranında SBV RNA pozitifliği belirlendiği rapor edilmiştir (Kęsik-Maliszewska ve Larska 2016). Tekelerde yapılan deneysel SBV enfeksiyonu sonrasında ise semende SBV genomuna rastlanılmadığı bildirilmiştir (Laloy ve ark. 2015).

Batı Nil virüsü, Usutu virüs, Chikungunya virüs gibi pek çok arboviral enfeksiyonun yayılmasında kuraklık durumunun etkili olması sebebiyle, araştırmacılar sivrisineklerle bulaşan SBV enfeksiyonu ile kuraklık arasındaki ilişkiyi de incelemişlerdir. SBV enfeksiyonunun yoğun görüldüğü bölgelerde enfeksiyon çıkışından önceki dönemlerde kuraklık yaşandığı, diğer bölgelere göre yağış miktarının önemli ölçüde azaldığı ve hava sıcaklığının arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, SBV enfeksiyonunun daha az yoğunlukta olduğu bölgelerde ise kuraklığın yaşanmadığını saptamışlardır. Bu nedenle, 2011 yılının başında yaşanan kuraklığın SBV enfeksiyonunun yayılmasını ve sirkülasyonunu artırıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir (Calzolari ve Albieri 2013).

SBV enfeksiyonunun koyunlarda malformasyon oluşumu üzerine yapılan bir anket çalışmasında, hayvanların çiftleşme mevsimi, çiftlikteki köpek sayısı ve silaj kullanılması faktörleri pek çok faktör arasında öne çıkmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, kuzularda malformasyonların daha fazla olduğu işletmelerde hayvanların Ağustos ayından önce veya Ağustos ayında çiftleştikleri, çiftlikte köpeklerin bulunduğu ve silaj ile besleme yapıldığı belirlenmiştir (Luttikholt ve ark. 2014).

1.1.3. Ekonomik Etki

SBV enfeksiyonunun ekonomi üzerine olan olumsuz etkileri pek çok çalışmada incelenmiştir. SBV enfeksiyonunun Fransa'da inek başına yıllık 26-43 € arası, İngiltere'de ise 29-36 € arasında ekonomik zarara neden olduğu tahmin edilmektedir (Raboisson ve ark. 2014). Koyunlardaki SBV enfeksiyonunun ise İngiltere'de koyun

başına yıllık 19-21 £ arası, Fransa’da ise 15-17 £ arasında ekonomik kayba yol açtığı hesaplanmıştır (Alarcon ve ark. 2014). Fransa’daki bir başka çalışmada ise SBV enfeksiyonunun yıllık ekonomik kaybı inek başına 23-43 € ve koyun başına 19-37 € olarak belirlenmiştir (Waret-Szkuta ve ark. 2017). Belçika’da anket ile yapılan bir araştırma sonuçlarına göre SBV ile enfekte evcil ruminant sürülerindeki tedavi masrafları ölümlü sonuçlanan vakalarda ortalama 50-80 € arasında iken iyileşmeyle sonuçlanan vakalarda 40-200 € arasındadır (Martinelle ve ark. 2014). İsviçre’de süt ineği çiftliklerinde SBV enfeksiyonunun süt verimi, fertilitite ve veteriner hekimlik maliyeti üzerine ekonomik etkisi araştırıldığında, bir çiftlik için ortalama 1606 İsviçre Frankı (veya 1338 €) kayba neden olduğu bildirilmiştir (Wüthrich ve ark. 2016).

İsviçre’de yapılan bir çalışmada SBV ile doğal enfekte olan (ELISA veya RT-PZR pozitif) sütçü inekler, ateş, süt veriminde azalma, abort gibi klinik belirti gösterenler ve göstermeyenler olarak ayrılmıştır. SBV epidemisinin olduğu dönemlerde klinik belirti gösteren ineklerde süt veriminin günde 1,9 kg, klinik belirti göstermeyen ineklerde ise günde 1,1 kg daha az olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, SBV enfeksiyonunun süt verimi üzerine olumsuz etkisi olduğu belirlenmiştir (Lechner ve ark. 2017). Hollanda’da bir önceki yıla göre 2011 yılında inek başına günlük 0,26 kg süt verim kaybı yaşandığı ve hayvanlarda fertilitite problemleri artış gösterdiği bildirilmiştir (Veldhuis ve ark. 2014).

1.1.4. Patogenez ve İmmünite

SBV çeşitli hücre tiplerini enfekte edebilmektedir ancak hücreye girişte kullandığı reseptörler tam olarak henüz bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmaya göre SBV’nin, viral tutunmada hücreye giriş için kullandığı bir reseptör heparan sülfat proteoglikanlardır (HSPG). Hem heparinaz ile muamele edilmiş hem de HSPG

knock-out HmLu-1 hücrelerinde SBV'nin titresinde 10 ile 1000 kat azalma tespit edilmiştir. HSPG knock-out hücrelerde SBV'nin düşük titrede de olsa replike olabilmesi nedeniyle, HSPG haricinde başka hücre reseptör/reseptörlerinin de SBV tropizminde rol oynadığı rapor edilmiştir (Murakami ve ark. 2017).

SBV enfeksiyonunda nötralizan antikor oluşumundan sorumlu viral proteinler incelendiğinde, Gc proteininin “baş” bölgesi (465-702 aa) ruminantlarda (koyun ve sığır) nötralizan antikor oluşumundan sorumlu olarak bulunmuştur. Bir çalışmada, doğal enfekte ruminant fötuslarından elde edilen SBV sekansları incelendiğinde, Gc proteininde meydana gelen mutasyonların trimerizasyon bölgesinde ve baş-sap bağlantı bölgesinde yoğunlaştığı belirlenmiştir. Ruminant fötuslarında antikor yanıtı gelişebildiği için, Gc proteinindeki bu mutasyonların immun kaçışta etkili olabileceği speküle edilmiştir (Hellert ve ark. 2019).

Koyunlarda farklı inokulasyon yolları (subkutan, intradermal ve intranazal), deneysel SBV enfeksiyonu oluşturmak amacıyla bir çalışmada test edilmiştir. Çalışma sonucunda hayvanların tümünde RNAemi ve seropozitiflik saptanması nedeniyle subkutan ve intradermal enjeksiyonlar en uygun inokulasyon yolları olarak belirlenmiştir. İntranazal inokulasyonda ise hiçbir başarı sağlanamadığı bildirilmiştir (Martinelle ve ark. 2017). Sığırlarda yapılan deneysel SBV enfeksiyonu çalışmasında ise virüs subkutan ve oral yollar ile hayvanlara verilmiştir. Koyunlardakine benzer olarak sığırlarda da subkutan inokulasyonda başarılı sonuç elde edilirken, oral yolla enfekte edilen hayvanların hiçbirisinde enfeksiyon gelişmemesi ve viral RNA saptanmaması nedeniyle SBV enfeksiyonunun oral yolla gelişmediği bildirilmiştir (Wernike ve ark. 2013a).

SBV ile enfekte buzağı kan örneklerinin başka bir buzağıya subkutan yolla verildikten 3 gün sonra buzağıdan kan serumu toplanmış ve viral titre 2×10^3 TCID₅₀/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu seruma “enfeksiyöz serum” adı verilmiş ve SBV ile ilgili patogenez, aşı, enfeksiyon modellemesi gibi çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır (Hoffmann ve ark. 2012, Wernike ve ark. 2012a). Enfeksiyöz serum ve hücre kültüründe üretilen SBV'nin buzağılardaki enfeksiyözitesi test edildiğinde, her iki virüsle enfekte hayvan grubunda da RNAeminin (viral RNA'nın

kanda tespit edilmesi) enfeksiyon sonrası 2. günde başladığı tespit edilmiştir. RNAeminin süresi ise enfeksiyöz serum ile enfekte grupta 5. ve 6. güne kadar, hücre kültüründe üretilen virüs ile enfekte grupta 6. ve 7. güne kadar sürdüğü belirlenmiştir. Enfeksiyöz serum ile enfekte edilen hayvanların mezenterik ve mandibular lenf yumruları ile dalaklarının viral RNA yönünden pozitif olarak bulunduğu, hücre kültüründe üretilen virüs ile enfekte hayvanların sadece mezenterik lenf yumrusunun pozitif olarak bulunduğu bildirilmiştir. Her iki gruptaki hayvanlarda SBV özgül antikor yanıtının ise enfeksiyondan 2 hafta sonra tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Wernike ve ark. 2012a).

Wernike ve arkadaşları (2014), SBV ile doğal enfekte inekleri gebelikleri süresince izlemiştir. Çalışma süresince toplam iki gebe inekte abort gözleendiği ve bu abortların birinin gebeliğin 190. gününde diğlerinin 250. gününde şekillendiği bildirilmiştir. Aborte olan fötuslar incelendiğinde patomorfolojik anomalilere, SBV özgül antikor yanıtına ve viral genom rastlanılmadığı rapor edilmiştir. Çalışmada bir buzağı ölü doğmuş ve hiçbir dokusunda viral genom saptanamadığı bildirilmiştir. SBV ilişkili malformasyonlara sahip olan sadece bir buzağı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, gebelikleri süresince virolojik ve serolojik olarak izlenen inekleri dört gruba ayırmıştır: gebeliğin 0-46. günlerinde enfekte olanlar, 47-107. günlerinde enfekte olanlar, 108-136. günlerinde enfekte olanlar, 137-162. günlerinde enfekte olanlar. Gebeliğin 0-46. günlerinde enfekte olan ineklerin buzağılarının sağlıklı olarak doğduğu ve antikor/antijen negatif oldukları bildirilmiştir. Gebeliğin 47-107. günlerinde enfekte olan ineklerin 4 buzağısı ölü doğum/aborte iken 32 tanesi sağlıklı olarak doğmuştur. Gebeliğin 108-136. günlerinde enfekte olan ineklerde ölü doğum/abort gözlenmediği ve sağlıklı doğan buzağuların antikor/antijen negatif oldukları belirlenmiştir. Gebeliğin 137-162. günlerinde enfekte olan ineklerde ise bir ölü doğum şekillenirken 7 sağlıklı buzağı doğduğu rapor edilmiştir. Sağlıklı doğan ve anneleri gebeliğin 47-107. ve 137-162. günlerinde enfekte olan buzağuların kolostrum almadan önceki serum örneklerinde SBV özgül antikor pozitif oldukları ve mekonyum veya serum örneklerinde ise viral RNA pozitif olduğu bildirilmiştir (Wernike ve ark. 2014).

Gebeliğin farklı günlerindeki (60., 90., 120., 150. günler) düvelerin SBV ile enfekte edildiği bir çalışmada, hem düvelere hem de buzağılara ait örnekler serolojik, virolojik ve patolojik olarak incelenmiş ve SBV'nin gebe ineklerdeki patogenezi hakkında bilgi elde edilmek istenmiştir. Enfekte edilen gebe düvelerde enfeksiyonu takip eden 3-5 gün içinde RNAemi geliştiği ve 14. günden itibaren seropozitiflik belirlenebildiği rapor edilmiştir. Çalışmada enfekte edilen düvelere enfeksiyondan sonraki 35. günde ötenazi uygulanıp, hem düvelerin hem de buzağuların çeşitli dokuları incelenmiştir. Düvelerin hiçbirinde RNAemi saptanmazken, gebelik süresinden bağımsız olarak hepsinin lenfatik dokularında SBV genomu belirlendiği bildirilmiştir. Gebeliğin farklı günlerindeki SBV patogenezinin araştırıldığı bu çalışmada bulgular arasında ortak bir motif gözlenmez iken, fetal dokularda (serum/kan, fetal plasenta, lenfatik doku, organlar, sinir dokusu, beyin omurilik sıvısı, mekonyum) en çok SBV genom pozitifliği yakalanan gün gebeliğin 120. günü olarak bildirilmiştir. Gebeliğin 120. günündeki düvelerin enfeksiyondan sonra farklı günlerde (10., 11., 14., 15., 28., 29. günler) yapılan nekropsileri sonucunda ise 15. güne kadar maternal ve fetal dokularda SBV genomu pozitifliği belirlenirken sonraki günlerde sadece maternal dokuda genom belirlendiği rapor edilmiştir. Çalışmada, gebeliğin 150. gününde enfekte edilen düvelerin yavrularında ise SBV genomuna ve SBV özgül antikorlara rastlanılmazken, maternal lenfatik dokularda SBV genomu pozitif olarak belirlenmiştir. Yavrunun immun sisteminin gelişmesine rağmen SBV özgül antikor yanıtı oluşmamasının nedeni olarak, virüsün anneden yavruya transplasental geçişinin olmadığı veya kısıtlı transplasental geçişin olduğu öne sürülmüştür (König ve ark. 2019).

Gebe koyunlarda deneysel SBV enfeksiyonu yapılan bir çalışmada gebelikte gelişen enfeksiyonun konjenital malformasyonlara etkisi araştırılmıştır. Gebeliğin 45. ve 60. günlerinde olan koyunlar subkutan yolla SBV ile enfekte edildiğinde, doğan kuzuların hiçbirinde konjenital malformasyona rastlanılmamış ve kuzular SBV özgül antikor ile RNAemi yönünden negatif olarak belirlenmiştir. Enfekte koyunlardan doğan toplam 21 kuzunun sadece 3 tanesinin farklı dokularında (beyin sapı, omurilik, lenf yumrusu, kas, eklem, akciğer) SBV genomu pozitif olarak belirlenmiştir. Kuzulara ait plasental dokularda ise (kotiledonlar arası membran, amniyon sıvısı, göbek kordonu, plasentomlar) yüksek oranda SBV genomu belirlendiği bildirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında, gebeliğin 45. ve 60. günlerindeki koyunların SBV enfeksiyonunun konjenital malformasyona neden olmaksızın virüsün plasental kolonizasyonuna neden olduğu iddia edilmiştir (Martinelle ve ark. 2015).

Gebe keçilerde yapılan bir çalışmada ise gebeliğin 28. ve 42. günlerinde enfekte edilen keçiler 55. günde ötenazi edilmiştir. RNAeminin, enfeksiyonun 2-4. günlerinde başladığı ve 4-6 gün boyunca devam ettiği belirlenmiştir. SBV özgül antikor yanıtı ise enfeksiyondan sonraki 7-14. günlerde tespit edilebilmiştir. Fötüslerin beyin, omurilik, iskelet kası, böbrek, kalp, mandibula, göz, timus, karaciğer, mekonyumlu bağırsak, akciğer, göbek kordonu, göbek kanı, amniyotik membran, amniyotik sıvı, allantoik membran, allantoik sıvı örnekleri viral RNA bakımından real-time PZR ile pozitif olarak belirlenmiştir. Gebeliğin günlerine göre karşılaştırma yapıldığında ise, 42. günde enfekte edilen keçilerin fötüslerinde 28. gündekilere göre daha yüksek oranda pozitiflik belirlendiği rapor edilmiştir (Laloy ve ark. 2017).

Koyunlarda enfeksiyöz serum ve hücre kültüründe üretilen virüs ile yapılan deneysel SBV enfeksiyonunda, koyunlardaki SBV özgül antikor yanıtının enfeksiyon sonrasında 10-21 gün aralığında geliştiği araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Koyunlarda SBV enfeksiyonunu takip eden 1-4 gün içinde kandaki viral RNA varlığının (RNAemi) tespit edilebilmekte olduğu ve RNAeminin 3-5 gün kadar sürdüğü bildirilmiştir (Wernike ve ark. 2013b). Bu deneysel çalışmada RNAeminin kısa sürmesinin aksine, doğal enfekte koyunlarda RNAeminin daha uzun sürdüğü (2 hafta kadar) bir başka çalışmada rapor edilmiştir (Claine ve ark. 2013).

Koyunlarda yapılan bir başka çalışmada enfeksiyöz serum ve bu serumun dilüsyonları (1/10, 1/100, 1/1000) kullanılarak deneysel enfeksiyon oluşturulmuştur. RNAeminin enfeksiyondan sonraki 2.-7. günler arasında saptandığı ve dilüe edilmemiş ve 1/10 dilüe edilmiş enfeksiyöz serum ile inokule edilen gruplar arasında viral yük bakımından farklılık belirlenmediği bildirilmiştir. RNAemi gelişen tüm koyunların enfeksiyondan sonraki 7.-9. günler arasında nötralizan antikor bakımından ise pozitif hale geldikleri rapor edilmiştir (Poskin ve ark. 2014b).

Sığırlardaki deneysel SBV enfeksiyonu geliştirilen bir diğer çalışmada, önceden SBV ile enfekte olan seropozitif düve grubu, SBV-seronegatif sığırlar grubu ve negatif kontrol grubu (PBS inokule edilen) olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur. Deneysel gruplardaki hayvanlar $10^{4.1}$ TCID₅₀/ml titredeki SBV ile subkutan yolla enfekte edildiğinde hayvanlarda RNAeminin, enfeksiyon sonrasında 2.-3. günlerde başladığı ve 5.-6. günlere kadar sürdüğü bildirilmiştir. Dişi ve erkek hayvanlar arasında enfeksiyonun seyri bakımından farklılık belirlenmemiştir. Subkutan yolla enfekte edilen hayvanların bazılarının enfeksiyondan sonra 14. günde, bazılarının ise 21. günde seropozitif hale geldiği belirlenirken, oral yolla enfekte edilen hayvanlarda ise SBV özgül antikor yanıtı gelişmediği bildirilmiştir. Hayvanların hiçbirinin periferik kan mononükleer hücrelerinde (Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC) SBV genomuna rastlanılmadığı rapor edilmiştir. Enfekte hayvanların kan örnekleri akan hücre ölçer ile analiz edildiğinde, subkutan yolla enfekte edilen hayvanların IgM+ B lenfositlerinin enfeksiyon sonrası 10. güne kadar saptandığı, CD8⁺ T hücrelerinin ise 6. güne kadar düştüğü ve 12. güne kadar normal sınırlara dönmüş olduğu bildirilmiştir. CD4⁺ T hücrelerinin subkutan SBV enfeksiyonundan sonraki 3.-7. günlerde düşüş gösterdiği ancak sözkonusu günlerde incelenen PBMC örneklerinde viral genom saptanmaması nedeniyle, hücre sayısındaki bu azalmanın viral kaynaklı olmadığı düşünülmüştür. SBV özgül antikor yönünden pozitif olan hayvan grubunda oluşturulan enfeksiyon sonrasında ise CD8⁺ T hücrelerinde artış olduğu ve bunun hafıza T hücreleri ile ilişkili olabileceği speküle edilmiştir (Wernike ve ark. 2013a).

Lama ve alpakalarda oluşturulan deneysel SBV enfeksiyonunun 3.-7. günleri arasında RNAemi ve 9-21. günlerinde serolojik yanıt belirlendiği rapor edilmiştir (Schulz ve ark. 2015a).

Bir çalışmada, SBV ile doğal enfekte hayvanların çok az bir kısmında beyin dokusuna infiltre olan immun sistem hücrelerine rastlanılmıştır. Bu hayvanların beyin dokusundaki hücreler immunofenotiplendirildiğinde, en fazla infiltre olan hücrelerin sırası ile CD3 pozitif T hücreler, CD79 α pozitif B hücreleri ve CD68 pozitif mikroglia/makrofaj olduğu bildirilmiştir (Herder ve ark. 2013).

Yenidoğan Balb/c farelerine SBV'nin intraserebral yolla inokule edildiği bir çalışmada fare beyin dokularında T-bet (Th1 hücresi), Gata3 (Th2 hücresi), Foxp3 (Treg hücresi), RoRγt (Th17 hücresi) ve Eomes (CD4⁺ T hücresi) transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Çalışmada intraserebral SBV enfeksiyonu sonucunda fare beyinlerinde T-bet, Foxp3, Gata3 ve RoRγt transkripsiyon faktörlerinin artış gösterdiği, Eomes transkripsiyon faktörünün ise azaldığı bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında SBV enfeksiyonunu takiben Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerinin beyin dokusuna infiltre olduğu speküle edilmiştir (Aksoy ve Azkur 2019).

Koyunlarda deneysel SBV enfeksiyonu yapılan bir çalışmada RNAeminin ortalama 2,2 günde başladığı ve ortalama 4,6 gün boyunca real-time RT-PZR ile tespit edilebildiği bildirilmiştir. SBV N protein özgül IgM antikorlarının, enfeksiyondan sonra ortalama 6,6 gün sonra tespit edildiği ve yaklaşık 2 hafta süreyle IgM özgül ELISA ile tespit edilebilir seviyede kaldığı bulunmuştur. SBV N protein özgül IgG antikorların enfeksiyondan 10-21 gün sonra gelişmeye başladığı bildirilmiştir. İlk enfeksiyona ek olarak, ikinci enfeksiyon ve challenge uygulanan hayvanlarda ise bu uygulamalardan sonra IgM seviyesinde artış olmadığı, IgG seviyesinde ise çok hafif ve geçici bir yükseliş olduğu belirlenmiştir (Poskin ve ark. 2015).

Endalew ve arkadaşları (2018) Charolais ırkı 4 aylık koyunlarda ve Holstein ırkı 6 aylık sığırlarda farklı SBV inokulumları ile deneysel enfeksiyon oluşturmuş ve hayvanlarda oluşan virolojik ve serolojik yanıt ile patolojik bulguları değerlendirmiştir. Çalışmada SBV inokulumu olarak; enfeksiyöz serum, hücre kültüründen elde edilen virüs ve kuzu beyin homojenatı kullanılmıştır. Araştırmacılar koyunlarda enfeksiyöz serum ve hücre kültüründen elde edilen virüsü; sığırlarda ise her üç inokulum da denemişlerdir. Enfeksiyöz serum ile enfekte edilen koyunlarda viral RNA ilk olarak 2. günde saptanmış ve RNAeminin 5. güne kadar sürdüğü belirlenmiştir. Enfeksiyöz serum ile enfekte sığırlarda ise viral RNA 3. günde ilk kez belirlenebilirken, RNAeminin 7. güne kadar devam ettiği bildirilmiştir. Viremi enfeksiyöz serum ile enfekte tüm sığırlarda belirlenmiş ve viral titrenin 8 pfu/ml ile $1,8 \times 10^4$ pfu/ml arasında değiştiği belirtilmiştir. Koyunlardaki viremi ise sadece hücre

kültüründen elde edilen virüs ile enfekte edilen bir hayvanda belirlenmiş ve viral titre 8 pfu/ml olarak kaydedilmiştir. Koyun ve sığırlardaki nötralizan antikor yanıtı plak redüksiyon nötralizasyon testi ile araştırılmış ve her iki türde de enfeksiyon sonrası 21. günde antikor yanıtı belirlenmiştir. Nötralizan antikor yanıtı bakımından, koyunlardan sadece bir tanesinde sığırların ise 3 tanesinde pozitiflik belirlendiği rapor edilmiştir (Endalew ve ark. 2018).

SBV ile doğal enfekte olan ve ölü doğan malforme buzağı ve kuzuların incelendiği bir çalışmada hayvanlarda hem SBV genomu hem de SBV özgül nötralizan antikor yanıtı tespit edilmiştir. Kolostrum almamış bu hayvanlarda SBV özgül nötralizan antikor yanıtı geliştiği için fütusta virüse karşı humoral immun yanıtın etkili olduğu düşünülmektedir (De Regge ve ark. 2013).

SBV ile doğal enfekte olan sığırlarda SBV özgül antikor yanıtı 6 yıl boyunca kalabilmektedir (Wernike ve ark. 2018a). SBV ile enfekte ineklerin kolostrum aracılığıyla buzağılarına SBV özgül maternal antikor geçişi olduğu ve bu maternal antikorların 4-8 aylık yaşa kadar (ortalama 6 ay) buzağıdan alınan serum örneklerinde belirlenebildiği farklı araştırmalarda bildirilmiştir (Elbers ve ark. 2014, Bıyıklı ve ark. 2017).

SBV ile doğal enfekte olan koyunların, gebelikte deneysel olarak oluşturulan SBV enfeksiyonuna karşı korunduğu ortaya konulmuştur. Bir çalışmada, gebeliğin 107. gününde SBV inokule edilen koyunların (ötenazi uygulanan grup) nekropsileri yapıldığında ne koyunlarda ne de fütuslarda SBV genomuna rastlanılmamıştır. SBV ile önceden doğal enfekte olan gebe koyunların (doğum yapan grup) kuzularında SBV özgül maternal antikorlar belirlenmekte ve bu antikorlar, kuzular yaklaşık 3 aylık yaşta iken yapılan challenge enfeksiyonuna karşı kuzuyu korumaktadır. Bu çalışmaya göre, SBV ile doğal enfekte koyunların kazandığı bağışıklığın SBV ile re-enfeksiyonu engellediği ve kolostrum aracılığıyla kuzuya aktarılan maternal antikorların da kuzuları SBV enfeksiyonuna karşı koruduğu ortaya konulmuştur (Rodríguez-Prieto ve ark. 2016).

1.1.5. Klinik ve Patolojik Bulgular

SBV enfeksiyonu koyunlarda genellikle hafif seyirli veya subklinik seyretmektedir. Koyunların SBV ile deneysel enfeksiyonunda ateş bulgusunun gelişmediği ve sadece bir hayvanda ise ishal tablosu görüldüğü belirlenmiştir (Wernike ve ark. 2013b). Bir başka çalışmada ise SBV ile enfekte edilen koyunlarda ateş haricinde herhangi bir klinik belirtiyeye rastlanmadığı rapor edilmiştir (Endalew ve ark. 2018). Öte yandan Poskin ve arkadaşlarının (2014b) yaptıkları deneysel enfeksiyonda, 12 koyundan 2 tanesinde ateş gözlemlenmiş fakat ortalama vücut sıcaklarının normal aralıklarda olması nedeniyle ateş bulgusu önemsenmemiştir (Poskin ve ark. 2014b). Bazı araştırmalarda ise koyunlarda ateş bulgusuna bile rastlanılmamıştır (Poskin ve ark. 2015, Martinelle ve ark. 2015, Martinelle ve ark. 2017). SBV ile deneysel olarak enfekte edilen keçilerde ise ateş dahil hiçbir klinik bulguya rastlanılmadığı rapor edilmiştir (Laloy ve ark. 2015).

SBV ile enfekte erişkin sığırlarda en belirgin klinik bulgular ateş, ishal ve süt veriminde azalmadır. Deneysel enfekte edilen sığırlarda ateş ve ishal bulgularına rastlanıldığı belirtilmiştir (Hoffmann ve ark. 2012). SBV ilişkili klinik bulguların erişkin hayvanlarda türlere göre gösterdiği farklılıklar, Çizelge 1.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Erişkin koyun, keçi ve sığırlarda SBV ilişkili klinik bulgular. (Hoffmann ve ark. 2012, Wernike ve ark. 2013b, Poskin ve ark. 2014b, Laloy ve ark. 2015, Martinelle ve ark. 2015, Poskin ve ark. 2015, Martinelle ve ark. 2017, Endalew ve ark. 2018 kaynaklarından özetlenmiştir)

	Koyun	Keçi	Sığır
Klinik seyir	Hafif veya subklinik seyirli	Subklinik seyirli	Klinik bulgular var
Ateş	Genelde yok*	Yok	Var
İshal	Genelde yok*	Yok	Var
Süt veriminde düşüş	Yok	Yok	Var

*Çoğu araştırmada

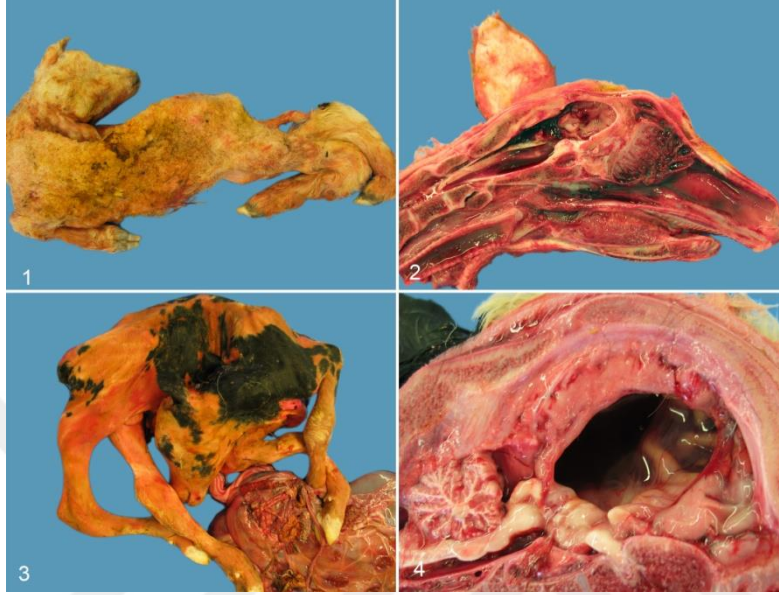
Koyunlarda yapılan bazı araştırmalarda, SBV ilişkili nekropsi bulgusu olarak mezenterik lenf yumrusunda büyüme kaydedilmiş iken (Wernike ve ark. 2013b), bazı araştırma sonuçları ise koyunlarda SBV ilişkili makroskopik nekropsi bulgusu gelişmediğini göstermektedir (Poskin ve ark. 2014b).

SBV enfeksiyonunun buzağı, kuzu ve oğlaklarda konjenital malformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (van den Brom ve ark. 2012, Herder ve ark. 2012). SBV ile gebelik döneminde intrauterin enfeksiyon geliştiğı ve bunun sonucunda konjenital malformasyonlara neden olduğu tespit edilmiştir (Bayrou ve ark. 2014, Peperkamp ve ark. 2015).

Belçika'da gerçekleşen klinik bir vakada, bir ineğin normal şekilde doğurduğu buzağıda ayakta duramama, kaslarda hipertoni, körlük gibi bulgular saptanmıştır. Buzağının nekropsisinde beyincik ve beyin sapı normal iken beyinde poreensefali bulgusu rapor edilmiştir. Skolyoz, artrogripoz gibi bulguların bulunmadığı buzağının pek çok dokusu BVDV/MD, mavidil serotip 8 ve SBV yönünden real-time PZR ile tarandığında merkezi sinir sistemi dokusu sadece SBV yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (Garigliany ve ark. 2012).

SBV ile doğal enfekte ruminantların aborte olmuş veya ölü doğmuş fötusları farklı çalışmalarda incelendiğinde, koyunlarda artrogripozis, brachignathia inferior, prognatism, tortikollis, kifozis, lordozis, skolyozis; keçilerde artrogripozis, vertebral deformiteler; sığırlarda ise artrogripozis, brachignathia inferior, tortikollis, kifozis, lordozis, skolyozis ve kranial malformasyonlar belirlenmiştir (Herder ve ark. 2012, Bayrou ve ark. 2014, van den Brom ve ark. 2012). SBV ilişkili makroskopik bulgular açısından koyunlarda en sık skolyozis, buzağılarda ise en sık tortikollis görüldüğü bildirilmiştir (Peperkamp ve ark. 2015). Yapılan çalışmalarda, SBV ilişkili merkezi sinir sisteminde belirlenen bulgular ise koyunlarda hidrosefalus, hidranensefali, serebellar hipoplazi, poreensefali, makrosefali, omurilik hipoplazisi; keçilerde poreensefali; sığırlarda ise serebellar hipoplazi, hidrosefalus, hidranensefali, poreensefali, beyin kökü hipoplazisi, mikromiyelidir (Herder ve ark. 2012, Bayrou ve ark. 2014, van den Brom ve ark. 2012). SBV ilişkili poreensefali ve hidranensefali

bulgularının en sık olarak temporal lobda rastlanıldığı bildirilmiştir (Herder ve ark. 2013). SBV ilişkili bazı konjenital malformasyonlar Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Schmallenberg virüsü intrauterin enfeksiyonu ile ilişkili konjenital malformasyonlar. (1) SBV ile enfekte ölü doğmuş kuzuda tortikollis, skolyozis, artrogripozis. (2) SBV ile enfekte ölü doğmuş kuzuda kalınlaşmış kalvaryum, küçük beyin boşluğu, mikroensefali, brachignatia inferior. (3) SBV ile enfekte ölü doğmuş buzağıda tortikollis ve artrogripozis. (4) SBV ile enfekte ölü doğmuş buzağıda hidrosefalus ve küçük orta beyin ile beyin kökü (Peperkamp ve ark. (2015).

Merkezi sinir sistemine ait patolojik bulguların yanı sıra farklı doku ve organlarda da defektler SBV enfeksiyonunda rastlanmaktadır. SBV ile enfekte koyun fötüslerinde mumifikasyon, kardiyak ventriküler septal defekt, unilateral hidronefrozis, kolon atrezisi; keçi fötüslerinde pulmoner hipoplazi; sığır fötüslerinde ise ectopia cordis (kalbin olması gerekenden farklı bir yerde oluşması), pulmoner hipoplazi, kardiyak ventriküler septal defekt saptandığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar bazı kuzularda lenf nodu ve dalakta, buzağılarda ise timus ve lenf nodunda lenfoid hücre kaybı belirlemişlerdir (Herder ve ark. 2012).

Gebeliğin farklı günlerindeki düvelerin SBV ile enfekte edildiği bir çalışmada, gebe düvelerin bir kısmında ateş gelişmiştir. Çalışmadaki toplam 35 fötusun yalnızca birinde SBV ilişkili malformasyonlar (tortikollis ve artrogripozis) belirlenmiştir ve bir düvede de abort geliştiği rapor edilmiştir (König ve ark. 2019). SBV ile deneysel olarak enfekte edilen sığırlarda yapılan bir başka çalışmada ise nekropside patomorfolojik değişikliklerin gözlenmediği bildirilmiştir (Wernike ve ark. 2013a).

Gebe keçilerdeki deneysel SBV enfeksiyonunda, hayvanlar gebeliğin 28. veya 42. gününde enfekte edilmiş ve 55. günde de hayvanlara nekropsi uygulanmıştır. Çalışma boyunca hayvanların hiçbirinde ateş dahil hiçbir klinik bulgu gözlenmemiştir. Nekropside hem annelere hem de fötlara ait dokular incelendiğinde, her iki grupta da 11 fötustan 5 tanesi nekropsisi öncesinde ölmüş ve iki fötusta porensel saptanmıştır. Viral antijen ve genom fötal kas, böbrek, kalp, göz, karaciğer, omurilik, beyin, akciğer, bağırsak dokusunda belirlenmiş ve ilaveten bazı fötusların göz, akciğer, bağırsak, göbek kordonu örneklerinden virüs izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir (Laloy ve ark. 2017).

SBV ile enfekte buzağı ve kuzuların iskelet kasları, kalp, periferik sinirleri, deri, göz, lenfoid dokuları, gastrointestinal, solunum, ürogenital kanalları ve endokrin organları incelendiğinde en belirgin patolojik bulgunun kas hipoplazisi olduğu belirlenmiştir. Kas hipoplazisinin, miyositlerin yağ dokusu ile yer değiştirmesi ve hafif fibrozis ile karakterize olduğu bildirilmiştir. Buzağılarda, karaciğerde lenfositik yangı ile karakterize hepatoselüler dejenerasyon, interstisyel fibrozis, bilier hiperplazi; kuzularda ise multifokal nekrosuppuratif hepatitis tanımlanmıştır (Seehusen ve ark. 2014).

SBV enfeksiyonunun koyun, keçi ve sığır fötuslarında neden olduğu konjenital malformasyonlar, makroskopik patolojik lezyonlar ve histopatolojik bulgular Çizelge 1.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. SBV'nin koyun, keçi ve sığır fütüslerinde neden olduğu makroskobik ve mikroskobik patolojik bulgular (Herder ve ark. 2012, van den Brom ve ark. 2012, Wernike ve ark. 2013b, Bayrou ve ark. 2014, Poskin ve ark. 2014b, Seehusen ve ark. 2014, Peperkamp ve ark. 2015, Laloy ve ark. 2017 kaynaklarından özetlenmiştir)

	Koyun	Keçi	Sığır
Konjenital malformasyonlar	<ul style="list-style-type: none"> • Artrogripozis • Brachignathia inferior • Prognatizm • Tortikollis • Kifozi • Lordozis • Skolyozis 	<ul style="list-style-type: none"> • Artrogripozis • Vertebral deformiteler 	<ul style="list-style-type: none"> • Artrogripozis • Brachignathia inferior • Tortikollis • Kifozi • Lordozis • Skolyozis • Kranial malformasyonlar
Merkezi sinir sistemi patolojik bulguları	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrosefalus • Hidranensefali • Serebellar hipoplazi • Porencefali • Makrosefali • Omurilik hipoplazisi 	<ul style="list-style-type: none"> • Porencefali 	<ul style="list-style-type: none"> • Serebellar hipoplazi • Hidrosefalus • Hidranensefali • Porencefali • Beyin kökü hipoplazisi • Mikromiyeli
Diğer dokulardaki patolojik bulgular	<ul style="list-style-type: none"> • Mumifikasyon • Kardiyak ventriküler septal defekt • Unilateral hidronefrozis • Kolon atrezisi • Mezenteriyel lenf yumrusunda büyüme • Lenf yumrusu ve dalakta lenfoid hücre kaybı • Kas hipoplazisi 	<ul style="list-style-type: none"> • Pulmoner hipoplazi 	<ul style="list-style-type: none"> • Ectopia cordis • Pulmoner hipoplazi • Kardiyak ventriküler septal defekt • Timus ve lenf nodunda lenfoid hücre kaybı • Kas hipoplazisi
Mikroskobik patolojik lezyonlar	<ul style="list-style-type: none"> • Gliozis • Perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu • Nonsuppuratif meningoensefalitis • Neuronofaji • Mikromiyeli • Polioensefalomyelitis • Beyinde mikroensefali, lissensefali, porencefali ilişkili kavitasyonlar • Gri ve beyaz maddedeki lenfohistiyositik 	<ul style="list-style-type: none"> • Gri ve beyaz maddedeki lenfohistiyositik perivasküler infiltrasyon • Beyinde diffüz astrogliozis ve/veya mikrogliozis 	<ul style="list-style-type: none"> • Gliozis • Perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu • Nonsuppuratif meningoensefalitis • Neuronofaji • Mikromiyeli • Polioensefalomyelitis • Gri ve beyaz maddedeki lenfohistiyositik perivasküler infiltrasyon • Beyinde diffüz astrogliozis ve/veya mikrogliozis

	perivasküler infiltrasyon • Beyinde diffüz astroglıozis ve/veya mikroglıozis • Multifokal nekrosuppuratif hepatitis • Kaslarda fibrozis		• Karaciğerde lenfositik hepatoselüler dejenerasyon • İnterstisyel fibrozis • Bilier hiperplazi • Kaslarda fibrozis
--	--	--	--

SBV ile doğal enfekte koyun, keçi ve sığırlarda *in situ* hibridizasyon ile virüsün merkezi sinir sistemi, plasenta, kas, göz, kalp, aort, akciğer, trahea, karaciğer, dalak, ince ve kalın bağırsaklar, mezenterik ve pulmoner lenf nodları, timus, adrenal bez, testis ve uterus dokularındaki dağılımı yapılan bir çalışmada incelenmiştir. SBV genomunun en yoğun saptandığı dokuların beyin, beyincik, medulla oblongata ve omurilikteki nöronlar olduğu bildirilirken, periferel organlarda SBV genomu saptanmadığı belirtilmiştir (Hahn ve ark. 2013). SBV ile doğal enfekte kuzu ve buzağuların incelendiği bir çalışmada da periferel organlarda SBV genomuna rastlanmadığı bildirilmiştir (Seehusen ve ark. 2014). Ancak doğal enfekte buzağularda yapılan bir başka çalışmada, viral RNA hem tüm merkezi sinir sistemi dokularında hem de akciğer ve kolonda saptanmıştır (Bayrou ve ark. 2014).

Enfeksiyöz serum ile yapılan deneysel enfeksiyonda, sığırların beyin, karaciğer ve dalak dokusu; koyunların beyin ve karaciğer dokusu SBV genomu yönünden pozitif olarak belirlenmiştir (koyunlarda dalak örnekleri incelenmemiş) (Endalew ve ark. 2018). Koyunlarda enfeksiyöz serum ve dilüsyonları ile deneysel enfeksiyon yapılan bir çalışmada RNAemi geliştiren koyunların dalak, süperfisiyel servikal lenf yumrusu, mezenterik lenf yumrusu ve bazı hayvanların akciğer dokularında SBV genomu real-time RT-PZR ile gösterilmiştir (Poskin ve ark. 2014b). Bir başka çalışmada ise, SBV ile deneysel enfekte sığırların mezenterik lenf yumrusu, Peyer plakları, mandibular lenf yumrusu ve dalak örnekleri viral RNA yönünden real-time RT-PZR ile pozitif bulunmuştur (Wernike ve ark. 2013a).

SBV ile enfekte olan ve ensefalitis bulgularına sahip hayvanların beyin dokusunun incelendiği bir çalışmada; hayvanların %93,3'ünde SBV antijenine

rastlanırken, ensefalitis bulgularına sahip olmayan hayvanların ise %32,8’inde SBV antijenine rastlanılmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, SBV antijeninin beyin dokusundaki varlığı veya yokluğu, ensefalitis ile direkt olarak ilişkilendirilememiştir (Herder ve ark. 2013).

İntrauterin olarak SBV ile doğal enfekte kuzuların beyin dokuları incelendiğinde mikroensefali, lissensefali, porensenfali ilişkili kavitasyonlar histopatolojik olarak tanımlanmıştır. Gliozis, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu, nonsuppuratif meningoensefalitis, neuronofaji, mikromiyeli, polioensefalomyelitis gibi mikroskobik bulgular kuzularda ve buzağılarda bildirilmiştir. İntrauterin yolla SBV ile doğal enfekte kuzu ve buzağılarda benzer mikroskobik lezyonlar gözlenmesine rağmen, kuzulara ait beyin dokularındaki yangının şiddetinin daha fazla olduğu belirtilmiştir (Peperkamp ve ark. 2015).

SBV ile neonatal dönemde enfekte olan buzağı, oğlak ve kuzuların merkezi sinir sistemindeki en belirgin histopatolojik bulgu gri ve beyaz maddedeki lenfohistiyositik perivasküler infiltrasyon olarak tanımlanmıştır. Her üç tür hayvanın beyin dokusunda diffüz astrogliozis ve/veya mikrogliozis gözlenmiştir (Herder ve ark. 2012). RT-PZR ile SBV pozitif olan neonatal hayvanların ise mezensefalon ile parietal ve temporal loblarında en sık rastlanılan bulgu lenfohistiyositik meningoensefalomyelitis olarak rapor edilmiştir (Herder ve ark. 2013).

Bir çalışmada SBV’nin embriyolu tavuk yumurtasında (ETY) inokulasyonu sonucu oluşturduğu etkiler incelenmiştir. Sarı kesesine inokulasyon yöntemi kullanılarak $10^{6.4}$ TCID₅₀ titredeki SBV ile enfekte edilen 6 ve 8 günlük ETY’lerde embriyonik ölüm oranı 8 günlük embriyolarda %76 iken, 6 günlüklerde %47 olarak bulunmuştur. SBV ile enfekte embriyolarda patolojik olarak bacaklarda bükülme ve dönme, cücelik, artrogripozis, iskelet kası hipoplazisi, ayaklarda kasılma gibi bulgular belirlendiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Daha nadir olarak ise subkutan ödem, vücut renginin kaybolması, tüylerde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Collins ve ark. 2018).

Tip I interferon reseptörü knock-out farelerde (type I interferon receptor knock-out mice; IFNAR^{-/-}) subkutan yolla SBV ile enfeksiyon modeli araştırmacılar

tarafından geliştirilmiştir. Enfeksiyon sonrasında farelerden alınan kan, beyin, akciğer, karaciğer, dalak ve ince bağırsak örnekleri viral genom yönünden real-time PZR ile analiz edildiğinde farelerde viremi geliştiği ve incelenen dokularda viral genom saptandığı rapor edilmiştir. Patolojik olarak ise farelerde ölüm, splenomegali, karaciğerde diffüz renk değişimi ve kanamalar, abdominal kanamalar görüldüğü bildirilmiştir. Histopatolojik lezyonlar arasında şiddetli hepatosellüler dejenerasyon ve nekroz, ince bağırsaklarda kanama belirlenmiştir (Wernike ve ark. 2012b). NIH-Swiss farelerin intraserebral yolla SBV ile enfekte edilmesinin ardından yapılan histopatolojik incelemede, bilateral simetrik vakuol oluşumu, serebral kortekste hemoraji ve malazi (beyin dokusu nekrozu), gri maddede perivasküler lenfosit infiltrasyonu rapor edilmiştir (Varela ve ark. 2013).

IFNAR^{-/-} farelerde subkutan yolla oluşturulan SBV enfeksiyonunda, farelerin 1. günden itibaren zayıfladığı ve enfeksiyondan 6-13 gün sonra tekrar kilo almaya başladığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, SBV enfekte 4-5 haftalık yaşta olan hayvanların hiçbirinde ölüm gözlemlenmemişlerdir. Hayvanlardan alınan akciğer, dalak, beyin ve bağırsak örneklerinin SBV genom yönünden real-time RT-PZR'de pozitif olduğu, karaciğer örneklerinin ise negatif olduğu bildirilmiştir. SBV ile enfekte hayvanların enfeksiyondan sonraki 21. günde nötralizan antikor titreleri 1/120 ile 1/240 arasında belirlenmiştir. *In situ* hibridizasyon ile farelerin beyin, beyincik ve omurilik dokusunda virüs varlığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Tauscher ve ark. 2017).

SBV ile enfekte buzağılarda hematolojik parametrelerde ve akut faz proteinlerinde değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada, SBV enfekte grupta orta büyüklükte lökosit sayısı ve yüzdesinde düşüş, eritrosit sayısında düşüş ve ortalama eritrosit hemoglobininde (MCH, mean corpuscular hemoglobin) artış belirlenmiştir. Akut faz proteinlerinden haptoglobin (Hp), serum amiloid A (SAA) ve I-asit glikoprotein (AGP) düzeyleri incelenmiştir. SBV enfekte olan ve olmayan gruplardaki hayvanlarda Hp, SAA ve AGP düzeylerinde herhangi bir farklılık belirlenmediği rapor edilmiştir (Kęsik-Maliszewska ve ark. 2019).

SBV enfekte koyunlarda nitrik oksit (NO), malondialdehid (MDA), total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) ve katalaz aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, en yüksek NO seviyesi SBV seropozitif hayvanlarda, en düşük TOK seviyesi SBV seronegatif hayvanlarda bulunmuştur. SBV seropozitif ve seronegatif serumların MDA seviyeleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiş ve SBV enfeksiyonunda MDA seviyesinin etkilendiği rapor edilmiştir (Macun ve ark. 2018).

1.1.6. Tanı

SBV enfeksiyonunun tanısı için pek çok moleküler ve serolojik tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler tanı testleri arasında farklı real-time RT-PZR testleri ve *in situ* hibridizasyon tekniği kullanılmakta iken serolojik olarak ELISA, nötralizasyon, plak redüksiyon nötralizasyon ve immunofloresan testleri yaygın olarak uygulanmaktadır. Virüs izolasyonunda ve virüsün çoğaltılmasında ise farklı hücre hatları kullanılmaktadır.

1.1.6.1. Virüs İzolasyonu ve Çoğaltılması

SBV'nin ilk izolasyonu hasta bir ineğin kanından yapılmıştır. Bunun için öncelikle *Culicoides variipennis* larva hücre hattı (KC hücresi) kullanılmış, ardından virüsün BHK-21 hücre hattında (Bebek hamster böbrek hücre hattı) pasajı yapılmıştır (Hoffmann ve ark. 2012). Diğer Orthobunyavirüsler gibi SBV de farklı türlerden köken alan çeşitli hücre hatlarında *in vitro* olarak çoğalabilmektedir. SBV'nin

çoğalabildiği hücre hatları arasında BHK-21, BSR-T7/5 (T7 RNA polimeraz eksprese eden BHK-21 hücre hattı), A549 (Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücre hattı), HuH7 (İnsan karaciğer karsinoma hücre hattı), HeLa, Hep2, MDBK (Madin-Darby sığır böbrek hücre hattı), MDCK (Madin-Darby köpek böbrek hücre hattı), Vero E6, CPT-Tert (Simian virüs 40 T antijeni ve insan telomeraz tersine transkriptazı ile immortalize edilmiş koyun koroid pleksus hücre hattı), BFAE (Sığır fötal arteriyel endotel hücre hattı), 293T, HmLu-1 (Golden hamster akciğer hücre hattı) hücreleri bulunmaktadır (Elliott ve ark. 2013, Varela ve ark. 2013). Bu hücre hatlarında SBV'nin düşük (0,05 MOI) ve yüksek (5 MOI) MOI enfeksiyonları sonrasında plak titrasyonu yapıldığında farklı hücre hatlarında farklı titrede virüs elde edildiği belirlenmiştir. BHK-21 ve HuH7 hücrelerinin düşük MOI enfeksiyonunda SBV'nin en yüksek titresini elde edilirken, yüksek MOI enfeksiyonu sonucunda daha düşük titrede virüs elde edilmiştir. SBV'nin yüksek titrede ürettiği diğer hücre hatları arasında ise Vero E6 ve CPT-Tert hücreleri bulunmaktadır (Elliott ve ark. 2013). Öte yandan SBV'nin plak formasyonu da farklı hücre hatlarında farklı özellik göstermektedir. Örneğin, BHK-21 hücresinde 3 mm çapında belirgin plaklar oluştururken, Vero E6, BSR-T7/5 ve A549 hücrelerinde 1 mm çapında belirgin plaklar oluşturmaktadır. HeLa, Hep2 ve MDBK hücrelerinde ise SBV'nin belirsiz plaklar meydana getirdiği tespit edilmiştir (Elliott ve ark. 2013). SBV'nin çoğaldığı bir diğer hücre hattının da SK-6 hücresi olduğu belirlenmiştir (Hofmann ve ark. 2015).

SBV'nin kontaminant olabileceği biyolojik materyallerin *in vitro* viral biyogüvenlik testleri ile test edilmesi açısından SBV'nin farklı dedektör hücre hatlarında (detector cell lines) oluşturduğu sitopatik etki araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bunun için Vero, MDBK, CHO-K1 (Çin hamster-böbrek), MRC-5 (insan-akciğer), BT (sığır-türbinata), 324K (insan-böbrek), PBEK (primer sığır embriyo-böbrek), FLK (fötal kuzu-böbrek), BHK-21 hücre hatları farklı titrelerdeki SBV ile enfekte edilmiş ve hücrelerdeki sitopatik etki incelenmiştir. Vero hücre hattı SBV için oldukça duyarlı bulunmuş, enfeksiyon sonrasında 1-2 gün içinde hücrelerde sitopatik etki gözlemlendiği bildirilmiştir. Diğer hücre hatlarındaki sitopatik etki ise; BHK-21 hücresinde 2. günde, PBEK hücresinde 5. günde, BT hücresinde 14. günde, FLK hücresinde 7.-11. günlerde ilk kez gözlenmiştir. MDBK hücresinde

ise sitopatik etki hiç gözlenmediği rapor edilmiştir. İnsan kullanımına sunulan ürünlerin test edilmesinde kullanılan dedektör hücre hatlarındaki sitopatik etkiler ise MRC-5 hücresinde 14. günde, 324K hücresinde 5.-6. günlerde, CHO-K1 hücresinde 1. günde ilk kez görülmüştür. Çalışmanın sonucunda SBV'nin hücre hattında üretilmesi ve sitopatik etki gözlenerek tespit edilmesinde en uygun hücrelerin Vero, CHO-K1 ve BHK-21 hücre hatları olduğu belirtilmiştir (Ilchmann ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında da SBV Vero hücre hattında üretildi ve virüsün apoptotik etkisi Vero hücre hattında belirlendi.

Gebe koyunların SBV ile enfekte edilmesi sonrasında alınan serum ve fetal membran (göbek kordonu, plasentom, kotiledonlar arası membran) örneklerinden SBV izolasyonu yapılabildiği bildirilmiştir. Vero hücre hattında örnekler 4 gün inkübasyona bırakılmış ve 2-3 pasaj sonunda virüs izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir (Poskin ve ark. 2017).

1.1.6.2. Moleküler Tanı

SBV'nin moleküler tanısı için alınması gereken klinik örneklerin hangileri olduğunun belirlenmesi için pek çok araştırmacı farklı çalışmalar sürdürmüştür. Bilk ve arkadaşları (2012), konjenital malformasyonlu toplam 17 adet kuzu ve buzağıya ait dalak, beyin, omurilik, kıkırdak, tüylü deriden alınan eksternal plasental sıvı, mideden alınan plasental sıvı, göbek kordonu ve mekonyum örnekleri real-time RT-PZR ile SBV S segmenti yönünden taramıştır. Alınan bu örnekler arasından en iyi sonuçların beyin, omurilik, göbek kordonu ve tüylü deriden alınan dış plasental sıvı örneklerinden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu bağlamda saha şartlarında SBV tanısı için en kolay alınabilecek örnekler arasında göbek kordonu ve tüylü deriden alınan dış plasental sıvı sayılabilir (Bilk ve ark. 2012). Bir başka çalışmada ise 90 kuzu ve 81 buzağıya ait beyin, beyincik, beyin sapı, omurilik, timus, dalak,

mezenterik lenf yumrusu, mekonyum ve torasik sıvı SBV genomu yönünden incelenmiş ve hem kuzu hem de buzağılar için en uygun klinik örneklerin beyin dokusu olduğu bildirilmiştir (De Regge ve ark. 2013).

In situ hibridizasyon (ISH) tekniği SBV tanısında yaygın olarak kullanılmıştır (Hahn ve ark. 2013, Gerhauser ve ark. 2014, Tauscher ve ark. 2017, Pfankuche ve ark. 2018). SBV için digoksigenin (DIG)-işaretle RNA prob ve FISH (fluorescent ISH)-RNA problu *in situ* hibridizasyon teknikleri SBV pozitif keçi beyin dokusu örneklerinde kıyaslandığında her iki testte de pozitiflik yakalanabildiği belirlenmiştir. Kullanılan problemler arasında en iyi sonuçların sırasıyla anti-sense prob, FISH-RNA prob karışımı ve sense prob ile elde edildiği bildirilmiştir (Pfankuche ve ark. 2018).

SBV ve diğer Simbu serogrup virüslerinin tanısında kullanılmak üzere L segmenti temelli “pan-Simbu” real-time RT-PZR geliştirilmiştir. Pan-Simbu real-time RT-PZR testi ile SBV’nin yanı sıra Aino virüs, Akabane virüs, Douglas virüs, Oropouche virüs, Peaton virüs, Sabo virüs, Sango virüs, Sathuperi virüs, Shamonda virüs, Shuni virüs, Simbu virüs, Thimiri virüs, Tinaroo virüs tanısı da yapılabildiği bildirilmiştir (Fischer ve ark. 2013b). SBV, Aino virüs ve Akabane virüsün S segmenti belirlenmesine dayalı problu multipleks real-time RT-PZR testi de bir başka çalışmada geliştirilmiştir (Lee ve ark. 2015).

SBV tanısında yüksek hızlı (high-speed) real-time RT-PZR, loop mediated isothermal amplification (LAMP), recombinase polymerase amplification (RPA) testleri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu üç test arasında spesifitesi ve sensitivitesi en yüksek olan test LAMP olarak bildirilmiştir (Aebischer ve ark. 2014).

Avrupa’daki 13 farklı ülkedeki laboratuvarlar tarafından farklı klinik örnekler Bilk ve arkadaşları (2012) tarafından geliştirilen real-time RT-PZR testi ile analiz edilmiştir. Laboratuvarlarda aynı klinik örnekler farklı RNA izolasyon metotları ve aynı real-time RT-PZR testi kullanılarak analiz edildiğinde, bu metodun tam kan, serum, lenf yumrusu, organ homojenatı için %100 sensitiviteye ve %95,8 spesifiteye sahip olduğu belirlenmiştir. İncelenen semen örneklerinde ise testin etkinliğinin RNA izolasyon metoduna göre farklılık gösterdiği ve TRIzol™ ile izolasyon

metodunun testin sensitivite ve spesifitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Schulz ve ark. 2015b).

Simbu serogrup spesifik “universal real-time RT-PZR” testi S segmenti belirlenmesine dayalı olarak geliştirilmiştir. Bu testin; Akabane virüs, Peaton virüs, Douglas virüs, Aino virüs, Sathuperi virüs, Sabo virüs, Simbu virüs, Sango virüs, Shamonda virüs, Tinaroo virüs, Shuni virüs ve SBV tanısında kullanılabileceği rapor edilmiştir (Golender ve ark. 2018).

Ülkemizde SBV tanısında kullanılmak üzere hem S hem de M genine spesifik real-time PZR geliştirilmiştir. Azkur ve arkadaşları (2018) tarafından SYBR Green ve probu olarak geliştirilen real-time PZR testleri hem plasmid standartları ile hem de SBV pozitif saha örnekleri ile başarılı şekilde çalışmaktadır (Azkur ve ark. 2018).

Yapılan bir çalışmada, SBV sekansları arasındaki farklılığın, hayvan türüne göre değil örneğin köken aldığı dokuya göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Viremik sığır ve koyunlardan alınan kan örneğindeki SBV sekanslarının genetik farklılık göstermediği, fetal doku kökenli SBV sekanslarının ise oldukça fazla oranda sekans çeşitliliği gösterdiği bildirilmiştir (Wernike ve Beer 2019).

1.1.6.3. Serolojik Tanı

SBV için geliştirilen ve piyasaya sürülmüş olan ticari indirekt ELISA kitleri arasında ID Screen® Schmallerberg virus Indirect Multi-species (ID.Vet, Fransa), IDEXX Schmallerberg Ab Test (IDEXX, ABD) ve SVANOVIR® SBV-Ab (Svanova, İsveç) bulunmaktadır. Yarışmalı ELISA formatındaki ticari kit ise ID Screen® Schmallerberg virus Competition Multi-species (ID.Vet, Fransa)'dir.

SBV'nin serolojik tanısı için serum, plasma, süt gibi numuneler kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre ticari ELISA kiti (Svanovir SBV-Ab, Svanova, İsveç) ile süt örneklerinin incelenmesi, serum örneklerinin incelenmesine göre daha iyi sonuç vermektedir. Altın standart test olan virüs nötralizasyon testi ile kıyaslandığında, pozitif prediktif değer süt ELISA için %98 iken serum ELISA için %94 olarak; negatif prediktif değer ise süt ELISA için %100, serum ELISA için %50 olarak hesaplandığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar, ELISA için serum örneğinin kullanılmasının yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç verme olasılığı daha yüksek olduğunu iddia etmiştir (Daly ve ark. 2015).

SBV serolojik tanısı için virüs nötralizasyon testi ile ELISA testlerinin kıyaslaması, Avrupa'daki 7 farklı ülkedeki (Hollanda, Almanya, Fransa, İngiltere, Danimarka, İsveç, Belçika) 8 farklı laboratuvar tarafından aynı örneklerin bağımsız olarak test edilmesi ile yapılmıştır. SBV özgül antikor pozitif ve negatif koyun ve sığır serumları, sözkonusu laboratuvarlarda ayrı ayrı virüs nötralizasyon testi ve ticari ve/veya in-house ELISA kullanılarak analiz edilmiştir. Virüs nötralizasyon testi sonuçlarının laboratuvarlar arasında %100 uyumluluk gösterdiği bildirilmiştir. ELISA sonuçları ise laboratuvarlar arasında yüksek oranda uyumluluk gösterse de şüpheli reaksiyonların pozitif olarak kabul edilmesi durumunda ELISA ile virüs nötralizasyon testlerinin arasında yüksek uyumluluk olacağı belirtilmiştir (van der Poel ve ark. 2014b).

Tam virüs partikülü temelli indirekt in-house ELISA testleri iki farklı araştırma grubu tarafından geliştirilmiştir (van der Heijden ve ark. 2013, Näslund ve ark. 2014). van der Heijden ve arkadaşlarının (2013) geliştirdiği testin virüs nötralizasyon testine göre sensitivitesi %98,8 olarak hesaplanmıştır (van der Heijden ve ark. 2013). Diğer çalışmada ise, virüs nötralizasyon testi ile kıyaslandığında geliştirilen ELISA testinin spesifitesinin %100 sensitivitesinin %99,19 olduğu bildirilmiştir (Näslund ve ark. 2014).

SBV tanısında kullanılmak üzere farklı virüs nötralizasyon testleri geliştirilmiştir. Bunlardan birisi, Vero hücresi kullanılarak 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinde yapılan ve değerlendirilmesinde amido siyah (amido black) boyası

kullanılarak makroskobik olarak sitopatik etkiyi değerlendirmeye dayalı olan virüs nötralizasyon testidir. Bu testin hem sığır hem koyun örnekleri için yüksek spesifiteye ve sensitiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Loeffen ve ark. 2012). SBV için geliştirilen bir diğer virüs nötralizasyon testi ise plak redüksiyon nötralizasyon testidir. Bu testin yapılmasından önce plak titrasyon ile virüsün titresini belirlenmektedir. Ardından virüs-serum dilüsyonu karışımları 12 kuyucuklu hücre kültür pleytindeki Vero hücrelerine inokule edilip karboksimetil selüloz overlay ile 6 gün inkübasyon sonrasında kristal viyole ile plaklar görünür hale getirilmektedir (Mansfield ve ark. 2013).

Rekombinant SBV nükleoproteini *E. coli*'de açıklatılıp ticari indirekt ELISA kitinde (ID.Vet, Fransa) antijen olarak kullanılarak optimize edilmiştir. Geliştirilen nükleoprotein temelli ELISA virüs nötralizasyon testi ile kıyaslandığında aralarında %98,9 oranında uyumluluk olduğu bildirilmiştir (Bréard ve ark. 2013). Rekombinant SBV nükleoproteini ayrıca *Saccharomyces cerevisiae*'da da açıklatılmış ve ELISA'da antijen olarak kullanılmıştır. Bu ELISA testi, yine nükleoprotein temelli olan ticari indirekt ELISA kiti (ID.Vet, Fransa) ile kıyaslandığında sensitivitesi %95, spesifitesi %93 olarak bulunmuştur (Lazutka ve ark. 2014).

SBV enfeksiyonunun ELISA ile teşhisinde süt ve tükürük numunelerinin de kullanılabilceği ELISA çeşitleri araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Geliştirilen ELISA testlerinin sonuçları ticari ELISA kiti (ID.Vet, Fransa) ile kıyaslandığında, süt IgG ELISA testinin sensitivitesi %94, tükürük IgG ELISA testinin sensitivitesi %85 ve tükürük IgA ELISA testinin sensitivitesi %98 olarak bulunmuştur (Lazutka ve ark. 2015). Bu bakımdan tükürük örneğinin de SBV enfeksiyonu teşhisinde gönderilebileceği bilgisi paylaşılmıştır.

SBV için immunofloresan testi BHK-21 (Bréard ve ark. 2013), Vero E6 (Endalew ve ark. 2018) ve Vero (Zhang ve ark. 2017) hücreleri kullanılarak geliştirilmiştir. İmmunofloresan testi pek çok araştırmacı tarafından da kullanılmıştır (Wernike ve ark. 2013a, Kraatz ve ark. 2015, Zhang ve ark. 2015, Wernike ve ark. 2015).

SBV nükleoproteinine karşı pek çok araştırmacı tarafından monoklonal antikorlar üretilmiştir (Zhang ve ark. 2013, Lazutka ve ark. 2014). Bu antikorların üretiminde antijen olarak kullanılan SBV nükleoproteini, *Saccharomyces cerevisiae*'da (Lazutka ve ark. 2014) veya *E.coli*'de (Zhang ve ark. 2013) açıklatılmıştır. SBV nükleoproteini haricinde pan-Simbu monoklonal antikoru (Simbu serogrubundaki virüsler için), pan-SBV monoklonal antikoru (farklı SBV izolatlarının tamamı için) ve SBV izolat-özgül monoklonal antikorları da araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir (Wernike ve ark. 2015).

SBV nükleoproteini üreten stabil BHK-21 hücre hattı rekombinant lentivirüs vektör sistemi kullanılarak oluşturulmuş ve bu hücre hattının immunofloresan testlerde, hücrelerden elde edilen nükleoprotein de ELISA ve western blotlamada kullanılabileceği araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2015). Benzer şekilde SBV nükleoproteini üreten stabil Vero hücre hattı da üretilmiş ve bu hücreler hem monoklonal hem de poliklonal anti-SBV serumları ile immunofloresan testinde başarıyla kullanılabilmifitir (Zhang ve ark. 2017). Bu hücre hatlarının, rekombinant SBV nükleoproteini üretiminde sürdürülebilir sistemler olarak kullanılabileceği araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür.

Bir çalışmada, SBV enfeksiyonunun sürüdeki düşük seroprevalans ve yüksek prevalans senaryolarındaki örneklem sayıları koyun popülasyonu için teorik olarak hesaplanıp, nötralizasyon testi, ID.Vet ELISA ve IDEXX ELISA kitlerinin farklı seroprevalanslardaki performansları kıyaslanmıştır. Bu çalışmaya göre; düşük seroprevalansa sahip popülasyonlarda nötralizasyon testi ve ID.Vet ELISA'nın sürüdeki enfeksiyonu teşhiste başarılı olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre IDEXX ELISA ise sadece yüksek seroprevalansa sahip popülasyonlarda teşhiste başarılı olduğu ortaya konulmuştur. Nötralizasyon testi ile tanı için seroprevalans %1 iken 155 hayvandan, %5 iken 51 hayvandan ve %10 iken 27 hayvandan örnekleme yapılmasına ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir. Toplanması gereken örnek sayısı ID.Vet ELISA için; seroprevalans %1 iken 163 hayvan, %5 iken 54 hayvan ve %10 iken 28 hayvan olarak rapor edilmiştir. IDEXX ELISA kitinin ise düşük seroprevalans senaryolarından %1 ve %5'te sürüdeki seropozitifliği belirleyemediği,

%10 seroprevalansta seropozitifliđi belirleyebilmesi için ise 85 hayvanın örneklenmesine ihtiyaç duyulduđu bildirilmiştir (Pejaković ve ark. 2018).

1.1.7. Koruma ve Kontrol

SBV enfeksiyonundan korunmada kullanılmak üzere pek çok aşı tipi geliştirilmiştir. SBV salgınından kısa bir süre sonra Wernike ve ark. (2013c), inaktif SBV aşı prototipi geliştirmişlerdir. Saponin ve alüminyum hidroksit adjuvantlı bu aşı prototiplerinin geliştirilmesinde, farklı hücre hatları, farklı virüs titreleri ve farklı inaktivasyon protokolleri kullanılmıştır. Hazırlanan prototip SBV aşuları koyunlara ve sığırlara 3 hafta ara ile 2 defa subkutan yolla uygulanmış ve ikinci aşılamadan 3 hafta sonra vahşi SBV ile hayvanlarda enfeksiyon (challenge) yapılmıştır. Aşı prototiplerinin hayvanlarda SBV özgül antikor yanıtı oluşturduğu ve viremiyi engellediği belirlenmiştir. Aşılanmayan kontrol grubu hayvanlardan farklı olarak aşılanan hayvanlarda, viral RNA lenfoid organlarda saptanmadığı bildirilmiştir (Wernike ve ark. 2013c).

Wernike ve arkadaşları (2013c) tarafından hazırlanan bu inaktif SBV aşısı, ticari olarak iki farklı firma tarafından piyasaya sunulmuştur. Bu ticari aşılarından biri MSD Animal Health firmasının ürettiği Bovilis SBV, diğeri ise Zoetis firmasının ürettiği Zulvac SBV aşılarıdır. İngiltere ve Fransa'da onay alarak ticari olarak piyasaya sürülmüş ve Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı önerilmiştir (Anonim 2012e, Anonim 2013b, Anonim 2017). Ülkemizde ise henüz ticari SBV aşısı kullanımı mevcut değildir.

Bir başka aşı çalışmasında ise, Wernike ve ark. (2013c) çalışmasında tanımlanan bir aşı prototipi olan MA-HT koyunlara subkutan yolla tek doz (2 ml) olarak uygulanmış ve hayvanlara challenge yapılmıştır. Aşılanan hayvanların hiçbirisinde viral RNA saptanamamış ve tüm aşılı hayvanlar SBV özgül antikor

yanıtı geliştirmiştir. Böylece inaktif SBV aşısının, koyunlarda tek sefer uygulanması ile korunma sağladığı belirlenmiştir (Hechinger ve ark. 2014). Ancak yapılan güncel bir çalışmanın sonuçlarına göre, kolara tek doz uygulanan ticari SBV aşısının (Bovilis SBV) hayvanlarda 12 aydan daha kısa süre (8 ay kadar) antikor yanıtı sağlamaktadır. Çalışmayı yapan araştırmacılar bu sonuçlar göz önüne alındığında tek doz aşi uygulamanın bağışıklık sağlamada yetersiz kaldığını bildirmişlerdir (Jones ve ark. 2019).

SBV'nin de içinde bulunduğu Simbu serogrubunun yeleri olan Akabane virüs ve Aino virüs ile Chuzan virüsünü (Reoviridae) içeren trivalent inaktif ticari aşının (Bovine Abnormal Parturition Trivalent Vaccine, Nisseiken Co. Ltd, Japonya) SBV enfeksiyonuna karşı koruma sağlayıp sağlamadığı da araştırılmıştır. Söz konusu trivalent aşi ile aşılanan hayvanlarda SBV zgl antikor yanıtı gelişmediği ve SBV ile subkutan yolla challenge sonrasında hayvanlarda RNAemi oluştuğu belirlenmiştir. Bu nedenlerle Akabane virüs, Aino virüs ve Chuzan virüsünü içeren trivalent inaktif aşının, SBV enfeksiyonundan korunmada etkin olmadığı bildirilmiştir (Hechinger ve ark. 2013).

İnaktif aşi geliştirilmesinin yanı sıra SBV için güvenli bir canlı aşi geliştirilme çalışmaları da srdrlmştir. SBV yapısal olmayan proteinlerini kodlayan NSs ve NSm gen delesyonları yapılarak canlı aşi prototipleri geliştirilmiştir. Bunun için NSs silinmiş, NSm silinmiş ve NSs ile NSm silinmiş aşi prototipleri oluşturulmuş ve bunlar öncelikle IFNAR^{-/-} farelerde ardından da sığırlarda test edilmiştir. Sadece NSm silinmiş virüs, vahşi tip enfeksiyona benzer şekilde hayvanlarda hem viremiye neden olmuş hem de serolojik yanıt oluşturmuştur. Sadece NSs silinmiş ve NSs ile NSm silinmiş virüsler ise hayvanlarda viremiye ve klinik bulgulara neden olmamıştır. En etkin korumanın ise NSs ile NSm silinmiş virüs ile aşılamada elde edildiği bildirilmiştir (Kraatz ve ark. 2015).

SBV için DNA aşısı geliştirilmesi için de çalışmalar yapılmıştır. SBV tam N proteini (233 aa), ubikuitinize N proteini, Gn proteini ve 2 farklı Gc proteini (Gc-ecto1 ve Gc-ecto2) kodlayan bölgeleri kapsayan farklı DNA aşıları geliştirilmiş ve bunlar IFNAR^{-/-} farelerde test edilmiştir. Tüm DNA aşıları farelere ikişer hafta ara ile

toplam 3 doz olarak kas içi yolla uygulanmış ve hayvanlardaki serolojik yanıt ile challenge sonrası viremi durumları araştırılmıştır. Aşılama sonrasında, tam N proteini ve ubikuitinize N proteini aşısı ile immünize edilen fare grupları SBV özgül antikor yanıtı en yüksek olan gruplar olarak belirlenmiştir. Challenge sonrasında ise tüm aşı gruplarında viremiye rastlanılmış ancak tam N proteini ve Gc-ecto1 aşıları uygulanan farelerde düşük düzeyde ($1,7-2,8 \times 10^3$ kopya/ml) viremi belirlenmiştir. Deney sonrasında fare dalaklarından yapılan T hücre proliferasyon deneyi sonucuna göre Gc-ecto1 aşısı grubunda %45 oranında, tam N proteini aşısı grubunda ise %6,5 oranında CD8⁺ hücrelerde artış saptanmıştır. Çalışma sonucunda, SBV için DNA aşısı olarak tam N proteini ve Gc-ecto1 aşılarının kullanılabilirliği önerilmiştir (Boshra ve ark. 2017).

SBV zarf proteini olan Gc proteini kullanılarak subunit aşı da geliştirilmiştir. Bu aşı, SBV ve Akabane virüsün Gc proteinlerinin amino uçlarının kovalent olarak birleştirilmesi ve HEK-293T hücrelerinde eksprese edilmesi ile oluşturulmuştur. Hem SBV hem de Akabane virüsün Gc proteinlerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuş olan bu subunit aşının, IFNAR^{-/-} farelerde ve sığırlarda tam bir korunma sağladığı ve herhangi bir klinik bulguya da neden olmadığı rapor edilmiştir (Wernike ve ark. 2017). Geliştirilen bu subunit aşı sayesinde, N protein özgül antikorları saptayan ticari ELISA kitleri kullanılarak enfekte ve aşıları hayvanların ayırt edilebilmesini sağlayan DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) stratejisinin SBV için uygulanması da mümkün gözükmektedir. DIVA stratejisinin uygulanmasına olanak sağlayabileceği düşünülen bir diğer SBV aşısı da rekombinant vektör aşılardır. SBV Gc proteininin amino ucunu taşıyan rekombinant vektör aşılar at herpesvirüs-1 (Equine herpesvirus type 1; EHV-1) ve Modifiye Vaccinia virüs Ankara (MVA) temelli olarak geliştirilmiş ve her iki vektör aşı sığırlarda test edilmiştir. Rekombinant EHV-1 aşısı ile aşılanan hayvanların bir kısmında viremiye rastlandığı ve bazı hayvanlarda SBV özgül antikor yanıtı oluşmadığı bildirilmiştir. Buna karşın, rekombinant MVA aşısı ile aşılanan hiçbir hayvanda viremi oluşmadığı ve tümünde yüksek titrede SBV özgül antikor yanıtı geliştiği gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda, MVA ile oluşturulan SBV rekombinant vektör aşısının başarı ile kullanılabilirliği ve bu aşı sayesinde uygulanabilecek olan DIVA stratejisi ile SBV enfeksiyonlarında koruma ve kontrol çalışmalarının sürdürülebileceği

öngörülmektedir (Wernike ve ark. 2018b). Bir başka aşı çalışmasında ise baculovirus ekspresyon sistemi kullanılarak SBV Gc ve/veya Gn glikoproteinlerini içeren subunit SBV aşıları geliştirilmiştir. DIVA stratejisine uygun olarak geliştirilen bu aşılar, hayvanlarda yüksek antikor titresi oluşturamamış ve hayvanlarda RNAemiye neden olmuştur. Bu nedenle geliştirilen bu aşılar ile başarılı sonuç elde edilememiştir (Endalew ve ark. 2019).



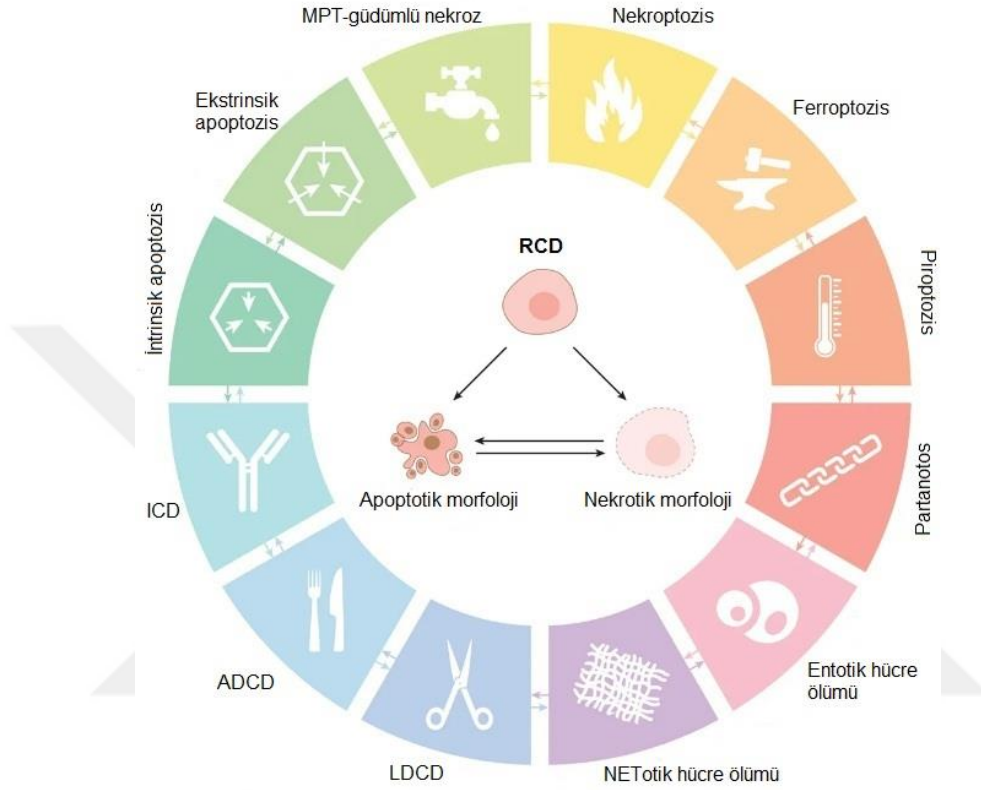
1.2. Apoptozis

Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death; NCCD), hücre ölümünün morfolojik, biyokimyasal ve işlevsel bakımdan tanımlanması ve yorumlanmasını sağlamaktadır. Bilimsel ilerlemelerle birlikte artış gösteren hücre ölümü tipleri ve sayısı, Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi'nce belirlenmekte ve bilim insanları ile paylaşılmaktadır.

Çok hücreli canlılarda hücre çoğalması ve hücre ölümü dengesi, sağlıklı hücre sayısının biyolojik limitler arasında kalması için çok önemlidir. Hücre ölümü ile canlılarda, hücre sayısının kontrol altında tutulmasının yanı sıra enfekte, yaşlı, mutasyona uğramış, toksik maddelere maruz kalmış hücreler de yok edilmektedir (Alberts ve ark. 2008, Saikumar ve Venkatachalam 2009, Chandar ve Viselli 2012). Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi'ne göre hücre ölümü, “sonunda hayati hücre fonksiyonların geri dönüşümsüz dejenerasyonu (özellikle ATP üretimi ve redoks homeostazının korunması) ve hücre bütünlüğünün kaybı (kalıcı plazma zarı geçirgenliği veya hücre parçalanma)” olarak tanımlanmıştır. Düzenlenmiş hücre ölümü (Regulated cell death; RCD) ise, bir veya birden fazla sinyal iletim sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanan ve bu nedenle farmakolojik veya genetik olarak ayarlanabilen hücre ölümü türü olarak tanımlanmakta ve pek çok hücre ölüm tipini altında barındırmaktadır. Güncel bilimsel gelişmeler ve yeni hücre yolaklarının keşfi ile bu hücre ölüm tiplerinin yanında pek çok yeni hücre ölümü de tanımlanmıştır (Galluzi ve ark. 2018). Bu hücre ölüm tipleri, Şekil 1.4'te gösterilmiş ve Çizelge 1.4'te kısaca açıklanmıştır. Bu tez çalışmasında, Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi tarafından tanımlanan bu hücre ölüm tiplerinden ekstrinsik apoptozis ve intrinsik apoptozis SBV ile enfekte Vero hücrelerinde araştırılmıştır.

Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi tarafından 2018 yılında paylaşılan güncellenmiş bilgilere göre ölü hücrelerin ve bu hücrelerin parçalarının bertaraf edildiği mekanizmalar göz önüne alındığında temel olarak hücre ölümü 3 tip olarak

incelenmektedir: i) Tip I hücre ölümü veya apoptozis, ii) Tip II hücre ölümü veya otofaji, iii) Tip III hücre ölümü veya nekroz (Galluzi ve ark. 2018).



Şekil 1.4. Temel hücre ölümü tipleri. RCD: Regulated cell death (Düzenlenmiş hücre ölümü), ADCD: autophagy-dependent cell death (Otofaji-bağımlı hücre ölümü), ICD: Immunogenic cell death (İmmunojenik hücre ölümü), LDCD: Lysosome-dependent cell death (Lizozom-bağımlı hücre ölümü), MPT: Mitochondrial permeability transition (Mitokondriyal permeabilite geçişi) (Galluzi ve ark. 2018).

Çizelge 1.4. Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi (NCCD) tarafından tanımlanan hücre ölümü tipleri ve genel özellikleri (Galluzi ve ark. 2018).

Hücre ölüm tipi	Özelliği
Entotik hücre ölümü	Aktomiyozin-bağımlı hücrenin bir başka hücreye internalize olması (entozis) ile başlayan ve lizozomlar tarafından yürütülen bir RCD türüdür.
Ekstrinsik apoptozis	Plazma membran reseptörleri tarafından hücre dışı çevredeki faktörlerin tanınması ile başlayan, kaspaz-8 ile yayılan ve özellikle kaspaz-3 gibi efektör kaspazlarla sonlandırılan özel bir RCD türüdür.
Ferroptozis	Glutasyon peroksidaz 4 (GPX4) tarafından yapısal kontrol altında olan ve demir şelatörleri ve lipofilik antioksidanlar tarafından inhibe edilebilen hücre içi mikro-ortamın oksidatif bozulmaları ile başlatılan bir RCD formudur.
İmmunojenik hücre ölümü (ICD)	İmmunokompetan konaklarda adaptif bir immün yanıtı aktive etmek için yeterli olan bir RCD formu.
İntrinsik apoptozis	Hücre dışı veya hücre içi mikro ortamın bozulmaları ile başlatılan, mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP) ile sınırlandırılmış ve özellikle kaspaz-3 gibi efektör kaspazlarla sonlandırılan RCD türüdür.
Lizozom-bağımlı hücre ölümü (LDCD)	Lizozomal membran permeabilizasyonu ile karakterize olan ve katepsinler ile sonlandırılan (bazen de MOMP ve kaspazların dahil olduğu) RCD tipidir.
Mitokondriyal permeabilite geçişi (MPT)-güdümlü nekroz	Hücre içi mikro-ortamın bozulmaları ile başlatılan ve siklofilin D'ye bağlı olan spesifik RCD formu.
Nekroptozis	MLKL (Mixed lineage kinase domain like pseudokinase), RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) ve bazı durumlarda RIPK1'in (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) kinaz aktivitesine bağlı olan, hücre içi veya hücre dışı homeostaz dengesizlikleri ile tetiklenen bir RCD formudur.
NETotik hücre ölümü	Hematopoietik hücrelerle sınırlı olan ve nötrofil hücre dışı tuzak (NET; Neutrophil extracellular trap) ekstrüzyonu ile ilişkili olan reaktif oksijen türlerine bağımlı bir RCD.
Otofaji-bağımlı hücre ölümü (ADCD)	Otofajik mekanizma ve bunların bileşenlerine mekanik biçimde bağlı olan RCD türüdür.
Partanatos	Poli-ADP riboz polimeraz 1 (PARP1) hiperaktivasyonu ile başlatılan, apoptozis indükleyici faktöre (AIF) ve göç engelleyici faktöre (MIF) bağımlı DNA bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan biyoenerjetik yıkım tarafından sonlandırılan bir RCD türüdür.
Piroptozis	Gasdermin protein ailesinin üyeleri tarafından plazma membranında porlar oluşmasına bağlı olan ve sıklıkla yangısal kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan bir RCD türüdür.

Apoptozis, hücrelerin yangı oluşturmadan gerçekleştirdiği, özel bir takım yolaklara ve morfolojik değişiklikler ile karakterize, metabolik özellikleri olan ve genetik olarak kodlanan bir çeşit programlı hücre ölümüdür (Alberts ve ark. 2008, Saikumar ve Venkatachalam 2009, Chandar ve Viselli 2012). Apoptozis terimi ilk olarak John F. Kerr, Andrew H. Wyllie ve Robert Currie tarafından 1972’de tanımlanmış ve bu araştırmacılar, hücre ölümü sırasında hücrelerde büzüşme, kromatin yoğunlaşması, kromatin fragmentasyonu, membran tomurcuklanması, apoptotik cisimciklerin oluşması gibi morfolojik değişimleri gözlemleyerek “apoptozis” terimini bilimsel literatüre kazandırmışlardır (Kerr ve ark. 1972). Apoptozis, sitoplazmik büzülme, kromatin yoğunlaşması (piknoz), çekirdek parçalanması (karyoreksis), plazma zarı tomurcuklanması, fagositik aktiviteye sahip komşu hücreler tarafından verimli bir şekilde alınan ve lizozomlar içinde parçalanan, görünüşte bozulmamış küçük veziküllerin (apoptotik cisimcikler) oluşumu ile karakterizedir (Galluzi ve ark. 2018).

1.2.1. Fizyolojik Apoptozis

Apoptozis, canlılarda pek çok fizyolojik olayda etkili olan bir mekanizmadır. Fizyolojik apoptozis canlılarda hem embriyonik hayatta hem de embriyonik dönemin sonrasında (postembriyonik dönem) oldukça önemli etkilere sahiptir.

Embriyonik gelişimde hücre bölünmesi oldukça artmaktadır. Bu hücre çoğalmasının kontrol altında tutulması ve embriyonik gelişimin normal olarak devam etmesi için hücrelerde apoptozis etkili olmaktadır. Hem embriyonik hem de embriyo dışındaki hücrelerde (plesanta, zarlar gibi) şekillenen apoptozis sayesinde embriyonik dönem sağlıklı şekilde sürmektedir. Embriyonik yaşamda apoptozisin etkili olduğu bir diğer olgu, el ve ayak parmaklarının arasında bulunan perdelerin

ortadan kaldırılmasıdır (Chandar ve Visselli 2012). Fötal membranlarda (amniyotik epitelde, korionik trofoblast hücrelerinde), fötal nöral tüp oluşumunda, fazla çoğalan nöron ve oligodendrositlerin eliminasyonunda ve embriyonik ürogenital kanalların (Wolffian ve Müller kanalları) şekillenmesinde, böcek ve amfibilerdeki metamorfoz gibi erken gelişim safhalarında da apoptozis şekillenmektedir (Brill ve ark. 1999, Wu ve ark. 2001).

Postembriyonik dönemde ise, immün sistem hücrelerinin regülasyonunda, T hücre seleksiyonunda, hormona bağımlı endometrium, meme gibi dokulardaki involüsyonda, korpus luteum involüsyonunda, menstrual siklusta, kastrasyon sonrasında prostat dokusunda, yara iyileşmesinde, yangısal hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve granülasyon dokusunun yara dokusuna dönüşmesinde apoptozis etkilidir (Tizard 2009, Chandar ve Visselli 2012, Marti ve ark. 1999, Harada ve ark. 2004, Elmore 2007, Kumar ve ark. 2012).

1.2.2. Patolojik Apoptozis

Vücutta oluşan bazı hasar ve enfeksiyonların sonucunda hücreler apoptozise uğramaktadırlar. Ayrıca apoptozis, kanser hücrelerinin yok edilmesinde de rol oynayan mekanizmalardan birisidir. Hücre ölümü regülasyonu kanser, otoimmün lenfoproliferatif sendrom, iskemi, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer gibi) ve bazı enfeksiyon durumlarında bozulur ve hücrelerin aşırı proliferasyonu söz konusu olur. Özellikle kanser gibi hücrelerde aşırı proliferasyon olan durumlarda bu hücrelerin apoptozis ile yok edilmesinde T hücreleri ve NK hücreleri de apoptozise aracılık ederler (Wu ve ark. 2001).

Radyasyon, sitotoksik kemoterapötik ilaçlar, uç değerlerdeki ısılar ve hipoksi gibi pek çok faktör, hücrede apoptozisin başlamasını tetikleyebilir. Bu gibi durumlarda hücrelerde DNA hasarına şekillendiğinde bu hücreler apoptozis yoluyla

yok edilirler (Elmore 2007). Hücrelerde şekillenen hatalı protein katlanmaları da apoptozisin uyarılmasına neden olur. Bu proteinlerin endoplazmik retikulumda birikmeleri sonucu gelişen endoplazmik retikulum stresi sonucunda hücrede apoptozis tetiklenir (Kumar ve ark. 2012). Böbrek, pankreas, parotit bezi gibi parenkimal organlardaki kanalların çeşitli nedenlerle tıkanması sonucu oluşan patolojik atrofide, kortikosteroidler gibi bazı hormonlar ile staurosporin, dimetilsülfoksit ve nitrik oksit gibi bazı kimyasallar hücrede apoptozisin başlamasını tetiklemektedir (Blanco ve ark. 1995, Belmokhtar ve ark. 2001, Elmore 2007, Thaler ve ark. 2012).

1.2.3. Apoptoziste Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Apoptozisin başlamasıyla hücrelerde mikroskopik olarak da gözlenebilen bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler arasında sitoplazmada büzülme, hücrenin çevresiyle bağlantılarının kopması, hücre membranında tomurcuklanma ve kromatinde yoğunlaşma (piknoz) bulunmaktadır. Yoğunlaşan kromatin endonükleazlar ile önce yaklaşık 100 kilobazlık parçalara sonra 50 kilobazlık ve en sonunda yaklaşık 200 bazçifti uzunluğunda fragmentlere ayrılır ve bu parçalanma karyoreksis olarak tanımlanır (Wu ve ark. 2001, Chaabane ve ark. 2013, Marino ve ark. 2014). Karyoreksiste DNA, nükleozom birleşme yerlerinden koparak parçalanmakta ve meydana gelen bu DNA parçaları jel elektroforezde karakteristik basamak (ladder) görüntüsü oluşturmaktadır (Alberts ve ark. 2008). *In vivo* ve *in vitro* olarak meydana gelen apoptozis sonrasında oluşan bu DNA fragmentasyonu, agar jel elektroforez tekniği ile belirgin şekilde gözlenebilmektedir (McIlroy ve ark. 2000). Apoptozis sırasında organellerin kümelenmesi ve endoplazmik retikulumdan köken alan vakuoller elektron mikroskopisiyle gözlenebilmekte ve sitoplazmadaki tipik kabarcıkları oluşturmaktadır (Anderson 1997). Piknoz ve karyoreksis sonrasında, içinde organeller, sitoplazma ve bir kısmında DNA fragmentleri bulunan,

etrafı plazma membranıyla çevrili halde olan apoptotik cisimcikler hücre membranında tomurcuklanma ile birlikte hücreden ayrılmaktadır (Marino ve ark. 2014).

Hücre membranında fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol, fosfatidilkolin, sfingomiyelin gibi fosfolipidler yer almaktadır (Chandar ve Viselli 2012). Sağlıklı bir hücrede fosfatidilserin hücre membranının iç tabakasında konumlanmaktadır. Apoptotik hücrede, bir flippaz ailesi üyesi olan “aminofosfolipit translokaz” ile flippaz aktivitesine sahip olan “ATP11C” molekülleri kaspazlar tarafından parçalanarak fosfatidilserinleri hücre membranının iç tabakasında tutma aktivitelerini kaybetmektedir. Hücrelerde bulunan “phospholipid scramblase” enzimleri, hücre membranındaki fosfolipitlerin iç ve dış katman arasında yer değiştirme özelliğine sahiptir. Apoptotik hücrelerde “phospholipid scramblase” enzimleri kalsiyum ve kaspaz bağımlı olarak fosfatidilserin moleküllerinin yer değiştirmesinden sorumludur. Apoptozis ile hücredeki flippazların aktivitelerinin kaybolması ve “phospholipid scramblase” aktivitesi nedenleriyle, apoptozis sırasında fosfatidilserinler iç tabakadan dış tabakaya doğru yer değiştirmektedir (Bratton ve ark. 1997, Segawa ve Nagata 2015). Hücrenin dış yüzeyinde konumlanan fosfatidilserinler fagositik hücrelerce tanınarak apoptozis sonucunda oluşan apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesini sağlamaktadır. Apoptotik cisimciklerin fagositozu (efferocytosis=efferositoz) sayesinde apoptotik hücreden sitoplazmik içerikler dışarı çıkmamakta ve bu sayede yangı oluşmamaktadır (Fadok ve ark. 1992, Wu ve ark. 2001, Park ve Kim 2019).

1.2.4. Apoptoziste Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptozis sırasında hücrede oluşan morfolojik değişimlerin yanı sıra bir takım biyokimyasal olay da gerçekleşir. Bu biyokimyasal değişimler arasında,

mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu, kaspazların aktivasyonu, hücredeki pek çok makromolekölü parçalayan katabolik hidrolazların aktivasyonu sayılabilir (Marino ve ark. 2014).

1.2.4.1. Kaspazlar

Kaspazlar ilk defa, *Caenorhabditis elegans* isimli nematodda yapılan çalışmalarla tanımlanmış olan (Ellis ve Horvitz 1986) proteaz ailesidir. Bu proteazların isimlendirilmesinde sistein (cysteine) ve aspartik asit (aspartic acid) bölgesine spesifik proteaz (protease) özellikleri baz alınmış ve bu nedenle “kaspaz (caspase)” olarak isimlendirilmişlerdir (Alnemri ve ark. 1996).

Kaspazlar, apoptozis yollarında önemli etkiye sahip olan sistein proteazlarıdır. Tüm kaspazlar zimojen (inaktif enzim prekürsörü) olarak sentezlenirler ve bu formları “prokaspaz” olarak isimlendirilirler. Prokaspazlar proteolitik kesim sonrasında aktif formlarına dönüşürler ve bu aktif formlarına kaspaz ismi verilir (Schulze-Osthoff ve ark. 1998, Wickremasinghe ve Hoffbrand 1999).

Kaspazlar yapısal olarak üç alana sahiptir: (i) amino ucunda çeşitli uzunluktaki prodomain, (ii) yaklaşık 20 kDa ağırlığında büyük alt ünite (p20), (iii) karboksil ucunda yer alan yaklaşık 10 kDa ağırlığında küçük alt ünite (p10) (Thornberry ve Lazebnik 1998). Bu alanlardan prodomain, kaspazların sınıflandırılmasında önem arz etmektedir.

Günümüze kadar toplam 23 kaspaz tanımlanmıştır (Connolly ve ark. 2014, Julien ve Wells 2017, Spead ve ark. 2018). Bunlardan kaspaz-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12 ve -14 insanlarda bulunmuştur. İnsanlardaki kaspaz-4'ün homologu olan kaspaz-11 farelerde, kaspaz-13 ise sığırlarda tanımlanmıştır (Ghavami ve ark.

2009). Kaspaz-15 domuz, köpek ve sığırlarda bulunurken insan ve farelerde saptanmamıştır (Eckhart ve ark. 2005). Kaspaz-16 keseli ve plasentalı memelilerde; kaspaz-17 balık, kurbağa, tavuk, kertenkele, ornitorenklerde; kaspaz-18 tavuk, ornitorenk ve opossumlarda tanımlanmıştır (Eckhart ve ark. 2008). Kaspaz-19, -20, -21, -22 ve -23 ise zebra balıklarında karakterize edilmiştir (Spead ve ark. 2018).

Kaspazların biyolojik aktiviteleri yalnızca apoptozis ile sınırlı değildir. Kaspazlar hücrel sinyal iletimi, hücre çoğalması, göçü, farklılaşması ve yangı gibi pek çok biyolojik olayda da fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonlarına göre kaspazlar apoptotik ve yangısal olmak üzere iki gruba ayrılır. Apoptotik kaspazlar (kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) hücre ölümünde etkili iken, yangısal kaspazlar ise (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) yangı süresince sitokin olgunlaşmasında görevlidir. Ancak bu sınıflandırmadaki yangısal kaspazların aktivasyonun da apoptozisi uyarabilmesi nedeniyle bu sınıflandırma kaspazların aktiviteleri için yetersiz kalmış ve kaspazlar ayrıca prodomain uzunluklarına göre de sınıflandırılmıştır (Li ve Yuan 2008, Connolly ve ark. 2014, McArthur ve Kile 2018).

Kaspazlar yaygın olarak, N-ucundaki uzantıları olan prodomain uzunlukları ve apoptotik sinyal yolağındaki yerlerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre kaspazlar; **başlatıcı kaspazlar** (kaspaz-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) ve **efektör kaspazlar** (kaspaz-3, -6, -7) olarak ikiye ayrılmaktadır. Başlatıcı kaspazlar uzun prodomaine sahiptir. Bunlar, ölüm efektör alanı (death effector domain, DED) ve kaspaz güçlendirme alanından (caspase recruitment domain, CARD) birini içerir ve yolağın ilk basamaklarında etkilidirler. Efektör kaspazlar ise kısa prodomaine sahiptir. Bunlar apoptozisin son basamaklarında özellikle hücrel substratların parçalanmasında etkilidir (Li ve Yuan 2008, Shalini ve ark. 2015, McArthur ve Kile 2018). Bu tez çalışmasında SBV ile enfekte Vero hücrelerinde, başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8 ve -9 aktivasyonu ile efektör kaspazlardan kaspaz-3 aktivasyonu incelendi.

1.2.5. Apoptozis Yolakları

Apoptozisin başlamasında temel olarak iki yolak vardır:

1. Dış (Ekstrinsik, ölüm reseptör) yolak
2. İç (İntrinsik, mitokondriyal) yolak (Marino ve ark. 2014, McArthur ve Kile 2018)

1.2.5.1. Dış Yolak

Dış yolak ile apoptozisin başlaması, hücrenin transmembran reseptörlerine ilgili ligandların bağlanması ile gelişmektedir. Dış yolak aktivasyonunda tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) süper ailesinin üyesi olan ölüm reseptörleri etkilidir (Chaabane ve ark. 2013, McArthur ve Kile 2018). Bazı hücrelerin yüzeylerinde, sistein aminoasitinden zengin ekstraselüler ve “ölüm alanı” olarak tanımlanan intraselüler bölgelere sahip olan ölüm reseptörleri mevcuttur. Ölüm reseptörlerinin ölüm alanları, hücre ölümünün başlatılması için gerekli olan, yaklaşık 50-80 aminoasitten oluşan sinyal iletim dizilimi içerirler (Zhou ve ark. 2017). Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine ilgili ligandlarının bağlanması ile ölüm alanlarında trimerizasyon şekillenir ve adaptör moleküllerin uyarılmasıyla kaspazların aktivasyonu tetiklenir (Rubinstein ve Kimchi 2012).

Dış yolak ile apoptozisin başlamasında etkili olan temel reseptörler şunlardır: Fas (Apo-1, CD95, DR2), TNFR1 (p55, CD120a, DR1), DR3 (Apo-3, TNFRSF25, TRAMP, LARD), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2, TRICK, KILLER) ve DR6. Ölüm reseptörlerinin apoptozisteki etkisinde önemli role sahip olan ve sinyal dönüştürülmesinde görevli adaptör proteinler bulunmaktadır. Ölüm alanlarına sahip

olan başlıca adaptör proteinler; Fas-ilişkili ölüm alanı (Fas-associated death domain, FADD), reseptör etkileşimli protein (receptor-interacting protein, RIP) ve tümör nekrozis faktör reseptör-1 ilişkili ölüm alanı proteini (Tumor necrosis factor receptor-1-associated death domain protein, TRADD)'dir (Schulze-Osthoff ve ark. 1998, Guicciardi ve Gores 2009). Dış yolakta hücreye iletilen sinyaller sonucunda prokaspaz-8 aktive olur ve aktif kaspaz-8 efektör kaspazları aktive eder. Efektör kaspazların aktivasyonu sonucunda hücre apoptozise uğrar (Ashkenazi ve Dixit 1998, Mahmood ve Shukla 2010). Bu tez çalışmasında SBV ile enfekte Vero hücrelerinde apoptozisin dış yolak ile aktivasyonunun incelenmesi için kaspaz-8 aktivasyonu analiz edildi.

1.2.5.2. İç Yolak

Reseptöre bağlı olmayan ve mitokondri bazlı olarak gelişen iç yolakta hücre içi sinyaller etkilidir. İç yolak, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikallerin varlığı, stres varlığı veya büyüme faktörleri, hormon ve sitokinlerin hücreye ulaşmaması gibi pek çok hücrel stres sinyalleri ile aktive olur (Elmore 2007, Tait ve Green 2010).

Apoptozisin iç yolakla başlamasında, mitokondrial dış membran permeabilizasyonu (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) en önemli basamaktır. MOMP sonucu pro-apoptotik proteinler önce mitokondrial intermembran aralığına oradan da sitoplazmaya geçer (Tait ve Green 2010). Bu pro-apoptotik proteinler temel olarak iki gruba ayrılır:

- i) Birinci grupta sitokrom c, ikinci mitokondri-türevli kaspaz aktivatörü (second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC/DIABLO) ve serin proteazı olan yüksek ısı gereksinimli protein (High-temperature requirement HtrA/OMI) bulunur.

- ii) İkinci grupta ise apoptozis indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G ve kaspaz aktive DNAaz (CAD) vardır. Birinci gruptaki proteinler kaspaz bağımlı mitokondrial yolağı aktive ederlerken, ikinci grup proteinler ise hücre ölümünün geç olaylarında etkilidir (Elmore 2007).

1.2.5.2.1. Mitokondrial Dış Membran Permeabilizasyon (MOMP) Aktivasyonu

Hücreye ulaşan apoptozis sinyali sonrasında gelişen mitokondrial dış membran permeabilizasyonu (MOMP), B hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ailesindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki ilişkiler ile regüle edilen önemli bir basamaktır. MOMP sonrasında mitokondrideki sitokrom-c, SMAC, AIF gibi pro-apoptotik proteinler sitoplazmaya geçer ve hücrede apoptozisin gelişmesine neden olur (Tait ve Green 2010).

1.2.5.2.1.1. Bcl-2 Ailesi Proteinleri

B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) geni, B hücre kökenli insan foliküler lenfomasında etkili bir onkogendir ve bu genin apoptozisi engelleyici (anti-apoptotik) aktivitesinin olduğunun keşfinden sonra Bcl-2 benzeri pek çok protein izole edilmiştir. Sayısı artan bu proteinlerin sınıflandırılmasında, sekans benzerlikleri ve Bcl-2'ye bağlanma özellikleri baz alınmıştır. Bcl-2 ailesi “pro-apoptotik” ve “anti-apoptotik” proteinler olarak ikiye ayrılmaktadır. Hücre ölümünü engelleyen proteinler “anti-apoptotik”, hücrenin ölümünü tetikleyenler ise “pro-apoptotik” olarak tanımlanmaktadır. Bcl-2 ailesi proteinleri, birbirleri arasındaki etkileşimleri sağlayan Bcl-2 homoloji (BH)

alanlarına sahiptir ve toplam dört BH alanı bulunmaktadır: BH1, BH2, BH3 ve BH4 (Tsujimoto 1998, Wickremasinghe ve Hoffbrand 1999).

Bcl-2 ailesi proteinleri fonksiyonlarına göre 2 alt aileye ayrılmaktadır ve bu alt aileler Çizelge 1.5'te gösterilmiştir:

1. Anti-apoptotik fonksiyonlu proteinler alt ailesi: **Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W** gibi proteinleri kapsayan ve dört BH alanına da sahip olan alt ailedir.
2. Pro-apoptotik fonksiyonlu proteinler alt ailesi:
 - i. Efektör proteinler: Bunlar BH1, BH2 ve BH3 alanlarına sahiptir. **Bax** (Bcl-2 ilişkili X protein) ve **Bak** (Bcl-2 antagonist/öldürücü) proteinlerini kapsar.
 - ii. Yalnız BH3 içeren proteinler: Sadece BH3 alanına sahip olan **Bad** (Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti), **Bid** (BH3 etkileşimli-alan ölüm agonisti), **Bik** (Bcl-2 etkileşimli öldürücü), **Noxa, Puma** (p53 upregüle apoptozis modülatörü), **Bim** (Bcl-2 etkileşimli hücre ölüm aracı) 'den oluşur (Chipuk ve ark. 2010).

Çizelge 1.5. Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik bazı proteinler (Brunelle ve Letai 2009, Gross ve Katz 2017)

Pro-apoptotik	Anti-apoptotik
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-XL
Bad	Bcl-W
Bid	Bfl-1
Bik	Mcl-1
Bok	Boo/DIVA/NR-13/Bcl-B
Bim	
Noxa	
Puma	
Hrk	
Bmf	
BNIP3	

Bcl-2 ailesindeki anti- ve pro-apoptotik proteinler arasında çeşitli etkileşimler ile hücre ölümü dengede tutulmaktadır. Sağlıklı hücrelerde Bad proteini, protein kinaz B tarafından fosforile edilmektedir ve bu formu sitoplazmada bulunmaktadır. Bad proteini, çeşitli etmenler (kalsiyum varlığı, interlökin 3 yokluğu gibi) nedeniyle fosforile olmaz veya defosforile olursa, mitokondride yer alan ve normal koşullarda bağlanmadığı Bcl-2 ve Bcl-XL kompleksine bağlanmaktadır. Hücre ölümüne engel olan Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik proteinlerine Bad proteininin bağlanması ise MOMP ile sonuçlanmakta ve hücrede iç yolak üzerinden apoptozis tetiklenmektedir (Elmore 2007).

Sağlıklı hücrelerde sitoplazmada bulunan Bax proteini, apoptotik sinyal sonrasında homodimer oluşturarak mitokondriye transloke olmaktadır (Gross ve ark. 1998). Bax proteini mitokondride Bcl-XL ile kompleks oluşturarak buradaki voltaj-bağımlı anyon kanallarının (VDAC) açılmasını indüklemektedir (Shi ve ark. 2003). Apoptotik sinyal sonrasında Bax ve Bak proteinleri ise mitokondri üzerinde bir araya gelerek mitokondriyal apoptozis-indükleyici kanal (MAC) oluşumuna neden olmaktadır. MAC oluşumu ise MOMP ile sonuçlanır ve hücrede apoptozis başlar (Dejean ve ark. 2006).

Diğer Bcl-2 ailesi proteinlerinden olan Bid aktivasyonu, bu proteinin kaspaz-8 tarafından kesilmesiyle gerçekleşirken (Luo ve ark. 1998), Puma ve Noxa ise, p53 geninin artışı ile aktive olmaktadır (Nakano ve Vousden 2001, Oda ve ark. 2000).

Bu tez çalışmasında SBV ile enfekte Vero hücrelerinde Bcl-2 ailesi proteinlerinin gen ekspresyonları analiz edildi. Pro-apoptotik proteinlerden Bak, Bax ve Puma'nın, anti-apoptotik proteinlerden ise Bcl-2 ve Bcl-XL'nin gen ekspresyonları real-time PZR ile incelendi.

1.2.5.2.2. Mitokondrial Dış Membran Permeabilizasyonu (MOMP) Sonrası Biyokimyasal Değişimler

Sitokrom c, mitokondride elektron transportunda görevli olan ve mitokondrinin iç ile dış membranı arasında yer alan bir proteindir (Alberts ve ark. 2008). İç yolağın aktivasyonunu takiben mitokondri dış membran bütünlüğü bozulur ve bunun sonucunda sitokrom-c ve diğer mitokondrial proteinler sitoplazmaya geçer (Kale ve ark. 2012). Sitoplazmaya geçen sitokrom c, burada bulunan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanmasının ardından Apaf-1'de konformasyonel değişim sonrası oligomerizasyon şekillenir ve bu yapı "apoptozom" olarak isimlendirilir. Apaf-1 amino ucunda, bazı kaspazlarda bulunan CARD homologu diziyeye, orta bölgesinde ced-4 benzeri diziyeye, karboksil ucunda ise WD (W: triptofan, D: aspartik asit) tekrar bölgesine sahiptir. Apaf-1'de meydana gelen konformasyonel değişim sonucunda bu proteinin yapısında bulunan ve kaspaz aktivasyon bölgesi olarak görev yapan alan (ced-4 benzeri dizi) açığa çıkar. Apoptozomun kaspaz aktivasyon bölgesine prokaspaz-9 bağlanır ve kaspaz-9 aktive olmuş olur. Kaspaz-9 ise, efektör kaspazlar olan kaspaz-3 ve -7'yi aktive ederek hücrede apoptozisi başlatır (Wickremasinghe ve Hoffbrand 1999, Tait ve Green 2010).

Mitokondriden sitokrom c haricinde sitoplazmaya çıkan diğer proteinler arasında SMAC ve HtrA vardır. Bu proteinler ise apoptotik hücre ölümünü engelleyen bir protein olan X-bağlı apoptozis protein inhibitörünü (XIAP) bloke ederek hücrede apoptozisin oluşmasını tetiklerler (Tait ve Green 2010).

Mitokondrinin iç ve dış membranları arasında, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G de yer almaktadır. Bunlardan AIF, mitokondri parçalanmasını takiben önce sitoplazmaya sonra da çekirdeğe geçer. AIF, DNA'yı yaklaşık 50-300 kilobazlık parçalara ayırır ve periferal nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olan proteindir. Mitokondriden çekirdeğe gelen bir diğer protein olan endonükleaz G de kromatini parçalara ayırır. Endonükleaz G,

apoptoziste meydana gelen DNA fragmentasyonundan sorumlu proteinlerden biridir. AIF ve endonükleaz G, kaspazdan bağımsız olarak görev yapar. Mitokondriden köken alan CAD ise, CAD inhibitörünün (ICAD) kaspaz-3 ile kesilmesiyle aktive olur. CAD çekirdeğe giderek oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur (Elmore 2007).

1.2.5.3. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Apoptozisin genetik kontrolünde Bcl-2 ailesi genleri etkilidir. Ancak bu aileye üye proteinlerin haricinde bazı önemli genler de apoptozisin gelişmesinde etkili olmaktadır. Bu genlerin başlıcaları arasında *p53*, retinoblastoma geni (*Rb*), hücrel myelositomatozis onkogen (*c-MYC*) yer almaktadır.

p53 geni, başlıca DNA hasarı, hipoksi, onkogenlerin aşırı ekspresyonu, hücrel yaşlanma ve apoptozis gibi olaylarda aktive olan bir tümör supresör genidir. Genin kodladığı protein olan *p53*, DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanabilen transkripsiyon faktörüdür. *p53*-aracılı apoptozis, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin transkripsiyon kontrolünü sağlamasıyla ilişkilidir. *p53*'ün kontrol ettiği pro-apoptotik Bcl-2 genleri arasında *Bax* (Miyashita ve Reed 1995), *Puma* (Nakano ve Vousden 2001), *Noxa* (Oda ve ark. 2000) ve *Bid* (Sax ve ark. 2002) genleri bulunmaktadır. Bu genlerin promotor bölgelerine bağlanan *p53* proteini, bu genlerin transkripsiyonu başlatır ve hücredeki proapoptotik-antiapoptotik protein oranının değişmesine neden olur. Hücrede proapoptotik proteinlerin artmasıyla apoptozis başlar. *p53*, apoptoziste etkili olan başka proteinlerin de ekspresyonunu artırmaktadır. Bunlar arasında Apaf-1, kaspaz-6 ve ölüm reseptörlerinden Fas ile DR5 bulunmaktadır (Fridman ve Lowe 2003).

Rb proteininin apoptozise olan etkisi farklılık göstermektedir. *Rb* antiapoptotik etkisi ilk olarak, *Rb* geninde mutasyon oluşturulan farelerde gelişen

apoptozis ile belirlenmiştir (Jacks ve ark. 1992). Antiapoptotik etkisinin yanı sıra Rb proteini, kaspazlar için bir substrattır ve kaspazlar tarafından parçalanması sonucu iki üniteye (p68 ve p48) bölünmektedir. Rb'nin fosforilasyonunun da hücrede apoptozisi indükleyebileceği bildirilmiştir (Fan ve ark. 1996, Knudsen ve ark. 1999, Fan ve Steer 1999).

c-MYC proteini hücrenin çoğalması ve farklılaşmasında olduğu gibi apoptoziste de etkilidir. c-MYC'nin hücrede aşırı ekspresyonu hücrenin apoptozise duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Apoptozisin gelişmesindeki etkisi p53 bağımlı veya bağımsız olarak gerçekleşebilir (Hoffman ve Liebermann 2008).

1.2.5.4. Apoptozisin Belirlenmesi

Apoptotik hücrelerde oluşan biyokimyasal ve morfolojik değişimler sayesinde apoptozisin belirlenmesi kolaylaşmaktadır (Marino ve ark. 2014). Apoptozisin belirlenmesi için kullanılan bazı biyomarkırlar bulunmaktadır. Bu biyomarkırlar apoptozisin çeşitli basamaklarında etkili olan moleküllerden veya bu moleküllerin aktivasyonu sonucunda meydana gelen apoptotik hücresel değişimlerden oluşmaktadır (Ward ve ark. 2008). Hücre veya dokulardaki apoptozisin incelenmesi için farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında; immünohistokimya, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling), western blotlama, ELISA, spektrofotometre, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu), floresan mikroskopisi, elektron mikroskopisi, agar jel elektroforez ve akan hücre ölçer (flow sitometri) bulunmaktadır.

1.2.5.4.1. Mitokondrial Değişiklikler

Apoptoziste meydana gelen mitokondrial permeabilizasyon sonucunda sitokrom c, SMAC/Diablo ve Bcl-2 ailesinin üyeleri gibi pek çok protein mitokondriden sitoplazmaya geçmektedir. Bu proteinlerin vestern blot ve real-time PZR ile belirlenmesi ile hücrelerde gelişen apoptozis tanımlanabilmektedir (Gu ve ark. 2011, Rodrigues ve ark. 2012). Apoptozis sırasında oluşan MOMP belirlenmesi için akan hücre ölçer analizi, floresan mikroskopi, ELISA, elektron mikroskopisi gibi teknikler kullanılmaktadır (Galluzzi ve ark. 2007).

1.2.5.4.2. Sitoplazmik Değişiklikler

Apoptozis sırasında hücre sitoplazmasında meydana gelen en önemli değişim kaspaz aktivasyonudur. Apoptozisin belirlenmesinde aktif kaspazların tespit edilmesi en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Kaspaz aktivasyonu, proteaz aktivasyon kitleriyle florometrik veya kolorimetrik olarak belirlenebilmektedir. Florometrik kitlerin değerlendirmesinde floresan ölçümü kullanılırken, kolorimetrik kitlerin değerlendirilmesinde spektrofotometre ile optik dansite ölçümü yapılmaktadır. Kaspaz aktivasyonu, incelenecek kaspaza spesifik antikorlar kullanılarak vestern blot, immunohistokimya veya akan hücre ölçer gibi yöntemlerle de belirlenebilmektedir (Wlodkowic ve ark. 2012, Barry ve ark. 2014).

1.2.5.4.3. Hücre Membran Değişiklikleri

Apoptotik hücrelerin membranlarında konum değiştiren fosfatidilserinlerin belirlenmesi apoptozisin tanımlanması için en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı protein olan annexin süper-ailesinde yer alan annexin V'in fosfatidilserine yüksek affinite duyması ve bağlanması özelliğinden faydalanılarak hücrelerde apoptozis tanımlanabilmektedir. Bunun için floresan (çoğunlukla FITC) işaretli annexin V kullanılarak apoptotik hücreler akan hücre ölçe veya floresan mikroskop ile incelenebilmektedir (Suzuki ve ark. 1997, Ding ve ark. 2005, Wlodkowic ve ark. 2009, Lan ve ark. 2013).

Floresan bir molekül olan ve nükleik asitlerdeki guanin ve sitozin nükleotit çiftine bağlanan propidium iodyd (PI) de apoptotik hücrelerin boyanmasında sıkça kullanılan bir boyadır (Suzuki ve ark. 1997). İşaretli annexin V ile PI boyasının birlikte kullanılması hücrelerdeki apoptozisin belirlenmesinde oldukça yaygın tercih edilen bir yöntemdir. Apoptotik hücrelerde Annexin V hücre yüzeyinde yer alan fosfatidilserinlere bağlanırken, PI ise DNA'ya bağlanır. Akan hücre ölçerde annexin V ve PI negatif hücreler sağlıklı iken, nekrotik hücreler annexin negatif PI pozitif olarak görülmektedir. Apoptotik hücreler ise, erken dönemde (erken apoptotik) annexin V pozitif PI negatif, geç dönemde ise (geç apoptotik) annexin V ve PI pozitif olarak yorumlanmaktadır (Vermees ve ark. 1995, Wlodkowic ve ark. 2009).

1.2.5.4.4. DNA Değişiklikleri

Apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonu şekillenmektedir. Bu DNA parçaları jel elektroforezle gözlenebilmekte ve jelde tipik basamak (ladder) görüntüsü meydana gelmektedir (Scrochi ve ark. 2017, Metz ve ark. 2019). DNA fragmentasyonu, PI

gibi floresan boyalarla işaretlenerek de incelenebilmektedir (Wlodkowic ve ark. 2012).

DNA fragmentasyonunu belirlemek için kullanılan bir diğer yöntem de terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP çentik uç etiketlemedir (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; TUNEL). Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, deoksinükleotitleri DNA'nın 3'-hidroksil ucuna bağlama özelliğine sahiptir. TUNEL yöntemi, TdT enziminin floresan maddeler ile işaretli dUTP ile DNA parçalarının 3'-hidroksil ucunu etiketlenmesi esasına dayanır. TUNEL yönteminde dUTP, FITC gibi floresan boyalarla işaretlenmesinin yanı sıra biotin, digoksinin, bromodeoksiüridin (BrdU) gibi farklı moleküllerle de işaretlenebilmektedir (Majtnerová ve Roušar 2018). TUNEL yöntemi kullanılarak hücrelerdeki apoptozis akan hücre ölçer veya floresan mikroskopisinde değerlendirilebilmektedir (Darzynkiewicz ve ark. 2008, Brzozowska ve ark. 2018).

DNA fragmentasyonu belirlenmesi için floresan mikroskop kullanılarak değerlendirilen 4',6'-diamidino-2-fenilindol (4',6'-diamidino-2-phenylindole; DAPI) veya Hoechst 33258, 33342, 34580 boyamaları da yapılabilmektedir. DAPI ve Hoechst 33258 boyaları çift iplikli DNA'daki küçük çentiklerdeki A-T baz çiftine bağlanmaktadır (Eriksson ve ark. 1993, Majtnerová ve Roušar 2018).

DNA replikasyonu, hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi olaylarda DNA tamirinde görev alan poli ADP riboz polimeraz (PARP) 116 kDa ağırlığında bir proteindir. Hücrede şekillenen apoptozis sonucunda aktive olan kaspazlar PARP parçalanmasına neden olur. PARP parçalanma bölgesi-spesifik antikor konjugatları kullanılarak akan hücre ölçer, western blot, immünohistokimya gibi yöntemlerle PARP bölünmesi tespit edilebilmektedir (Gu ve ark. 2011).

1.3. Virüsler ve Apoptozis

Virüslerin kodladıkları proteinler ve mikroRNA (miRNA) gibi bazı moleküller, enfekte ettikleri hücrelerdeki apoptoziste rol oynayan hücresel moleküllerle etkileşime girerek apoptozisi engellemekte veya tetiklemektedir. Ayrıca, bir virüse ait bazı genler apoptozisi engellerken bazı genleri ise apoptozisi tetikleyebilmektedir (O'Brien 1998, Gartner ve ark. 2008, Zhang ve ark 2019).

1.3.1. Apoptozisi Engelleyen Virüsler

Virüsler enfekte ettikleri hücrenin erken ölümünü engellemek, yeni virüslerin oluşmasını sağlamak veya persiste enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak için hücrede apoptozisi bloke ederler (O'Brien 1998, Galluzzi ve ark. 2008). Replikasyon süreleri daha uzun olan bazı virüsler için replikasyon tamamlanmadan veya maksimum yavru virüsler oluşturulmadan önce enfekte hücrelerin apoptozise uğraması zararlı bir mekanizmadır. Bu nedenle bazı virüsler, apoptozisle sonuçlanacak yolları çeşitli mekanizmalarla etkileyerek apoptozisi engellerler. Apoptozis inhibisyonu için virüsler genel olarak bazı mekanizmaları kullanırlar:

- i. Kaspaz aktivitesinin bloke edilmesi,
- ii. Ölüm reseptörlerinin (Fas, TNFR gibi) açıklanmasının, aktivasyonunun ve sinyalizasyonunun engellenmesi,
- iii. Virüsler tarafından anti-apoptotik protein homologlarının kodlanması,
- iv. Pro-apoptotik p53 proteinine etki eden viral proteinler üretilmesi (MacLachlan ve Dubovi 2011).

Apoptozisi engelleyen bazı virüsler arasında *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Poxviridae*, *Flaviviridae*, *Arenaviridae* ailelerindeki virüsler yer almaktadır.

Gamma irradyasyon, büyüme hormonu eksikliği, glukokortikoid, dekzametozon, staurosporin, siklosporin A gibi farklı yöntemler kullanılarak apoptozisin indüklendiği hücre hatlarında, adenovirüslerin E1B-19K proteininin Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu proteinin, Bcl-2 gibi mitokondri üzerinde konumlanarak Bax ile Bak proteinlerine bağlanmakta olduğu ve bu proteinlerin oligomerizasyonunu engellediği bulunmuştur. Böylece Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşturamamakta ve MOMP engellenerek hücrede apoptozis inhibe edilmektedir (White ve ark. 1992, Huang ve ark. 1997). Adenovirüslerin E1B-55K proteininin ise hücredeki tümör supresor gen olan p53 proteinine bağlandığı ve apoptozis için gerekli genlerin transkripsiyonunu durdurarak apoptozisi engellediği bildirilmiştir (Yew ve ark. 1994).

Herpesvirüsler apoptozisi engelleyen pek çok protein kodlamaktadır. Bunlardan viral FLIP (vFLIP; viral FLICE-inhibitory proteins), adaptör protein olan FADD ile etkileşen iki tane ölüm efektör alanına sahiptir. vFLIP, FADD ile bağlanarak FADD-kaspaz-8 bağlanmasını engeller. Böylece kaspaz-8 aktive olamadığı için apoptozis engellenmiş olur (O'Brien 1998). Sığır herpesvirüs tip 1'in (BHV-1) UL14 proteininin, MDBK hücre hattında sorbitol ile oluşturulan apoptozisi engellediği bildirilmiştir (De Martino ve ark. 2007). Sığır herpesvirüs tip 5 (BHV-5) US3 proteini, staurosporinle apoptozis oluşturulmuş domuz testis hücresi ve Vero hücre kültüründe apoptozisi engellediği belirlenmiştir (Ladelfa ve ark. 2011). Domuz herpesvirüs-1 US3 proteininin de, domuz böbrek hücresi, MDBK, Vero, hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında oluşturulan apoptozisi baskıladığı ELISA, western blotlama, TUNEL ve akan hücre ölçer ile gösterilmiştir (Chang ve ark. 2013). Herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1) ICP27, Us3, gJ, gD, LAT gibi pek çok anti-apoptotik protein kodlamaktadır. Bunlardan Us3 proteini serin/treonin proteaz aktivitesine sahiptir ve pro-apoptotik bir protein olan Bad'ın aktivasyonunu engelleyerek ve kaspaz-3'ü inhibe ederek apoptozisi engellemektedir (Jones 2013). Kaposi sarkoma virüsü (insan herpesvirüs-8) vFLIP, vBcl-2 ve vIAP proteinleri ve

miRNA'ları ile hücrelerde apoptozisi inhibe etmektedir (Rezaee ve ark. 2006, Tolani ve ark. 2014, Liu ve ark. 2017).

İnsan papillomavirüsü tip-16'nın E5 proteininin insan keratinosit hücre hattında dış yolağı inhibe ederek apoptozisi engellediği (Kabsch ve Alonso 2002), E6 proteininin ise hücrede p53 proteininin (Shamanna ve ark. 2013) ve Bak proteininin (Underbrink ve ark. 2008) parçalanmasına (degradation) yol açarak apoptozisi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Sığır poksvirüsünün *crmA* geniyle transfekte hücrelerde apoptozisin baskılandığı rapor edilmiştir (Tewari ve Dixit 1995). Keçi poksvirüsünün *I35* geni de HeLa hücrelerinde apoptozisi inhibe etmektedir (Zhang ve ark. 2018). Vaccinia virüsünün F1L proteini mitokondriye yerleşmekte ve burada Bak proteinine bağlanarak Bak-Bax kompleksinin oluşumunu engellemektedir (Wasilenko ve ark. 2005). İlâveten, F1L proteininin kaspaz-9 inhibitörü gibi davranarak apoptozisi engellediği bulunmuştur (Zhai ve ark. 2010).

Bunyavirales takımına ait bazı virüsler de apoptozisi inhibe etmektedir. Hantaan virüs (HTNV), enfekte ettiği insan göbek kordon venası primer endotelial hücrelerinde (HUVEC; primary human umbilical vein endothelial cells) TRAIL üretimini arttırmakta ve enfekte ettiği hücrelerde kaspaz-8'i inhibe ederek TRAIL- aracılı apoptozisin başlamasını engellemektedir. Apoptozisin engellenmesini, enfekte hücrelerde DR5 reseptörlerinin ekspresyonunu ve yüzeyde sergilenmesini azaltarak sağlamaktadır (Solà-Riera ve ark. 2019a). Farklı Orthohantavirüslerle yapılan bir başka çalışmada ise staurosporin ile apoptozis indüklenmiş olan HUVEC hücrelerinde, HTNV, Andes virüs (ANDV), Puumala virüs (PUUV), Seoul virüs, Prospect Hill virüs ve Tula virüsün apoptozisi engellediği belirlenmiştir. Bu 6 farklı Orthohantavirüs üyelerinin N proteinini kaspaz-3 ve granzim B için substrat olarak kullandığı saptanmıştır (Solà-Riera ve ark. 2019b). RVFV NSm proteininin hücrelerde apoptozisi engellediği belirlenmiş (Won ve ark. 2007) ve NSm proteininin C-ucunun mitokondri dış membranına bağlanarak burada anti-apoptotik etkisini gösterdiği ortaya konulmuştur (Terasaki ve ark. 2013). Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) virüsü ile oldukça yakın patolojiye sahip olan fakat insanlarda enfeksiyon

oluşturmayan Hazara virüsün (HAZV) N proteini ile transfekte edilmiş SW13 (insan adrenal korteks adenokarsinoma) hücre hattında, hem HAZV enfeksiyonu hem de influenza A virüs enfeksiyonu ile indüklenen apoptozisin inhibe edildiği belirlenmiştir (Matsumoto ve ark. 2019). HAZV ile enfekte edilen kene HAE/CTVM9 (*Hyalomma anatolicum anatolicum*) hücre hattında da apoptozisin inhibe edildiği belirlenmiştir (Fuller ve ark. 2019). KKKA virüsünün SW13 hücrelerindeki enfeksiyonun erken evrelerinde kaspaz-3 ve -9 aktivasyonunu bloke ettiği, PARP parçalanmasını ve sitokrom c salınımını engellediği ve böylece hücrelerde apoptozisi inhibe ettiği bulunmuştur (Karlberg ve ark. 2015).

1.3.2. Apoptozisi Tetikleyen Virüsler

Viral enfeksiyonlarda replikasyon sonrasında hücrede artan virüs sayısı ile apoptozis indüklenebilmektedir. Bu sayede yangısal olaylar gelişmeksizin komşu hücrelere virüsün yayılması sağlanmaktadır. Litik enfeksiyon oluşumunda da virüslerin enfekte hücrelerde apoptozisi başlatması önemlidir (O'Brien 1998).

Keçi mononükleer hücre hattında küçük ruminant vebası virüsü ile oluşturulan enfeksiyon sonrasında hücrelerdeki apoptotik değişimler elektron mikroskopisi, DNA fragmentasyonu, Hoechst boyama ile incelenmiş ve virüsün *in vitro* olarak keçi lenfositlerinde apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Mondal ve ark. 2001). Distemper virüsü ile MDCK (Pillet ve von Messling 2009) ve Vero (Kajita ve ark. 2006) hücre hattında oluşturulan enfeksiyonda hücrelerde apoptozis şekillendiği bildirilmiştir.

Köpek koronavirüsü ile enfekte edilen köpek fibrosarkoma hücre hattında (A-72) kaspaz aktivasyonu, PARP parçalanması ve mitokondriden sitokrom c salınması ile apoptozis uyarıldığı bildirilmiştir (De Martino ve ark. 2010). Kanatlı infeksiyöz bronşitis virüsünün Vero hücrelerinde kaspaz-bağımlı yolak ile apoptozisi

indüklediği (Liu ve ark. 2001), at koronavirüsünün ise MDBK hücrelerinde apoptozisi indüklediği saptanmıştır (Suzuki ve ark. 2008).

HIV (Human immunodeficiency virus; insan immun yetmezlik virüsü) kodladığı proteinlerle enfekte ve enfekte olmayan hücrelerde apoptozise neden olmaktadır. Apoptozis ilişkili proteinleri arasında Vpr (viral protein regulatory), zarf glikoprotein kompleksi (gp120 ve gp41), Tat (transkripsiyon transaktivatör), Nef (Negative regulatory factor) proteini bulunmaktadır (O'Brien 1998, Mehrbod ve ark. 2019). Vpr, hücrede intrinsik yolağı aktive etmektedir. Vpr direkt olarak mitokondri üzerinde yer alan VDAC kanallarına bağlanır ve MOMP başlamasına neden olur (Jacotot ve ark. 2000, Jacotot ve ark. 2001). Atların enfeksiyöz anemi virüsünün patojenik suşu ve attenüe aşı suşunun at monosit-kökenli makrofaj (eMDM) hücre kültüründe apoptotik etkisi, annexin V ve propidium iodid boyama sonrasında akan hücre ölçerinde incelendiğinde, aşı suşunun patojenik suştan daha çok apoptozise neden olduğu belirlenmiştir (Lin ve ark. 2011).

Köpek parvovirüs tip 2 ile enfekte MDCK hücre hattında (Doley ve ark. 2014) ve virüsün *NS1* geni ile transfekte edilmiş HeLa hücre hattında (Saxena ve ark. 2013) apoptozisin tetiklendiği bildirilmiştir.

Atların arteritis virüsü (EAV) ile Vero hücrelerinde oluşturulan enfeksiyondan sonra hücrelerde DNA fragmentasyonu ve kaspaz aktivasyonu şekillendiği gösterilmiştir (Archambault ve St-Laurent 2000). EAV, Vero hücrelerinde kaspaz-8 ve mitokondri-bağımlı kaspaz-9 aktivasyonuna neden olmakta ve apoptozisi uyarmaktadır (St-Louis ve Archambault 2007). Bir başka çalışmada ise EAV'nin *gP5* geni ile transfekte edilmiş insekt (*Spodoptera frugiperda*) hücre hattında apoptozisin indüklendiği elektron mikroskopisi, DNA fragmentasyonu, TUNEL ve kaspaz-3 aktivasyon incelenmesi ile belirlenmiştir (Metz ve ark. 2014). EAV izolasyonunda sıkça kullanılan tavşan böbrek hücre hattında (RK13) hem iç hem de dış yolağı aktive ederek hücrede apoptozisi uyardığı kaspaz-8 ve -9 florometrik kitleriyle belirlenmiştir (Metz ve ark. 2016).

Mavi dil virüsünün, Vero hücre hattında kaspaz bağımlı iç ve dış yolakla apoptozisi başlattığı belirlenmiştir (Nagaleekar ve ark. 2007). Ayrıca bu virüsün

kapsid proteininin, HeLa, BSR ve HEK 293T gibi memeli hücrelerinde apoptozisi tetiklediği *in vitro* olarak kanıtlanmıştır (Mortola ve ark. 2004).

BHV-1 ile yapılan bir çalışmada virüsün MDBK hücre kültüründe apoptozise neden olduğu akridin turuncu/etidyum bromid boyama, agaroz jel elektroforez ve akan hücre ölçer ile gösterilmiştir. Virüsün Fas aracılı olarak apoptozisi başlattığı ve Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla mitokondriden sitokrom çıkışını uyardığı saptanmıştır (Xu ve ark. 2012). BHV-1 ORF8 proteini, RK13 hücre hattında apoptozisi indüklemektedir (Nakamichi ve ark. 2002).

Şap virüsüyle domuzlarda oluşturulan deneysel enfeksiyon sonrasında dokulardaki apoptozis TUNEL ve DNA fragmentasyonu ile gösterilmiştir (Ku ve ark. 2005). Şap virüsünün VP1 proteininin, BHK-21 hücre hattında (Peng ve ark. 2004) ve fare dendritik hücrelerinde (Jin ve ark. 2007) apoptozisi indüklediği bildirilmiştir. Rekombinant VP1 proteininin, farelerdeki hepatoselüler karsinomlara uygulanması ile apoptozis aracılığıyla tümör hücrelerinin büyümesini ve invazyonunu durdurduğu belirlenmiştir (Chen ve ark. 2011). Şap virüsünün 2C proteininin BHK-21 hücre hattında apoptozisi indüklediği gösterilmiş ve proteinin apoptotik etkisini hücrelerde n-myc proteini üzerinden gerçekleştirdiği bulunmuştur (Wang ve ark. 2012).

Bovine viral diyare virüsünün (BVDV) sitopatik (cp) ve sitopatik olmayan (ncp) biyotiplerinin apoptotik etkisi karşılaştırmalı olarak MDBK ve buzağı testis (CTe) hücre hatlarında incelenmiştir. DNA fragmentasyonu ve TUNEL analizleri sonucunda BVDV cp biyotipinin apoptozisi indüklediği, ncp biyotipinin ise indüklemediği bildirilmiştir (Zhang ve ark. 1996). Bir diğer çalışmada ise ncp BVDV-1 ile buzağılarda oluşturulan deneysel enfeksiyon sonrasında hayvanların lenfoid dokuları elektron mikroskobu, TUNEL, kaspaz-3 aktivasyonu yönünden incelendiğinde, apoptotik lenfosit yıkımlanmasının olduğu bildirilmiştir (Pedrera ve ark. 2009). BVDV NS3 proteini ile transfekte hücre hattında apoptozisin indüklendiği belirlenmiştir (St-Louis ve ark. 2005).

Akabane, Aino ve Chuzan virüslerinin Vero hücre hattında oluşturduğu apoptotik değişimlerden DNA fragmentasyonu jel elektroforezle, kaspaz-3

aktivasyonu ise immünofloresans test ile incelenmiş ve her üç virüsün de Vero hücrelerinde apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Lim ve ark. 2005). KKKA virüsü ile hepatokarsinoma hücre hattında enfeksiyon oluşturulmuş, sonrasında hücreler TUNEL ve annexin V ile incelenmiştir. Hücrelerdeki apoptozis ilişkili genler ve endoplazmik retikulum stresi ilişkili genlerin ekspresyonları real-time PZR incelendiğinde, Puma, Noxa ve CHOP ekspresyonlarında artış belirlenmiştir. Bunun sonucunda KKKA virüsünün hepatositlerde endoplazmik retikulum stresine ve apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Rodrigues ve ark. 2012). KKKA virüsü ile enfekte SW13 hücrelerinde enfeksiyonun erken evrelerinde apoptozis inhibe edilmesine rağmen, geç evrelerinde ise Bid proteini aktivasyonuna neden olarak hücrelerde apoptozisi dış yolak üzerinden indüklemektedir (Karlberg ve ark. 2015). KKKA virüsü yine SW13 hücrelerindeki enfeksiyonun geç evrelerinde kaspaz-3 bağımlı olarak apoptozise neden olmaktadır (Karlberg ve ark. 2011). KKKA virüsünün NSs proteini ile transfekte edilmiş farklı hücre hatlarında (Vero E6, HeLa, 293FT, SW13), apoptozis hem ekstrinsik hem intrinsik yollar ile indüklenmektedir (Barnwal ve ark. 2016). Akabane virüsün Vero E6 hücrelerinde apoptozisi indükleyebilmesi için c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yollarını aktive ettiği ve özellikle JNK yolağının kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Mitomo ve ark. 2016). Oropouche virüsün HeLa hücrelerinde apoptozisi uyardığı belirlenmiştir. Hücrelerde apoptozisin uyarılması için virüs-reseptör bağlanmasının yeterli olmadığı, viral soyunma ve replikasyonun da gelişmesi gerektiği belirlenmiştir (Acrani ve ark. 2010). RVF virüsü enfeksiyonuna benzer semptomlar ve patolojilerle karakterize enfeksiyona neden olan Punta Toro virüs (PTV), HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücrelerinde DNA fragmentasyonuna, kaspaz-3/-7 aktivasyonuna ve PS eksternalizasyonuna neden olarak hücrelerde apoptozisi indüklemektedir (Ding ve ark. 2005). PTV NSs ve N proteinleri ile transfekte HepG2 hücrelerinde apoptozisin hem intrinsik hem de ekstrinsik yolak ile indüklendiği belirlenmiştir (Li ve ark. 2010). La Crosse virüs, farelerin beyrinde ve nöronal hücre hatlarında apoptozise neden olmaktadır. Öte yandan *Bcl-2* geniyle transfekte edilmiş hücrelerde ise La Crosse virüsün apoptozisi başlatamadığı belirlenmiştir (Pekosz ve ark. 1996). HAZV enfeksiyonu kene hücre hattında apoptozisi engellemesine rağmen, bu virüs ile enfekte edilmiş SW13 ve

A549 hücrelerinde apoptozisin indüklendiği belirlenmiştir (Matsumoto ve ark. 2019, Fuller ve ark. 2019).

SBV'nin NSs proteininin apoptozis üzerine etkisi CPT-Tert ve HEK-293T hücrelerinde vahşi tip SBV ve NSs geni silinmiş SBV (SBV Δ NSs) ile yapılan enfeksiyon sonrasında hücrelerdeki kaspaz-3/-7'nin aktivasyonunun araştırılması ile incelenmiştir. Vahşi tip SBV ile enfekte hücrelerde kaspaz-3/-7 aktivasyonunun daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda araştırmacılar SBV NSs proteininin apoptozisi artırıcı etkisinin olduğunu iddia etmişlerdir. Aynı çalışmada, NIH-Swiss farelerin vahşi tip SBV ve SBV Δ NSs ile intraserebral yolla enfekte edilmesinin ardından farelerin beyin dokularında kaspaz-3 aktivasyonu immunohistokimya ile incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, SBV Δ NSs ile enfekte fare beyinlerine kıyasla vahşi tip SBV ile enfekte edilen farelerin beyin dokularında daha fazla aktif kaspaz-3 içeren hücre belirlenmiş ancak iki deney grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanamadığı bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında SBV'nin NSs proteininin CPT-Tert ile HEK-293T hücrelerinde apoptozis üzerine etkili olduğu, farelerde ise apoptozis üzerine etkili olabileceği rapor edilmiştir (Barry ve ark. 2014).

Her virüsün her hücre hattında gösterdiği *in vitro* apoptotik etki farklılık göstermektedir. Aynı aileye üye olan farklı virüslerin bazıları apoptozisi indüklerken bazıları apoptozise engel olmaktadır. Bazı virüsler ise viral replikasyonun evrelerine göre apoptozis üzerine farklı etkiler göstermektedir. Bu tezde, SBV ile ilgili çalışmalarda sıkça kullanılan bir hücre hattı olan Vero hücre hattında SBV'nin apoptotik etkisinin araştırılması ve kullandığı yolların belirlenmesi amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Tez kapsamında kullanılan Vero hücre hattı, %10 fotal buzağı serumu (FBS) içeren Dulbecco's modifiye Eagle's medium (DMEM) içinde ve penisilin (100 U/ml) ve streptomisin (100 µg/ml) ilave edilerek üretildi. Hücreler %5 karbondioksitli inkübatörde (PureCell NU-5100 E, Nuair, ABD) 37°C'de inkübe edildi. Hücreler, yapılacak deneyde duyulan ihtiyaa göre 25 cm² flask (#690160, Greiner Bio-One, Avusturya), 75 cm² flask (#90075, TPP, İsviçre), 6 kuyucuklu hücre kültür pleyti (#130184, Thermo Scientific, ABD), 12 kuyucuklu hücre kültür pleyti (#712001, Nest, Çin) veya 24 kuyucuklu hücre kültür pleytinde (#702001, Nest, Çin) oğaltıldı.

2.2. Schmallerberg Virüsünün İdentifikasyonu

Tez kapsamında, Schmallerberg virüsü (SBV) F6 suğu ( segmentine ait GenBank erişim numaraları KC355457, KC355458, KC355459) kullanıldı. Kullanılan SBV suğu Prof. Dr. Wim H. M. van der Poel (Wageningen Üniversitesi, Hollanda) tarafından gönderildi. SBV'nin hem identifikasyonu ve hem de Vero hücre hattında üretildiğinin kontrolü için RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapıldı ve konvansiyonel PZR kuruldu.

2.2.1. RNA İzolasyonu

Viral RNA izolasyonu, High Pure RNA izolasyon kiti (#11858882001, Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Viral örnekten 200 µl alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine içinde poly (A) taşıyıcı RNA (tRNA) eklenmiş olan 400 µl Lysis/Binding buffer ilave edilip vortekslendi. Örnekler 10 dakika süresince oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonrasında tüm örnek filtreli tüplere aktarıldı ve 8000 g hızda 15 saniye santrifüj edildi. Ardından içerisinde filtrat bulunan toplama tüpleri uzaklaştırıldı ve yeni toplama tüpleri kullanıldı. Filtreli tüplerin üzerine PZR inhibitörlerini uzaklaştırmak için 500 µl inhibitor removal buffer konuldu ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, içerisinde filtrat bulunan toplama tüpleri yenileri ile değiştirildi ve filtreli tüplere 450 µl yıkama solüsyonu eklendi. Tüpler 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve bu yıkama işlemi bir defa daha tekrarlandı. Son yıkamada alkol rezidülerini uzaklaştırılması için 13000 g'de 10 saniye santrifüj işlemi uygulandı. Ardından filtreli tüpler steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 50 µl elüsyon solüsyonu eklenip 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen viral RNA kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı.

2.2.2. Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu (cDNA Sentezi)

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Bunun için 13 µl RNA örneği ile 1 µl random heksamer primer (#S0142, Thermo Scientific, ABD) ile PZR tüpünde karıştırıldı. Tüpler 90°C'de 2 dakika, 80°C'de 2 dakika ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında tüplere 5 µl RT-Buffer (#EP0441, Thermo Scientific, ABD), 4 µl 10mM dNTP (#R0181, Thermo Scientific, ABD), 1 µl

RNAse inhibitörü (#E00381, Thermo Scientific, ABD) ve 1 µl M-MLV reverse transkriptaz (#EP0441, Thermo Scientific, ABD) ilave edildi. Toplam 25 µl hacimdeki karışımı içeren tüpler, 42°C'de 1 saat ve 25°C'de 10 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.3. Konvansiyonel PZR ve Jel Elektroforez

SBV'nin teyidi SBV S segmentine özgül olan 382-469 primer çifti (Bilk ve ark. 2012) ve Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR tarafından dizayn edilen AKASBV primer çifti kullanılarak konvansiyonel PZR ile teyit edildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. SBV S segmentine özgül primer sekansları

Primer Adı	Primer sekansı (5'→3')	Ürün büyüklüğü	Kaynak
382-469	F: TCAGATTGTCATGCCCCCTTGC R: TTGGGCCCCAGGTGCAAATC	89 bp	Bilk ve ark. 2012
AKASBV	F: ATGTCAAGCCAATTCATTTTTG R: TTAGATGTTGATACCGAATTGC	702 bp	Bu tez

PZR için 5 µl cDNA, 5 µl 5×PZR buffer (#EP0402, Thermo Scientific, ABD), 5 µl MgCl₂ 50mM, 1 µl Taq DNA polimeraz (#EP0402, Thermo Scientific, ABD), 4 µl dNTPs 1.25mM (#R0181, Thermo Scientific, ABD), 4 µl 10 pmol konsantrasyonda F-R primer karışımı (Çizelge 2.1) ve 26 µl steril distile su ile toplam 50 µl hacimde karışım hazırlandı. PZR kondisyonu 95°C'de 2 dakika, 32 siklus boyunca 95°C'de 45 saniye, 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye ve son uzama için 72°C'de 10 dakika şeklinde gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için öncelikle tris-asetik asit-EDTA (TAE) solüsyonu hazırlandı. TAE hazırlanması için 121 g Tris (#PR0612, Vivantis, Malezya) alınarak 28,55 ml asetik asit (#100063, Merck, Almanya) içerisine konuldu. Bu karışımın üzerine 0,5 M pH 8.0 EDTA (#20302, VWR, ABD) çözeltisinden 50 ml ilave edildi. Sonrasında 400 ml distile su (dH₂O) eklenerek 50× TAE hazırlandı. Agaroz jel hazırlanması sırasında bu solüsyon stok olarak kullanıldı ve son konsantrasyon 1× olacak şekilde dH₂O ile seyreltildi. Tüm DNA örneklerindeki apoptotik değişimleri görüntülemek için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanması için agaroz (#443666A, VWR, ABD), hassas terazide (BLC500, Boeco, Almanya) tartılarak erlenmayer içerisindeki 1× TAE içinde çözdürüldü. Agarozun çözünmesini hızlandırmak için mikrodalga fırın (MD554, Arçelik, Türkiye) kullanıldı. Agarozun ısısı yaklaşık 50°C'ye düştükten sonra eriyiğe 0,5 µg/ml oranında ethidium bromide (#18S-00, SNP, Türkiye) ilave edildi (Aslan 2014).

Elde edilen DNA örnekleri ve 100 bp DNA marker (#304105, Bioron, Almanya), etidium bromid içeren %1,5'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez işlemi, Cleaver elektroforez cihazı (Warwickshire, İngiltere) kullanılarak 125 volt (V) akımda 30 dakikada gerçekleştirildi. Agaroz jel, UV ışık kaynağı (Illuminix, ABD) kullanılarak görüntülendi (Azkur ve ark. 2011).

2.3. Virüsün Üretilmesi

SBV, Vero hücre hattında adsorpsiyona bağlı yöntem ile inokule edilerek üretildi. Bunun için hücre yüzeyi serumsuz vasat ile yıkandıktan sonra viral inokulum flaska/hücre kültür pleytine konuldu ve 2 saat süresince %5 karbondioksitli inkübatörde 37°C'de bekletildi. Ardından inokulumlar toplandı ve flaska/hücre kültür pleytine %1 FBS içeren DMEM ilave edildi. Enfekte edilen hücreler günlük olarak

sitopatik etki (cpe) yönünden tersine mikroskopta (DMIL LED, Leica, Almanya) incelendi.

2.4. Plak Titrasyon Deneyi

Vero hücre hattında üretilen SBV'nin titresi plak titrasyon yöntemi ile belirlendi. Bunun için Mansfield ve ark. (2013) geliştirdiği yöntem modifiye edilerek optimize edildi. Plak titrasyon deneyi yapılmadan bir gün önce, 2×10^5 hücre/ml yoğunluğundaki Vero hücre süspansiyonundan 12 kuyucuklu hücre kültürü pleytinin her gözüne toplam 2 ml veya 24 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her gözüne toplam 1 ml hücre süspansiyonu konuldu. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C inkübatörde 1 gün inkübe edildi.

Titrasyon öncesinde toz DMEM/F-12 (#D8900, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak 2× DMEM/F-12 hazırlandı. Bunun için 15,6 g toz vasat tartıldı ve 474 ml steril hücre kültürü grade su (#03-055-1A, Biological Industries, İsrail) içinde çözdürüldü. Bunun içine, penisilin (10000 U/ml) – streptomisin (10000 µg/ml) solüsyonundan (#03-031-1B, Biological Industries, İsrail) 10 ml ve %7,5 sodyum bikarbonat solüsyonundan (#609-105-EL, Wisent Bio Products Multicell, Kanada) 16 ml katılarak 2× DMEM/F-12 hazırlandı. Elde edilen vasat, vakum filtre sisteminden (#99500, TPP, İsviçre) filtre edildi. Vasatın pH'sı pH metre cihazı (PT-380, Boeco, Almanya) yardımı ile ölçüldü ve pH 6,8-7,2 olarak dengelendi. Kullanıma hazır hale getirilen vasat 4°C'de muhafaza edildi. Plak titrasyon öncesinde %2 karboksimetil selüloz (CMC) solüsyonu (#C9481, Sigma-Aldrich, ABD) distile su içinde hazırlandı. CMC, distile su içinde oda ısısında çözüldükten sonra otoklavlanarak steril hale getirildi. Titrasyona başlamadan önce 2× DMEM ve %2 CMC eşit hacimlerde (1:1) karıştırılarak CMC overlay hazırlandı ve kullanıma hazır vaziyette buzdolabında saklandı.

Titrasyon için SBV'nin log10 tabanında dilüsyonları serumsuz DMEM içinde hazırlandı. 12 kuyucuklu pleytte bulunan Vero hücreleri 500 µl, 24 kuyucuklu pleytteki hücreler ise 300 µl virüs dilüsyonlarıyla inokule edildi. Negatif kontrol hücrelerine aynı miktarlarda steril serumsuz DMEM ilave edildi. Virüs inokulumları konulduktan sonra pleytler, %5 CO₂ ve 37°C inkübatörde 3 saat inkübe edildi. Ardından, 37°C'ye ısıtılmış olan CMC overlay (DMEM+CMC) karışımından her kuyucuğa 1-2 ml ilave edildi ve pleytler %5 CO₂ ve 37°C inkübatörde 6 gün süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda pleytler inkübatörden alındı ve overlay uzaklaştırılmadan tüm kuyucuklara 1 ml %10 nötral tamponlanmış formalin (#F5554, Sigma-Aldrich, ABD) ilave edildi. Hücrelerin fikzasyonu için pleytler 1 saat süreyle oda ısısında bekletildi. Ardından kuyucuklardaki tüm sıvı vakum sistemi ile uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyini yıkamak için 200 ml distile su içinde 1 tablet PBS (#P4417, Sigma-Aldrich, ABD) çözdürüldü ve hazırlanan PBS ile hücre yüzeyleri 1 kez yıkandı. Hücrelerin boyanması ve plakların görüntülenmesi için her kuyucuğa yaklaşık 400 µl kristal viyole solüsyonu (#109218, Merck, Almanya) ilave edildi. Hücrelerin kristal viyole ile boyanması için 10 dakika beklendikten sonra pleyt çeşme suyuyla en az 3 defa yıkandı. Pleyt kurutulduktan sonra kuyucuklarda oluşan plaklar makroskobik olarak sayıldı ve plak titrasyon testi değerlendirildi. Değerlendirmede “PFU/ml = sayılan ortalama plak sayısı / dilüsyon oranı × inokulum miktarı (ml)” formülünden yararlanıldı (Mansfield ve ark. 2013, Baer ve Kehn-Hall 2014). Örneğin; viral inokulum 0,5 ml konularak yapılan plak titrasyon deneyinin değerlendirilmesinde 10⁻⁴ virüs dilüsyonu ile enfekte hücre kuyucuklarından birinde 30 diğerinde 32 adet plak sayıldı ise (ortalama plak sayısı 31), viral titre “PFU/ml = 31 / 10⁻⁴ × 0,5” formülü ile hesaplanarak viral titre 6,2 × 10⁵ PFU/ml olarak bulunur.

2.5. Vero Hücre Hattına İnokulasyonlar

Vero hücre hattı 0,1 ve 0,01 MOI SBV ile enfekte edildi ve deney grupları oluşturuldu. Pozitif kontrol olarak son konsantrasyonu 1 µM/ml olacak şekilde dozlanarak staurosporin (#35385.02, Serva, Almanya), negatif kontrol grubuna ise steril vasat ilave edildi (Nakazono-Kusaba ve ark. 2002). Tüm hücreler günlük olarak sitopatik etki yönünden tersine mikroskopta kontrol edildi. İnokulasyonların ilk saatinde ve inokulasyonlardan 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 saat sonra hücreler toplandı. Toplanan hücrelerin vasatları ve tripsinizasyon işlemi sonrasında elde edilen hücre pelleti birleştirilerek analizler yapıldı.

2.6. Hücrelerde Apoptozisin Belirlenmesi

2.6.1. DNA Fragmentasyon Deneyi

SBV ile enfekte 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 saat hücrelerinden ve kontrol grubu hücrelerinden DNA izolasyonu apoptotik DNA ladder kit (#K170, Biovision, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için SBV ile enfekte her deney grubundan yaklaşık 2×10^6 hücre tripsinize edilerek 15 ml steril santrifüj tüplerine (#CFT011150, Jet Biofil, Çin) toplandı. Hücre pelleti ekstraksiyon buffer ile süspanse edildikten sonra steril mikrosantrifüj tüplerine (#078.03.003, Isolab, Almanya) aktarıldı ve örnekler 1600 ×g'de santrifüj edildi (Allegra X-30R, Beckman-Coulter, ABD). Süpernatantlar toplandıktan sonra her bir örneğe RNAaz ve proteinaz ilave edilip 50°C'de su banyosunda (BM15, Nüve, Türkiye) 30 dakika bekletildi. İnkübasyonun

ardından örneklere amonyum asetat ve isopropanol (Yimka, Türkiye) ilave edilip örnekler 10 dakika süreyle -20°C’de tutuldu. DNA presipitasyonu için tüm örnekler 16,000 ×g’de 10 dakika santrifüj edildi. DNA pelleti bir defa %70 etanol ile yıkandı ve tekrar 16,000 ×g’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında alkol dikkatlice döküldü ve alkol rezidülerinin buharlaşması için tüpler ağzı açık biçimde oda ısısında 15 dakika kadar bekletildi. Elde edilen DNA peleti süspansiyon buffer ile süspanse hale getirildi.

Tüm DNA örneklerindeki apoptotik değişimleri görüntülemek için agar jel elektroforez uygulandı. Bunun için %2’lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz tartılarak erlenmayer içerisindeki 1× TAE içinde çözdürüldü. Agarozun çözünmesi mikrodalga fırında gerçekleştirildi. Agarozun yaklaşık 50°C’ye soğutulduktan sonra eriyiğe 0,5 µg/ml oranında ethidium bromide ilave edildi. Elde edilen DNA örnekleri ve 1 kb DNA marker (#SM0311, Thermo Fisher, ABD), etidium bromid içeren %2’lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez işlemi, 125 volt (V) akımda 45 dakikada gerçekleştirildi ve jel UV ışık kaynağı altında görüntülendi (Collins ve ark. 1997).

2.6.2. Annexin V/PI Boyama

SBV enfeksiyonundan 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 saat sonra toplanan hücreler Annexin V-FITC/PI kiti (#K101, Biovision, ABD) kullanılarak boyandı. Bunun için hücreler toplandıktan sonra bir kez FBS içeren vasat ile yıkandı. Hücre pelleti 1× Binding buffer ile süspanse edildi. Tüm deney grubu örnekleri Annexin V-FITC ve PI ile boyandı. Kontrol hücreler ise boyasız (unstained), sadece FITC, sadece PI ve çift (FITC+PI) boyalı olarak ayrıldı. Boyama işleminden sonra tüm örnekler 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.

Tüm kontrol ve deney grubu örnekleri, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde bulunan akan hücre

ölçer (FACSAria II, Becton Dickinson, ABD) cihazı ile analiz edildi. Analiz sonuçları BD FACSDIVA (Becton Dickinson, ABD) yazılımı kullanılarak elde edildi (Akyol ve ark. 2015).

2.6.3. Kaspaz Aktivasyon Deneyi

SBV ile enfekte 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 saat hücrelerinde ve kontrol hücre grubunda kaspaz-3 aktivasyonu kaspaz-3 kolorimetrik kiti ile (#K106, Biovision, ABD) incelendi. Hücrelerdeki kaspaz-8 aktivasyonu kaspaz-8 kolorimetrik kiti ile (#K113, Biovision, ABD), kaspaz-9 aktivasyonu ise kaspaz-9 kolorimetrik kiti ile (#K119, Biovision, ABD) değerlendirildi. Tüm kaspaz kitleri üreticinin önerdiği protokoller izlenerek kullanıldı ve uygulanan tüm protokoller kısaca aşağıda belirtildi.

Hücrelerdeki kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonunun belirlenmesi için öncelikle $3,5 \times 10^6$ hücre 2., 6., 12., 18., 24., 36., 48. ve 72. saatte tripsinizasyon ile toplandı. Hem vasat hem de toplanan hücreler birleştirildi ve 1500 rpm hızda 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen hücre pelletleri, 50 µl soğuk Cell Lysis Buffer ile süspanse edilip buz içinde 10 dakika bekletildi. Ardından örnekler $10,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, analiz edilecek hücrelerin sitozolik fraksiyonunu içeren süpernatantlar steril mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Sitozolik fraksiyondaki protein konsantrasyonu tayini Bradford protein kiti (#23200, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak yapıldı. Tüm bekleme işlemleri sırasında örnekler buz içinde tutuldu.

Kaspaz-3 aktivasyonunun ölçülmesi için, 200 µg protein 50 µl Cell Lysis Buffer içinde 96 kuyucuklu pleytte dilüe edildi. Her örneğin üzerine, son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde ditiotreitol (Dithiothreitol, DTT) içeren 50 µl $2 \times$ Reaction Buffer ilave edildi. Ardından, her örneğin üzerine 5 µl kaspaz-3

substratı olan DEVD-pNA solüsyonu (Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanalide) (4 mM) son konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde ilave edildi. Örnekler 37°C’de 2 saat bekletildi. Pleyt, 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında (Seac, Sirio S, İtalya) okutuldu.

Kaspaz-8 aktivasyonunun ölçülmesi için, 200 µg protein 50 µl Cell Lysis Buffer içinde 96 kuyucuklu pleytte dilüe edildi. Her örneğin üzerine, son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DTT içeren 50 µl 2× Reaction Buffer ilave edildi. Ardından, her örneğin üzerine 4 mM yoğunluktaki kaspaz-8 substratı olan IETD-pNA (Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanalide) solüsyonundan 5 µl (son konsantrasyon 200 µM) ilave edildi. Örnekler 37°C’de 2 saat bekletildi. Pleyt, 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutuldu.

Kaspaz-9 aktivasyonunun ölçülmesi için, 200 µg protein 50 µl Cell Lysis Buffer içinde 96 kuyucuklu pleytte dilüe edildi. Her örneğin üzerine, son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DTT içeren 50 µl 2× Reaction Buffer ilave edildi. Ardından, her örneğin üzerine 4 mM yoğunluktaki kaspaz-9 substratı olan LEHD-pNA (Leu-Glu-His-Asp-p-nitroanalide) solüsyonundan 5 µl (son konsantrasyon 200 µM) ilave edildi. Örnekler 37°C’de 2 saat bekletildi. Pleyt, 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutuldu.

Kaspaz-3, -8 ve -9 kitleri kullanılarak elde edilen optik dansite (OD) değerleri, hücrelerde gerçekleşen kaspaz aktivasyonunun belirlenmesinde kullanıldı. Kontrol hücre grubuna kıyasla enfekte hücrelerdeki kaspaz aktivasyonu kat artışı, “ortalama OD ± standart hata” ile hesaplandı.

2.6.4. Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Genlerin Ekspresyon Analizi

2.6.4.1. RNA İzolasyonu

SBV enfekte hücreler toplandıktan sonra RNA izolasyonları High Pure RNA izolasyon kiti (#11828665001, Roche, Almanya) üretici protokolü takip edilerek yapıldı. Kısaca, bunun için 1×10^6 hücre toplandı ve santrifüj edildikten sonra 200 μ l steril PBS ile süspanse edildi. Örneklerin üzerine 400 μ l Lysis/Binding buffer ilave edildi ve vortekslendi (V1 Plus, Boeco, Almanya). Örnekler filtreli tüplere aktarıldı, santrifüj edildikten sonra tüplere 90 μ l DNAaz inkübasyon buffer konuldu. Tüpler 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 500 μ l wash buffer I ilave edildi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Ardından tüplere 500 μ l wash buffer II ilave edilip santrifüj edildi. Son yıkama işlemi için 200 μ l wash buffer II ilave edilip maksimum hızda santrifüj işlemi yapıldı. Filtreli tüp steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve tüpe 100 μ l elution buffer konuldu. Tüpler santrifüj edildikten sonra elde edilen RNA örnekleri -80°C derin dondurucuya (DF590, Nüve, Türkiye) kaldırıldı.

2.6.4.2. Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu (cDNA Sentezi)

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Bunun için Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (#04897030001, Roche, Almanya) kullanıldı. Her örnekten 10 μ l RNA, 1 μ l anchored-oligo(dT)₁₈ primer ve 2 μ l random heksamer primer ile karıştırılarak 65°C'de 10 dakika thermal cyclers (Boeco, Almanya) cihazında tutuldu. Bu işlemin ardından her tüpe 4 μ l reverse transkriptaz buffer, 0,5 μ l RNAaz inhibitör, 2 μ l deoksinükleotit karışımı ve 0,5 μ l reverse transkriptaz ilave edildi. Örnekler 25°C'de 10 dakika ve 55°C'de 30 dakika thermal cyclers cihazında tutuldu. Toplam hacim 20 μ l olacak şekilde cDNA sentezi tamamlandı. Elde edilen cDNA örnekleri kullanılmaya kadar -20°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.6.4.3. Real-time PZR

Tez kapsamında pro-apoptotik genlerden *Bax*, *Bak* ve *Puma*, anti-apoptotik genlerden *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerinin ekspresyonları SBV enfekte Vero hücrelerinde analiz edildi. Relatif ekspresyon normalizasyonu için *gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)* geni referans gen olarak seçildi.

Real-time PZR analizi için Vero hücre hattının köken aldığı hayvan olan Afrika yeşil maymununun *GAPDH*, *Bax*, *Bak*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Puma* genlerine spesifik primerler dizayn edildi (Çizelge 2.2). Primer dizaynı, Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezinin (NCBI; National Center for Biotechnology Information) primer dizayn aracı (Primer-BLAST) kullanılarak yapıldı. Dizayn edilen primerler IDT firması (Leuven, Belçika) tarafından liyofilize olarak sentezlendi ve laboratuvarımızda DNAaz-RNAaz ari ultrasaf su (#01-866-1A, Biological Industries, İsrail) ile sulandırılarak kullanıldı.

Çizelge 2.2. Tez kapsamında incelenen genlere özgül primer sekansları

Hedef Gen	Primer sekansı (5'→3')	Ürün	Kaynak
<i>GAPDH</i>	F: GAGAAGGCTGGGGCTCATTT R: CCACCTGGTGCTCAGTGTAG	529 bp	Bu tez
<i>Bax</i>	F: GGCTGAGCGAGTGTCTCAAG R: AGACAGGGACATCAGTCGCTT	347 bp	Bu tez
<i>Bak</i>	F: TCTGGCCCTACACGTCTACC R: ACAAACTGGCCCAACAGAAC	201 bp	Bu tez
<i>Bcl-2</i>	F: CTCTCCCCCTCGACTTCTGA R: AGTCACGCGGAACACTTGAT	297 bp	Bu tez
<i>Bcl-xl</i>	F: CATTGAAGGAGCTGAGGTGGA R: TCTGGTCTCTTGCTCAGTGG	196 bp	Bu tez
<i>Puma</i>	F: CGGAAGGGTCTCCAACCTC R: CAAGGAAGAGAGACCGAGCC	225 bp	Bu tez

Reaksiyonlar, SYBR Green I master mix (#04707516001, Roche, Almanya) kullanılarak kuruldu ve her örnek duplike olarak çalışıldı. Real-time PZR için reaksiyon karışımı; 1 µl cDNA, 10 µl 2× SYBR Green master miks, 1 µl F-R primer (10 pmol), 8 µl PZR-grade su kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde optimize edildi. Reaksiyonların kurulduğu real-time PZR pleyti (#04729692001, Roche, Almanya), hızlı bir şekilde santrifüj (Allegra X-30R, Beckman-Coulter) edildi. Reaksiyonlar LightCycler 96 real-time PZR cihazında (Roche, Almanya) gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılan profil, 95°C’de 300 s pre-inkübasyon ardından 95°C 10 s, 60°C 10 s, 72°C 10 s olarak optimize edildi. Real-time PZR sonuçları bilgisayara aktarılarak LightCycler 96 SW1.1 (Roche, Almanya) yazılım programı kullanılarak değerlendirildi ve analiz edildi.

Gen ekspresyon seviyelerinin relatif kat değişiminin araştırılması için tüm Cq verileri Microsoft Excel dosyasına girildi. Excel’de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ formülü (Pfaffl 2001, Schmittgen ve Livak 2008) temelli bir hesaplama dosyası oluşturuldu ve bu dosyada *Bax*, *Bak*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Puma* genlerine ait girilen tüm Cq değerleri *GAPDH* referans genine göre normalize edildi. Excel’de oluşturulan formülasyonda ve normalizasyonda, $2^{-(\text{incelenen genin Cq değeri} - \text{referans genin Cq değeri})}$ enfekte örnek - (incelenen genin Cq değeri - referans genin Cq değeri) enfekte olmayan örnek açık formülünden yararlanıldı (Schmittgen ve Livak 2008).

2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için “statistical package for social sciences” (SPSS; IBM SPSS Statistics 21, SPSS Inc., ABD) programı kullanıldı. Tez kapsamında elde edilen verilerin parametrik olarak karşılaştırılmasında One-way ANOVA ve Student t testi kullanıldı. İstatistiksel farklılık, p değeri 0,05’in altında ise anlamlı olarak

kabul edildi. İstatistiksel analiz ve verilerin değerlendirilmesi Prof. Dr. Latif ÖZTÜRK (Kırıkkale Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Ekonometri Bölümü) tarafından gerçekleştirildi.

2.8. Grafiklerin ve Şekillerin Hazırlanması

Grafiklerin oluşturulmasında Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, ABD) kullanıldı. Kaspaz aktivasyon verileri ile pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon analiz verileri Excel dosyasına girildikten sonra ortalama ve standart sapmalar otomatik formüller ile hesaplandı. Verilere ait ortalama ve standart sapmalar kullanılarak “ekle” sekmesinden “sütun” grafik modeli seçildi. Oluşturulan grafiklerde standart sapmalara ilişkin hata çubukları “düzen” sekmesindeki “hata çubukları” bölümünden “standart sapmayla hata çubukları” kullanılarak yapıldı. Eklenen hata çubuklarının, hesaplanan standart sapma değerlerini göstermesi için ise “düzen” sekmesindeki “hata çubukları” bölümünden “tüm hata çubuğu seçenekleri” kullanıldı. Açılan “tüm hata çubuğu seçenekleri” kutusunda ilgili MOI verileri seçildi. Seçim sonrasında açılan “hata çubuklarını biçimlendir” kutucuğundaki “özel” butonuna seçildi ve “değer belirt” butonuna tıklandı. Açılan “özel hata çubukları” kutucuğundaki hem “pozitif hata değeri” hem de “negatif hata değeri” için seçimi yapılan verilere ait standart sapma verileri aynı olarak seçildi. Ardından “tamam” butonuna basıldı ve “hata çubuklarını biçimlendir” kutucuğu “kapat” butonuna basılarak kapatıldı. Bu işlem sırası tüm grafiklerde uygulandıktan sonra verilere ait hesaplanan standart sapma değerleri grafiklerde belirtilmiş oldu. Grafiklerin biçimsel düzenlenmesi için “düzen” sekmesindeki “grafik başlığı”, “ksen başlıkları” ve “ksenler” bölümlerinden istenilen düzenlenmeler yapıldı.

Şekillerin oluşturulmasında ve grafiklerdeki istatistiksel analizlere ilişkin düzenlenmesinde ise Microsoft Office Word ve Paint (Microsoft Corporation, ABD) programlarından yararlanıldı.



3. BULGULAR

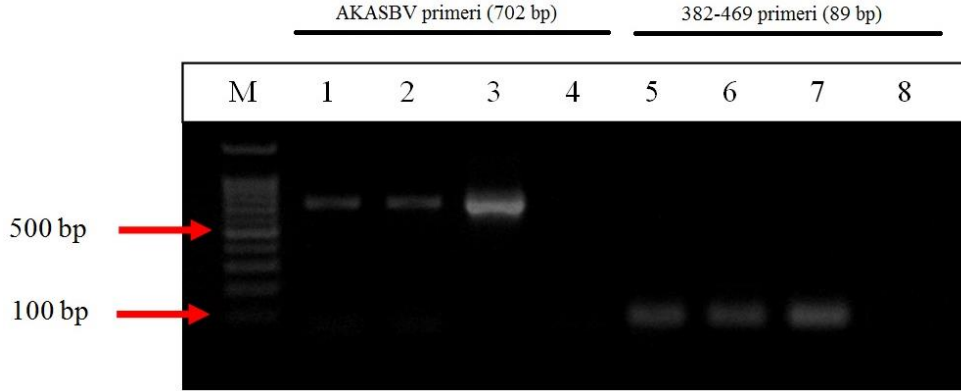
3.1. Schmallerberg Virüsün Üretilmesi ve Titrasyonu

Schmallerberg virüsü Vero hücrelerine inokule edildi ve hücrelerde 24-72 saat aralığında sitopatik etkiye neden olduğu belirlendi (Şekil 3.1). Sitopatik etkinin %80'e ulaştığı saatte, flasklar derin dondurucuya konularak donduruldu ve dondur-çözdür işlemi bir defa yapıldı. Çözdürmeden sonra elde edilen vasattan SBV'nin teyidi için RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapıldı ve konvansiyonel PZR kuruldu.



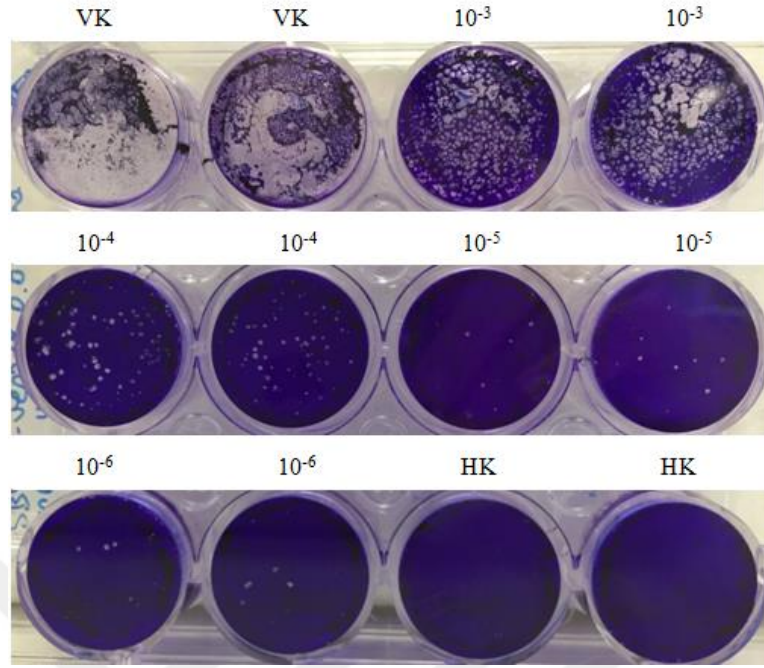
Şekil 3.1. SBV'nin Vero hücre hattına inokulasyonundan 48 saat sonra oluşturduğu sitopatik etkinin mikroskopik görünümü. (50× büyütme)

Schmallerberg virüsünün Vero hücre hattında üretildiği, SBV S segmentine özgül olan 382-469 primer çifti (ürün 89 bp) ve AKASBV primer çifti (ürün 702 bp) kullanılarak konvansiyonel RT-PZR ile teyit edildi. SBV'nin S genine ait her iki ürün de amplifikasyon sonrasında görüntülendi (Şekil 3.2).

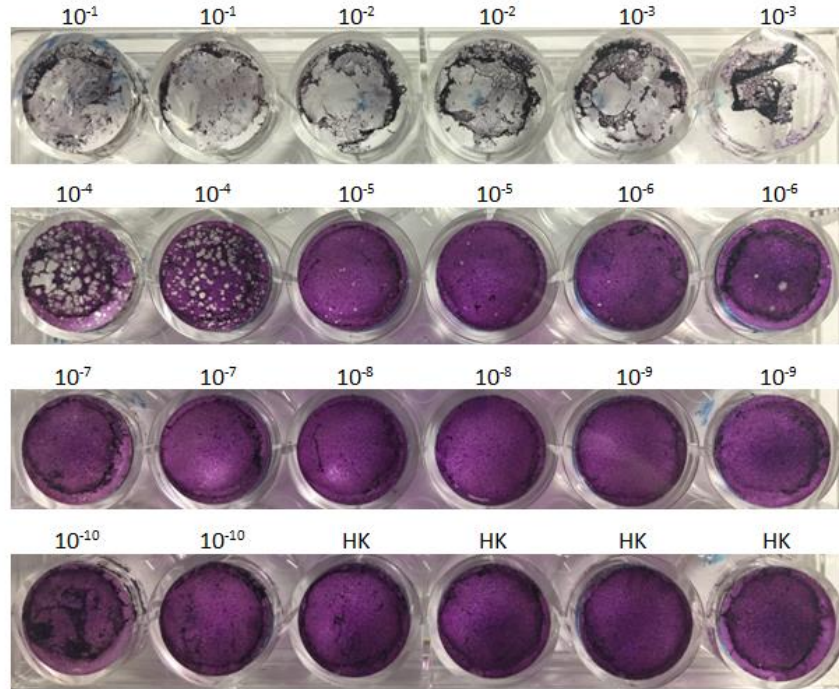


Şekil 3.2. SBV konvansiyonel RT-PZR sonucu. Hat 1-4 reaksiyonları AKASBV primeri ile (702 bp), hat 5-8 reaksiyonları ise 382-469 primeri ile (89 bp) kuruldu. M: 100 bp DNA marker (#304105, Bioron, Almanya) Hat 1-2 ve hat 5-6: Vero hücrelerinde üretilen SBV, Hat 3 ve hat 7: SBV S segment plasmidi (Plasmid, Azkur ve ark. 2018; TAGEM15/AR-GE48 nolu projede üretilmiştir), hat 4 ve hat 8: negatif kontrol.

Elde edilen SBV'nin konvansiyonel RT-PZR ile teyidi sonrasında, virüsün titrasyonu için plak titrasyon deneyi optimize edildi. Plak titrasyon testi için hem 12 kuyucuklu pleyt (Şekil 3.3) hem de 24 kuyucuklu pleyt (Şekil 3.4) kullanıldı. Aynı virüs stoğu her iki pleyt ile denendi ve elde edilen titreler karşılaştırıldığında, her iki pleytte elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu ve aynı viral titrenin hesaplandığı belirlendi. SBV'nin Vero hücre hattındaki seri pasajları yapıldı ve her pasajdan elde edilen virüsün titresi plak titrasyon testi ile hesaplandı. Tez kapsamındaki tüm deneylerde, seri pasajlardan elde edilen virüs stokları arasından en yüksek titreye sahip virüs kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. SBV'nin Vero hücresi kullanılarak 12 kuyucuklu hücre kültür pleytinde yapılan plak titrasyon deney sonucu. VK: virüs kontrol, HK: hücre kontrol, 10^{-3} - 10^{-6} : SBV dilüsyonları.

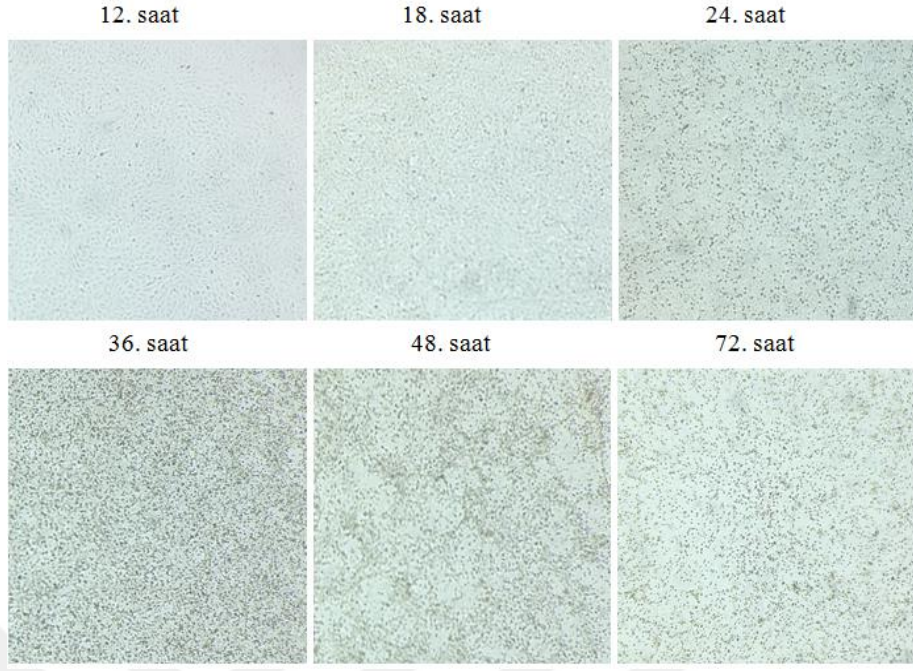


Şekil 3.4. SBV'nin Vero hücresi kullanılarak 24 kuyucuklu hücre kültür pleytinde yapılan plak titrasyon deney sonucu. 10^{-1} - 10^{-10} : SBV dilüsyonları, HK: hücre kontrol.

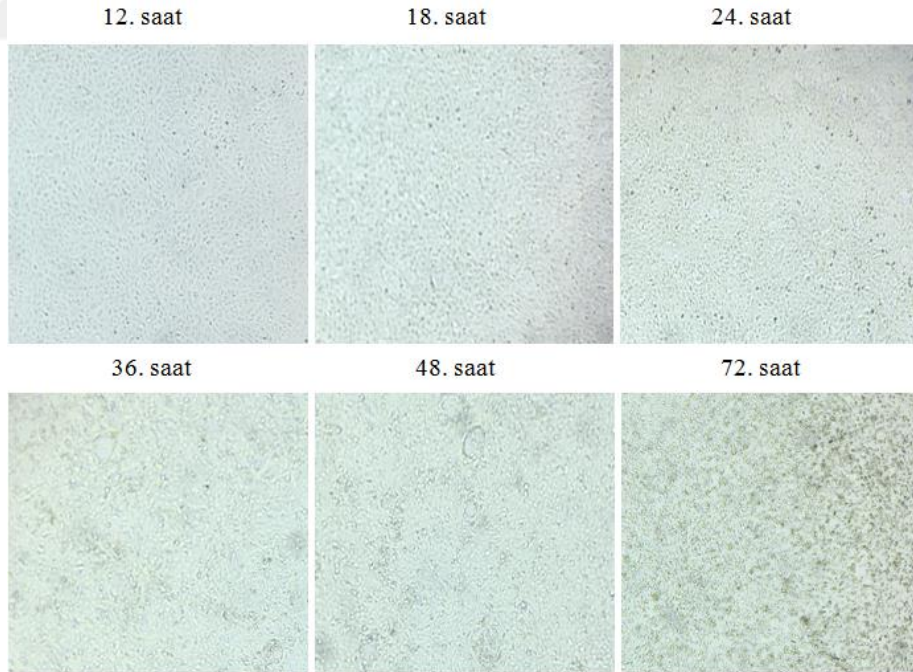
3.2. Schmallerberg Virüsün Vero Hücrelerine 0,1 ve 0,01 MOI Enfeksiyonları

Vero hücreleri, SBV'nin 0,1 ve 0,01 MOI dozları ile enfekte edildikten 0, 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 saat sonra hücreler toplandı. Hücreler toplanmadan önce SBV ile enfekte Vero hücrelerinde oluşan sitopatik etkiler tersine mikroskopta incelendi. Hücrelerde meydana gelen sitopatik etkinin viral titreye ve zamana bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlendi.

SBV 0,1 MOI ile enfekte olan hücre serisinde sitopatik etki 18. saat enfeksiyonunda başlayıp zamanla artış gösterdi ve 72. saat enfeksiyonunda hücre sayısının oldukça az olduğu ve hücrelerin lize oldukları saptandı (Şekil 3.5). SBV 0,01 MOI ile enfekte olan hücrelerde ise sitopatik etki 24. saatte başlayarak yine zamanla artış gösterdi (Şekil 3.6). İki farklı dozda enfekte olan 72. saat hücreleri kıyaslandığında 0,1 MOI ile hücrelerdeki sitopatik etkinin 0,01 MOI ile enfekte hücrelerdekine göre daha şiddetli olduğu belirlendi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Negatif kontrol hücre grubunda ise hiçbir sitopatik etki gözlenmedi.



Şekil 3.5. SBV 0,1 MOI ile enfekte Vero hücrelerinin farklı saatlerdeki mikroskopik görünümleri (50× büyütme).



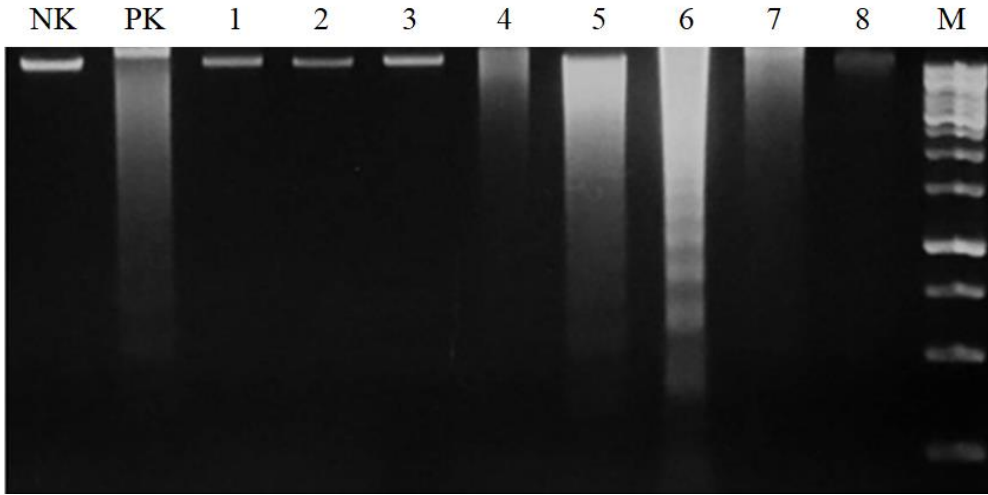
Şekil 3.6. SBV 0,01 MOI ile enfekte Vero hücrelerinin farklı saatlerdeki mikroskopik görünümleri (50× büyütme).

3.3. DNA Fragmentasyonu

SBV ile enfekte hücreler enfeksiyondan 0, 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 saat sonra toplandı ve hücrelerden DNA izolasyonu “apoptotic DNA ladder kit” ile yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri %2 agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve jel UV ışık kaynağında görüntüldü. Bu tezde yapılan DNA fragmentasyon deneyi SBV'nin apoptotik etkisinin araştırılmasında ilk defa kullanıldı.

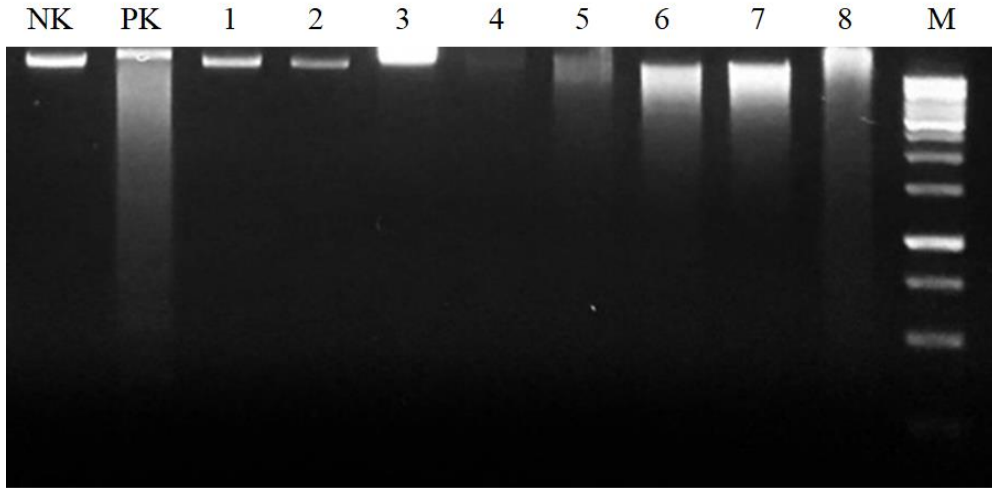
DNA fragmentasyon deneyinin sonuçlarına göre, Vero kontrol hücrelerinde (negatif kontrol grubu) DNA fragmentasyon görülmez iken, Staurosporin (1 μ M) ile inokule edilen pozitif kontrol grubunda DNA fragmentasyonu gözlemlendi. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde oluşan DNA fragmentasyonunun ise viral titre ve zaman ile farklılık gösterdiği tespit edildi.

SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde DNA fragmentasyonu ilk olarak 18. saat enfeksiyonunda başladı. DNA fragmentasyonu, enfeksiyon saati ilerledikçe artış gösterdi fakat 0,1 MOI ile yapılan enfeksiyonun 72. saatinde ise fragmentasyon gözlenmedi. DNA fragmentasyonunun 0,1 MOI SBV ile enfekte hücrelerde enfeksiyonun 72. saatinde gözlenmemesinin, bu hücre grubunda oluşan tam sitolizden veya geç apoptozisten kaynaklanabileceği düşünüldü. Deneydeki negatif kontrol hücrelerinde DNA fragmentasyonu gözlenmezken, staurosporin ile inokule edilen pozitif kontrol hücrelerinde DNA fragmentasyonu gözlemlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. SBV 0,1 MOI ile enfekte edilen hücrelerin agaroz jel elektroforez ile DNA fragmentasyon analizi. NK: Negatif kontrol hücresi, PK: Pozitif kontrol (1 μ M Staurosporin), hat 1: 2. saat, hat 2: 6. saat, hat 3: 12. saat, hat 4: 18. saat, hat 5: 24. saat, hat 6: 36. saat, hat 7: 48. saat, hat 8: 72. saat, M: 1 kb DNA marker (#SM0311, Thermo Fisher, ABD)

DNA fragmentasyonu SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde enfeksiyonun 24. saatinde başladı ve enfeksiyon süresi ilerledikçe fragmentasyon şiddetinin arttığı gözlemlendi. Enfeksiyonun 72. saatinde 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde DNA fragmentasyonunun devam ettiği gözlemlendi. DNA fragmentasyonunun 0,1 MOI SBV ile enfekte hücrelerde 72. saatte gözlenmeyip, 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde gözlenmiş olması viral titrenin hücrelerdeki apoptozis üzerine etkili olduğunu gösterdi. 0,1 MOI deneyindeki gibi, negatif kontrol hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmez iken staurosporin ile inokule edilen pozitif kontrol hücrelerinde DNA fragmentasyonu görüldü (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. SBV 0,01 MOI ile enfekte edilen hücrelerin agaroz jel elektroforez ile DNA fragmentasyon analizi. NK: Negatif kontrol hücresi, PK: Pozitif kontrol (1 μ M Staurosporin), hat 1: 2. saat, hat 2: 6. saat, hat 3: 12. saat, hat 4: 18. saat, hat 5: 24. saat, hat 6: 36. saat, hat 7: 48. saat, hat 8: 72. saat, M: 1 kb DNA marker (#SM0311, Thermo Fisher, ABD)

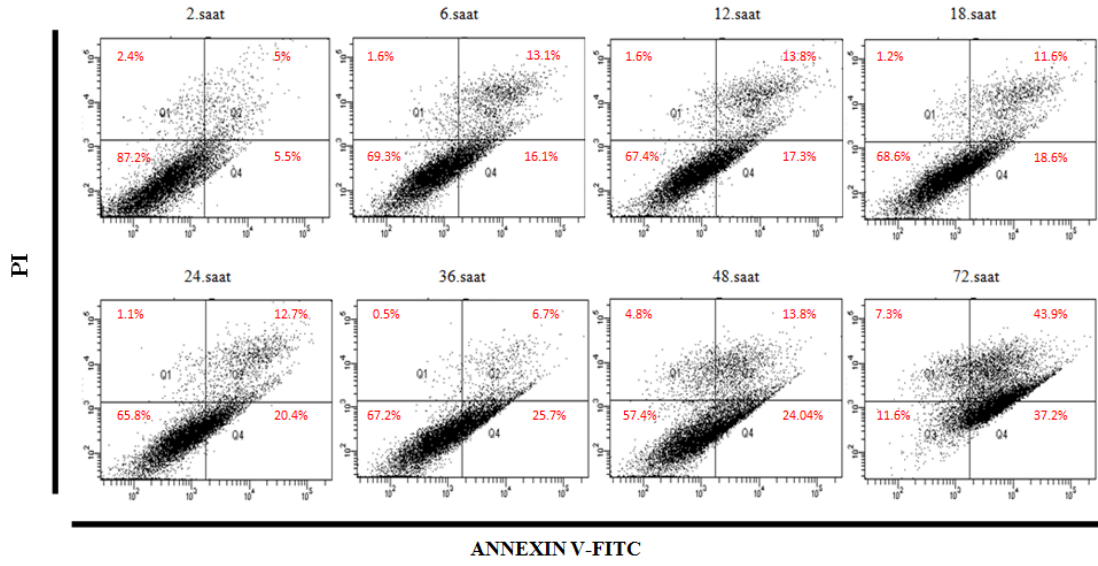
3.4. Annexin V/PI Boyama

Hücrelerde oluşan apoptozisin belirlenmesinde kullanılan Annexin V/PI boyama yöntemi akan hücre ölçer (flow sitometri) analizi ile değerlendirildi. Bu yöntemde hücreler Annexin V-FITC ve PI boya ile boyanma durumlarına göre; canlı (Annexin V - / PI -), erken apoptotik (Annexin V + / PI -), geç apoptotik (Annexin V + / PI +) ve nekrotik (Annexin V - / PI +) olarak değerlendirildi (Şekil 3.9).

PI +	Nekrotik hücreler	Geç apoptotik hücreler
PI -	Sağlıklı canlı hücreler	Erken apoptotik hücreler
	Annexin V -	Annexin V +

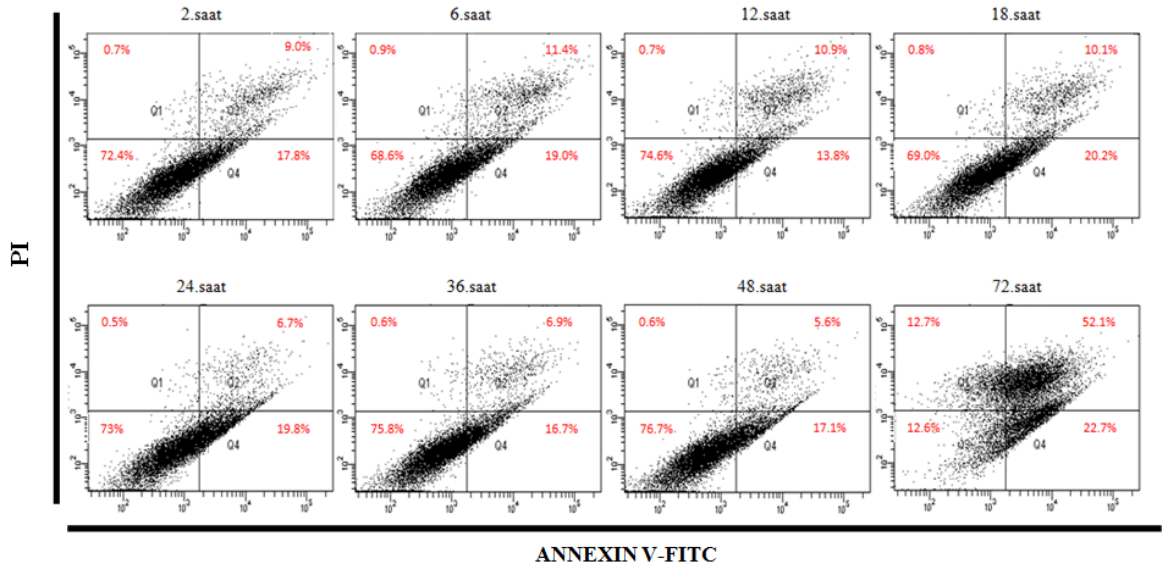
Şekil 3.9. Akan hücre ölçer analizinde hücrelerin Annexin V ve PI boyalarla boyanma şekline göre değerlendirilmesi.

SBV ile 0,1 MOI dozda enfekte hücreler toplandıktan sonra Annexin V-FITC/PI boyama yapılarak akan hücre ölçer ile analizler sürdürüldü. Enfeksiyonun süresi ilerledikçe total canlı hücre (Annexin V - / PI -) oranının azaldığı gözlemlendi. Örneğin; 2. saat enfeksiyonunda canlı hücre oranı %87,2 iken, 72. saatte bu oran %11,6'ya geriledi (Şekil 3.10). SBV 0,1 MOI ile enfekte edilen hücrelerde saatler arasında apoptotik hücre yüzdesi bakımından farklılık gözlemlendi. En yüksek apoptozis oranı; %37,2 erken apoptozis (Annexin V + / PI -) ve %43,9 geç apoptozis (Annexin V + / PI +) oranları ile 72. saat örneğinde belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. SBV 0,1 MOI ile enfekte edilen Vero hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları.

SBV ile 0,01 MOI dozda enfekte hücreler toplandı, Annexin V-FITC/PI boyama yapıldı ve akan hücre ölçer ile analiz edildi. SBV ile 0,01 MOI ile enfekte olan hücreler arasında da en yüksek apoptozis oranı 72. saat örneğinde belirlenirken bu hücrelerde erken apoptozis (Annexin V + / PI -) %22,7 oranında ve geç apoptozis (Annexin V + / PI +) %52,1 oranında gözlemlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. SBV 0,01 MOI ile enfekte edilen Vero hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları.

Vero hücrelerinin enfeksiyonunda kullanılan virüsün titresinin apoptozis oranlarını etkilediği belirlendi. Toplam apoptotik hücre (erken ve geç apoptotik) yüzdesi; 0,1 MOI enfeksiyonunda 72. saatte toplam %81,1 iken, 0,01 MOI enfeksiyonunda 72. saatte bu oran %74,8 olarak bulundu (Şekil 3.9, Şekil 3.10). SBV'nin yüksek MOI enfeksiyonu sonucunda apoptotik hücre oranının arttığı gözlemlendi. Bu tez ile ilk defa Vero hücre hattında SBV ile enfeksiyon sonrasında apoptozisin akan hücre ölçer tekniği ile Annexin V/PI boyama yöntemi kullanılarak belirlendi.

3.5. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 Aktivasyonu

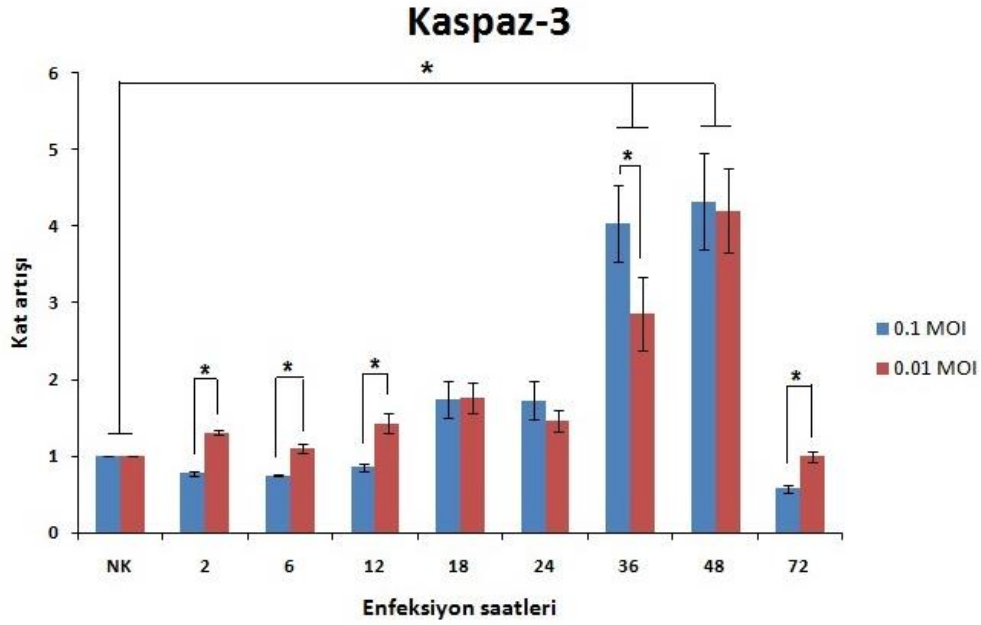
SBV ile enfekte Vero hücrelerinde kaspaz aktivasyonunun belirlenmesi için kolorimetrik kaspaz-3, -8 ve -9 kitleri kullanılarak OD değerleri elde edildi. Enfekte

hücrelerdeki kaspaz aktivasyonu, enfekte olmayan kontrol hücrelerine kıyasla hesaplandı ve OD değerleri kullanılarak kat artışı olarak belirlendi. İstatistiksel anlamlı farklılık, enfekte hücre grupları ile kontrol hücre grubu arasında değerlendirildi.

Kaspaz-3 aktivasyonunda hem 0,1 MOI hem de 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde 36. ve 48. saat enfeksiyonları ile kontrol grubu arasında anlamlı artış belirlendi ($p<0,05$). Enfeksiyonun 2., 6., 12., 36. ve 72. saatlerinde 0,1 MOI ve 0,01 MOI ile enfekte hücre grupları arasında kaspaz-3 aktivasyonunda istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Tüm bu sonuçlar, SBV'nin Vero hücre hattında kaspaz-3 aktivasyonuna her iki dozda da neden olduğunu gösterdi (Şekil 3.12).

Enfeksiyon süresi ilerledikçe hücrelerdeki aktif kaspaz-3 kat artışının da yükseldiği gözlemlendi. Giderek artış gösteren aktif kaspaz-3, 0,1 MOI ile enfekte grupta 36. saatte ortalama 4,03 kat, 48. saatte 4,33 kat arttı. Ancak aynı grubun 72. saat enfeksiyonunda ise 0,58 kat azalış olduğu belirlendi (Şekil 3.12). SBV 0,1 MOI enfeksiyonunun 72. saatinde hücrelerdeki geç apoptozis ve nekroz nedeniyle kaspaz-3 seviyesinin azalabileceği sonucuna varıldı.

Aktif kaspaz-3 0,01 MOI ile enfekte grupta ise 36. saatte ortalama 2,86 kat, 48. saatte 4,20 kat arttı ve 72. saatte 0,99 kat artışı göstererek kontrol grubunun seviyesine ulaştı (Şekil 3.12). 0,01 MOI ile enfekte 72. saat hücrelerinde de kaspaz-3 azalması olması, hücrelerdeki geç apoptotik oranın artışı olarak yorumlandı.

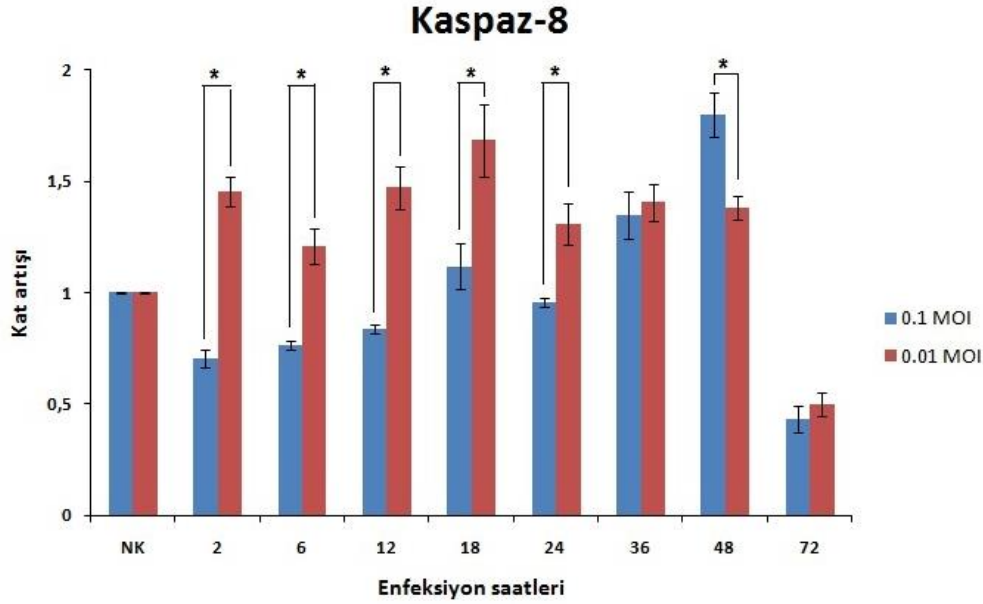


Şekil 3.12. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre kaspaz-3 aktivasyonu. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p < 0,05$) (Kat artışı, enfekte hücrelerin ve kontrol hücrelerinin OD değerleri kullanılarak hesaplandı).

Kaspaz-8 aktivasyonunda 0,1 MOI ile enfekte 2., 6., 36., 48. ve 72. saat hücreleri ile kontrol hücreleri arasında istatistiksel farklılık belirlendi ($p < 0,05$). 0,01 MOI ile enfekte tüm enfeksiyon saatlerinde, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$). SBV ile enfekte hücrelerde kaspaz-8 aktivasyonunun az oranda ancak istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi. Yalnızca 36. ve 72. saatlerde dozlar arasında kaspaz-8 aktivasyonunda istatistiksel farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$). Beklenmedik şekilde kaspaz-8 aktivasyonu 2., 6., 12., 18. ve 24. saatlerde 0,01 MOI enfeksiyonunda 0,1 MOI'ye kıyasla daha yüksek olarak saptandı. SBV ile enfekte hücrelerde kaspaz-8 aktivasyonunun şekillenmesi, SBV'nin hücrelerde apoptozisi dış (ekstrinsik) yolak ile uyardığını gösterdi (Şekil 3.13).

Kaspaz-8 aktivasyonunun 0,1 MOI enfeksiyonda en yüksek olduğu saat 48. saat (1,8 kat artışı) olarak belirlenirken, 72. saatte aktif kaspaz-8'in azaldığı (0,43 kat) görüldü. Kaspaz-8 aktivasyonu 0,01 MOI enfeksiyon grubunda ise saatlere göre değişken bir motif gösterdi. Aktif kaspaz-8 kat artışının en yüksek olduğu saat 1,68

kat artışı ile 18. saat iken, 24. saatte 1,31 kat, 36. saatte 1,4 kat ve 48. saatte 1,38 kat değişim meydana geldi. Aktif kaspaz-8, 72. saatte ise kontrol grubuna göre azalarak 0,5 kat değişim gösterdi (Şekil 3.13).

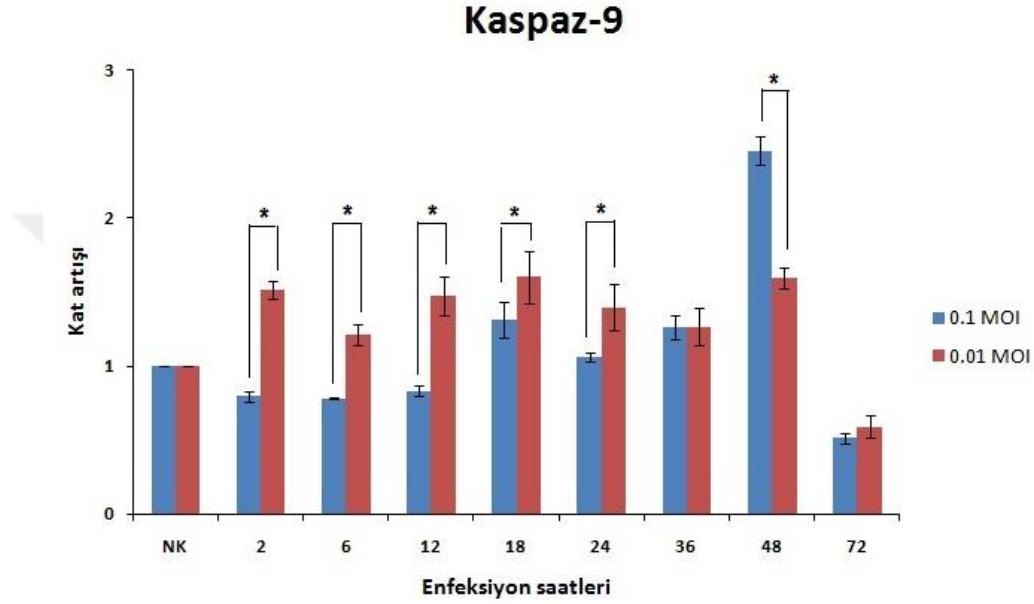


Şekil 3.13. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre kaspaz-8 aktivasyonu. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p < 0,05$) (Kat artışı, enfekte hücrelerin ve kontrol hücrelerinin OD değerleri kullanılarak hesaplandı).

Kontrol grubuna göre 0,1 MOI 2., 6., 12., 18., 36., 48. ve 72. saat enfeksiyon gruplarında kaspaz-9 aktivasyonunda istatistiksel anlamlı farklılık belirlendi ($p < 0,05$). Kontrol hücrelerine kıyasla istatistiksel farklılık, 0,01 MOI ile enfekte 2., 12., 18., 24., 48. ve 72. saat hücrelerinde saptandı ($p < 0,05$). SBV ile enfekte hücrelerde belirlenen kaspaz-9 aktivasyonu, SBV'nin hücrelerde apoptozisi iç (intrinsik) yolak üzerinden uyardığını gösterdi. Kaspaz-9 aktivasyonu yönünden dozlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yalnızca 36. ve 72. saatlerde belirlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 3.14).

Kaspaz-9 aktivasyonunun 0,1 MOI enfeksiyonda en yüksek olduğu saat, 2,46 kat artışı ile 48. saat olarak belirlenirken; 72. saatte aktif kaspaz-9'un azaldığı (0,51 kat) belirlendi. Kaspaz-9 aktivasyonu da kaspaz-8 gibi 0,01 MOI enfeksiyon

grubunda saatlere göre değişken bir motif gösterdi. Aktif kaspaz-9 kat artışının en yüksek olduğu saat 1,6 kat artışı ile 18. saat olarak belirlenirken; 24. saatte 1,4 kat, 36. saatte 1,27 kat ve 48. saatte 1,59 kat değişim meydana geldi. Aktif kaspaz-9, 72. saatte ise kontrol grubuna göre azalarak 0,59 kat değişim gösterdi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre kaspaz-9 aktivasyonu. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p < 0,05$) (Kat artışı, enfekte hücrelerin ve kontrol hücrelerinin OD değerleri kullanılarak hesaplandı).

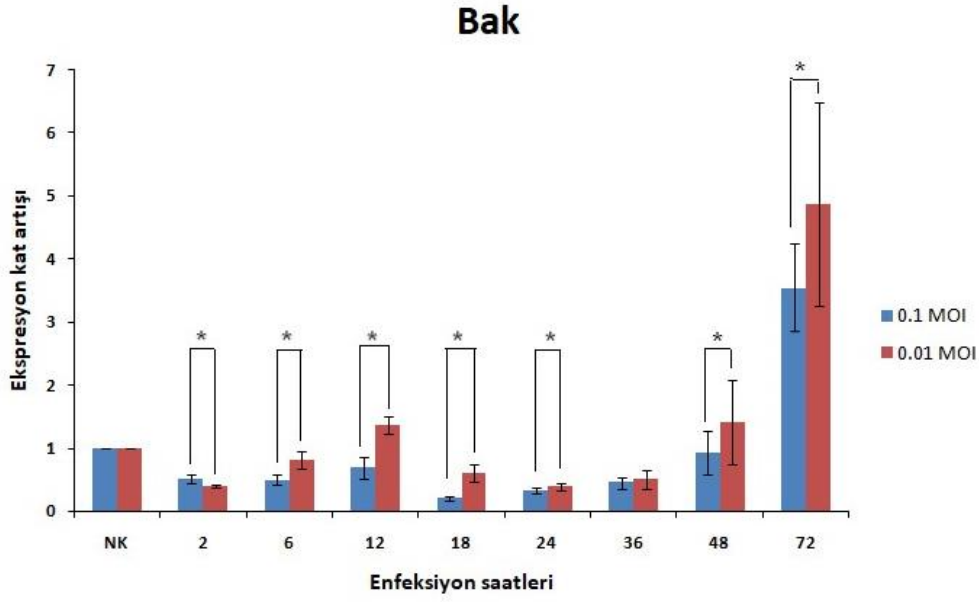
3.6. Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Genlerin Ekspresyonu

SBV'nin Vero hücrelerinde apoptozisi indüklediği DNA fragmentasyonu, fosfatidilserin eksternalizasyonu ve kaspaz aktivasyonu ile belirlendikten sonra, hücrelerde enfeksiyonu takip eden süreçte pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerdeki

ekspresyon değişimleri analiz edildi. Hücrelerde pro-apoptotik genlerden *Bak*, *Bax*, ve *Puma* genleri, anti-apoptotik genlerden ise *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genleri incelendi. Ekspresyon analizi için normalizasyonda *GAPDH* geni referans gen olarak seçildi.

SBV 0,1 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bak* geninin ekspresyon seviyelerinin enfeksiyon saatleri arasında istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlendi. Enfeksiyondan 2 ve 6 saat sonraki örneklerin 48. ve 72. saat örnekleriyle, 12. saatin 18., 24. ve 72. saat örnekleriyle, 18. ve 24. saatin 12., 48. ve 72. saat örnekleriyle aralarında istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi. SBV enfekte 36. saat örneği 48. ve 72. saat örnekleriyle, 48. saat örneği 2, 6, 18, 24, 36 ve 72 saat örnekleriyle, 72. saatin ise tüm örneklerle istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$). SBV 0,01 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bak* geninin ekspresyon seviyelerinin 2., 18., 24. ve 36. saatlerde 12., 48. ve 72. saat örnekleriyle, 6. saatin yalnızca 72. saatle, 12. ve 48. saatlerde 2., 18., 24., 36. ve 72. saat örnekleriyle aralarında anlamlı farklılık belirlenirken 72. saat örneği tüm örneklerle anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,05$). SBV'nin 0,1 ve 0,01 MOI ile arasında *Bak* geninin ekspresyonunun değişmesi bakımından yalnızca 36. saat örneğinde anlamlı farklılık belirlenmedi (Şekil 3.15).

Bak geninde, 48. saatte 0,1 MOI'de 0,93 kat, 0,01 MOI'de 1,41 kat ekspresyon değişimi olduğu belirlendi. Enfeksiyonun 72. saatinde ise *Bak* geni ekspresyonunda 0,1 MOI'de 3,54 kat, 0,01 MOI'de 4,87 kat artış gözlemlendi (Şekil 3.15).

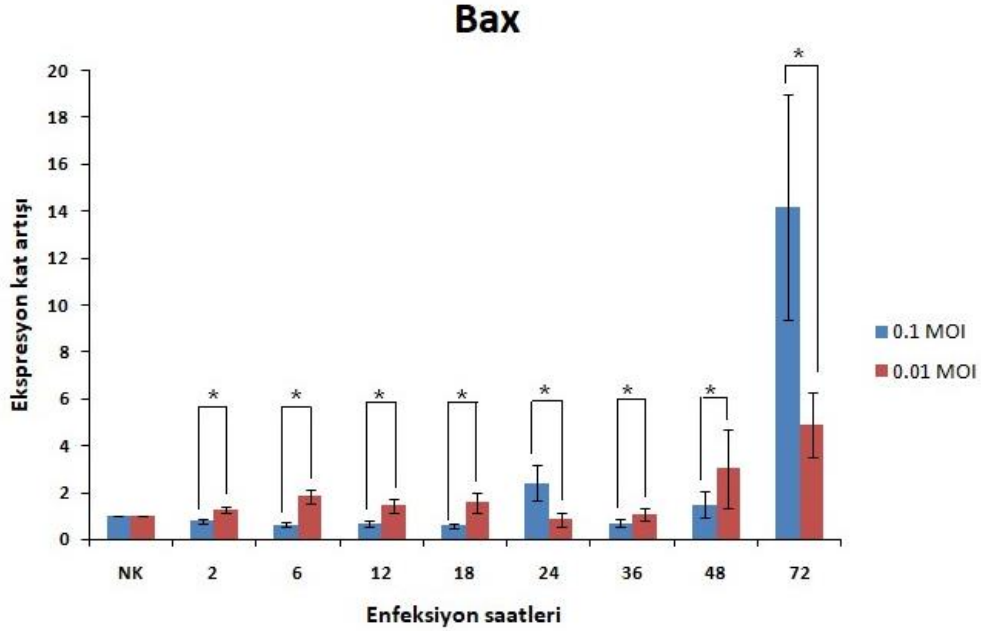


Şekil 3.15. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre *Bak* geni ekspresyonundaki değişimler. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0,05$)

SBV ile 0,1 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bax* geninin ekspresyon seviyeleri yalnızca 72. saat örneğinin diğer örneklerle arasında anlamlı farklılık belirlendi ($p<0,05$). SBV ile 0,01 MOI ile enfekte olan hücrelerde ise *Bax* geninin ekspresyon seviyelerinin 2., 12., 18. ve 36. saatlerde 48. ve 72. saat örnekleriyle, 6. saatin 24.,48. ve 72. saat örnekleriyle, 24. saatin 6., 48. ve 72. saat örnekleriyle aralarında anlamlı farklılık belirlenirken 48. ve 72. saat örneklerinin tüm örneklerle anlamlı farklılık gösterdiği saptandı ($p<0,05$). SBV'nin 0,1 ve 0,01 MOI titreleri arasında *Bax* geninin ekspresyonunun değişmesi bakımından tüm saatlerde anlamlı farklılık belirlendi (Şekil 3.16).

SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde *Bax* geni ekspresyonunda 24. saatte 2,39 kat artış gözlenirken, 36. saatte azalma (0,68 kat değişim) belirlendi. Enfeksiyonun 48. saatinde ise 1,48 kat değişim ile tekrar artış gösterdiği saptandı. En yüksek *Bax* geni ekspresyonu değişimi ise enfeksiyonun 72. saatinde 14,18 kat artış olarak belirlendi. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde *Bax* geni ekspresyonunun 24. saat

haricindeki tüm enfeksiyon saatlerinde artış gösterdiği belirlendi. En yüksek kat artışı ise 4,87 kat değişimi ile 72. saatte belirlendi (Şekil 3.16).

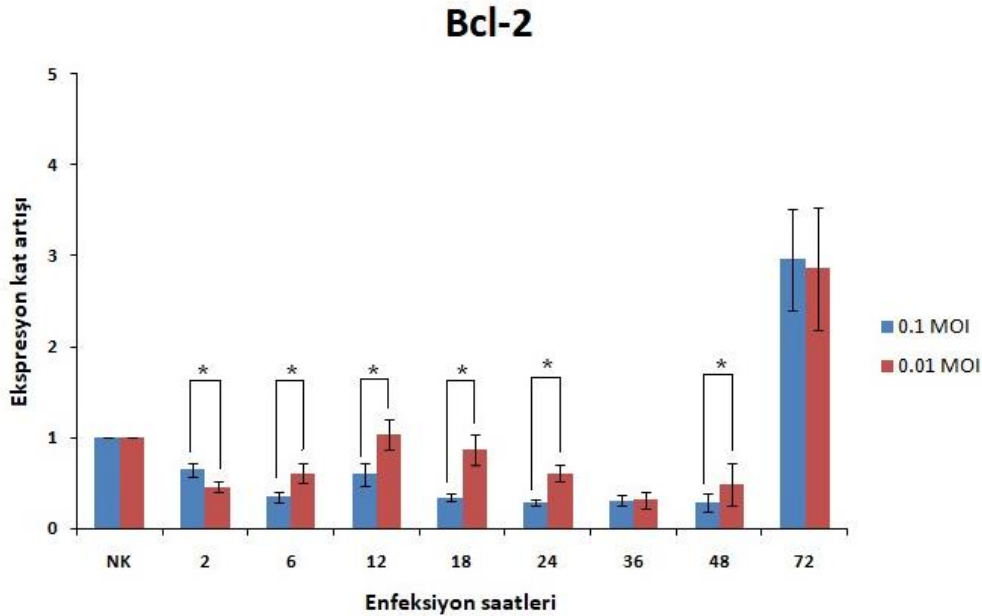


Şekil 3.16. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre *Bax* geni ekspresyonundaki değişimler. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0,05$)

SBV ile 0,1 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyeleri, enfeksiyondan 2 ve 12 saat sonraki örneklerin 6., 18., 24., 36., 48. ve 72. saat örnekleriyle, 6., 18., 24., 36. ve 48. saat örneklerinin 2., 12. ve 72. saat örnekleriyle, 72. saatin ise tüm örneklerle istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptandı ($p<0,05$). SBV ile 0,01 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyelerinin 2., 36. ve 48. saatlerin 12., 18. ve 72. saat örnekleriyle, 6. ve 24. saatin 12. ve 72. saatle, 12. saatin 2., 6., 24., 36., 48. ve 72. saatlerle, 18. saat örneğinin 2., 36., 48. ve 72. saatlerle aralarında anlamlı farklılık belirlenirken 72. saat örneği tüm örneklerle anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,05$). SBV'nin 0,1 ve 0,01 MOI titreleri arasında *Bcl-2* geninin ekspresyonununun değişmesi

bakımından yalnızca 36. ve 72. saat örneklerinde anlamlı farklılık belirlenmedi (Şekil 3.17).

SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde *Bcl-2* geni ekspresyonunda sadece 72. saatte 2,96 kat artışı gözlenirken, diğer enfeksiyon saatlerinde ise genin azaldığı belirlendi. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde ise 12. saatte 1,03 kat değişimi ile kontrol hücre grubu seviyesine yükselirken, 72. saatte *Bcl-2* geninde 2,85 kat artış belirlendi. Diğer enfeksiyon saatlerinde ise azalma olduğu saptandı (Şekil 3.17).

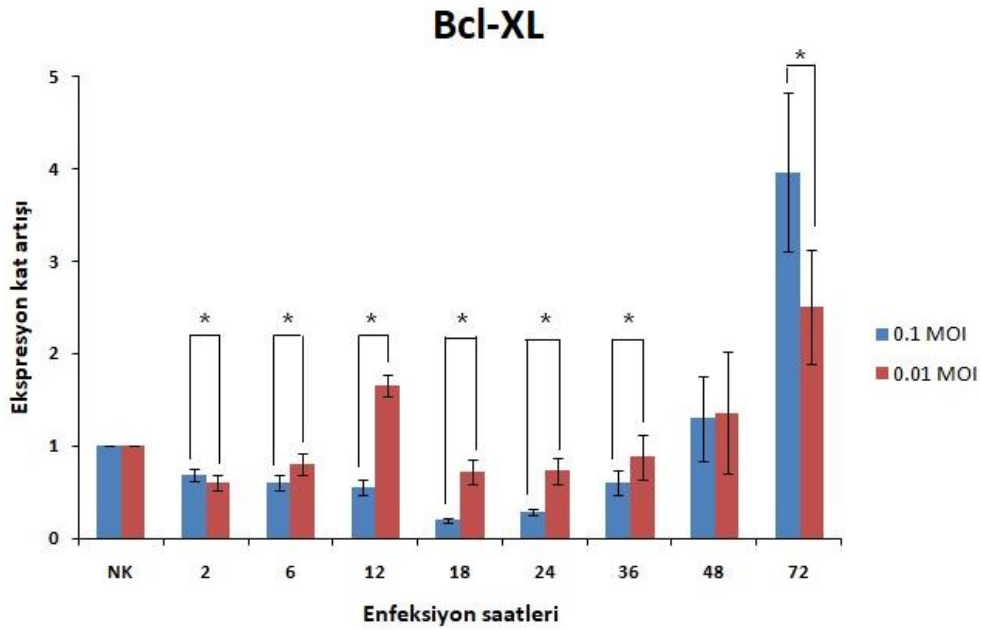


Şekil 3.17. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre *Bcl-2* geni ekspresyonundaki değişimler. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p < 0,05$)

SBV ile 0,1 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bcl-XL* geninin ekspresyon seviyeleri 2. saatte 18., 24., 48. ve 72. saatlerle, 6. ve 36. saatlerde 18., 48. ve 72. saat örnekleriyle, 12. saatte 48. ve 72. saatlerle, 18. saatte 2., 6., 36., 48. ve 72. saat örnekleriyle, 24. saatte 2., 48. ve 72. saat örnekleriyle, 48. ve 72. saatlerin ise tüm örneklerle istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptandı ($p < 0,05$). SBV ile 0,01 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Bcl-XL* geninin ekspresyon seviyelerinin 2., 6.,

18., 24., ve 36. saatlerde 12., 48. ve 72. saat örnekleriyle, 12. ve 48. saatin 2., 6., 18., 24., 36. ve 72. saatle, 72. saat örneğinin ise tüm örneklerle arasında anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). SBV'nin 0,1 ve 0,01 MOI titreleri arasında *Bcl-XL* geninin ekspresyonunun değişmesi bakımından yalnızca 48. saat örneğinde anlamlı farklılık belirlenmedi (Şekil 3.18).

SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde *Bcl-XL* geni ekspresyonunda 48. saatte 1,30 kat; 72. saatte 3,96 kat artışı belirlendi. Diğer enfeksiyon saatlerinde ise *Bcl-XL* geninde azalma olduğu saptandı. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde 12. saatte 1,65 kat; 48. saatte 1,36 kat ve 72. saatte 2,51 kat artışı belirlenirken diğer enfeksiyon saatlerinde *Bcl-XL* geninde azalma belirlendi (Şekil 3.18).

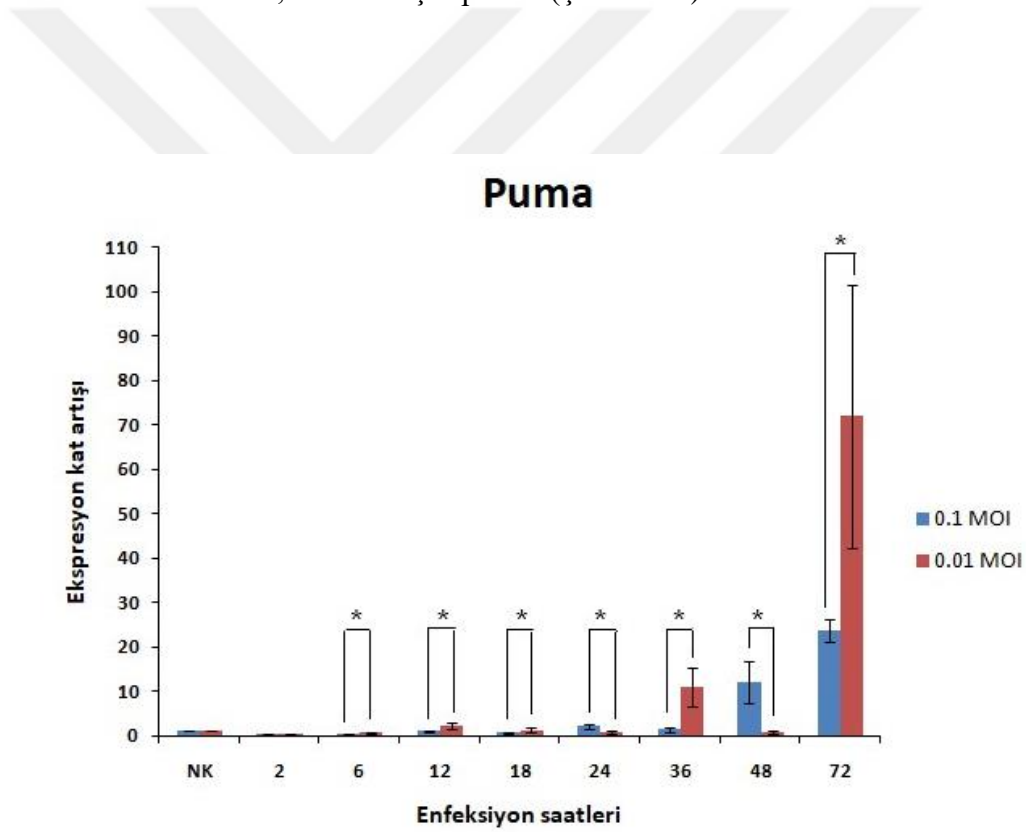


Şekil 3.18. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre *Bcl-XL* geni ekspresyonundaki değişimler. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0,05$)

SBV ile 0,1 MOI ile enfekte olan hücrelerde *Puma* geninin ekspresyon seviyelerinin yalnızca 48. ve 72. saatte alınan örneklerin diğer örneklerle arasında

anlamli farklılık gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). SBV ile 0,01 MOI titrede enfekte olan hücrelerde ise *Puma* geninin ekspresyon seviyeleri arasında sadece 72. saatte tüm örneklerle anlamli farklılık gösterdiği saptandı ($p<0,05$). SBV'nin 0,1 ve 0,01 MOI titreleri arasında *Puma* geninin ekspresyonunun değişmesi bakımından yalnızca 2. saatte anlamli farklılık belirlenmedi (Şekil 3.19).

Puma geni, SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde enfeksiyon saati ilerledikçe artış göstererek 48. saatte 11,98 kat; 72. saatte 23,80 kat artış belirlendi. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde *Puma* geni ekspresyonu 12., 18., 36. ve 72. saatlerde artış gösterirken diğer saatlerde azaldığı belirlendi. Enfeksiyonun 36. saatinde 10,91 kat; 72. saatinde ise 71,97 kat artış saptandı (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. SBV ile enfekte Vero hücrelerinde saatlere göre *Puma* geni ekspresyonundaki değişimler. NK: Negatif kontrol hücre grubu. * istatistiksel anlamli farklılık ($p<0,05$)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Viral enfeksiyonlarda hücre ölümünün kontrol edilmesi viral proteinler tarafından apoptozisin engellenmesi veya uyarılması ile sürdürülmektedir. Enfekte hücrelerde apoptozisin engellenmesi, persiste enfeksiyonun kurgulanması ve viral replikasyonun tamamlanabilmesi için gereklidir. Bazı virüsler ise enfekte ettikleri hücrelerde litik enfeksiyon oluşturmak veya yangı oluşturmadan viral yayılmayı sağlamak amacı ile apoptozisi uyarırlar.

Virüslerin enfekte ettikleri hücrelerde apoptozisi *in vitro* veya *in vivo* olarak engellemesi veya uyarması, virüslerin moleküler patogenezinin anlaşılması bakımından önem arz etmektedir. Bu nedenle, pek çok virüsün farklı hücre hatlarında *in vitro* olarak ve farklı hayvanlarda veya dokularda *in vivo* olarak apoptotik etkileri araştırılmıştır. SBV'nin de üyesi olduğu *Peribunyaviridae* ailesinin farklı üyeleri ile yapılan çalışmalarda apoptotik etkilerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Bu aileye ait Akabane, Aino, Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve Oropouche virüsleri gibi bazı virüsler apoptozisi indüklemektedir (Lim ve ark. 2005, Acrani ve ark. 2010, Rodrigues ve ark. 2012, Mitomo ve ark. 2016). Aynı ailenin üyeleri olan Hantaan virüs, Andes virüs, Puumala virüs, Seoul virüs, Prospect Hill virüs ve Tula virüs ise hücrelerde apoptozisi engellemektedir (Solà-Riera ve ark. 2019a, Solà-Riera ve ark. 2019b).

Virüslerin farklı hücre hatlarındaki apoptotik etkileri de değişim göstermektedir. Örneğin, Hazara virüs kene hücre hattında (HAE/CTVM9) apoptozisi inhibe etmesine rağmen (Fuller ve ark. 2019), insan hücre hatlarında (SW13 ve A549) apoptozisi indüklemektedir (Matsumoto ve ark. 2019, Fuller ve ark. 2019). Öte yandan bir virüs enfekte ettiği hücrede apoptozisi hem indükleyip hem de inhibe edebilmektedir. Örneğin, KKKA virüsü enfeksiyonun erken evrelerinde apoptozisi inhibe ederken (Karlberg ve ark. 2015), enfeksiyonun geç evrelerinde ise apoptozisi indüklemektedir (Karlberg ve ark. 2011, Karlberg ve ark. 2015).

Peribunyaviridae ailesinin üyesi olan SBV'nin ise apoptotik etkisi ile ilgili detaylı bir çalışma mevcut değildir. SBV'nin apoptotik etkisi *in vitro* olarak CPT-Tert ve HEK-293T hücrelerinde sadece kaspaz-3/-7 aktivasyonu yönünden Barry ve arkadaşları (2014) tarafından incelenmiştir. Araştırmacılar çalışma sonuçlarına göre SBV NSs proteininin apoptozisi artırıcı etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Barry ve ark. 2014). Bu tez çalışması ile SBV'nin Vero hücre hattında *in vitro* apoptotik etkisi pek çok farklı yöntem kullanılarak araştırıldı ve virüsün kullandığı yollar detaylı olarak ilk defa incelendi.

SBV'nin *in vivo* apoptotik etkisi günümüze kadar sadece NIH-Swiss farelerde test edilmiş ve SBV'nin NSs proteininin farelerde ise apoptozis üzerine etkili olabileceği rapor edilmiştir (Barry ve ark. 2014). Bu tez çalışmasında ise SBV'nin sadece *in vitro* apoptotik etkisi araştırıldı. Bu kapsamda SBV'nin *in vivo* apoptotik etkisinin özellikle ruminantlarda araştırılması konusunda bilimsel boşluk görülmektedir.

Hücrelerde apoptozisin tetiklenmesinin belirlenmesi için kullanılan pek çok kriter ve özellik vardır. DNA fragmentasyonu, kaspaz aktivasyonu, kaspaz, PARP gibi apoptozis ilişkili proteinlerin parçalanması, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçmesi, pro-apoptotik gen ekspresyonunda artış, fosfatidilserin moleküllerinin hücre yüzeyine konumlanması gibi özellikler farklı teknikler yardımı ile hücrelerde apoptozisin belirlenmesi için en yaygın ve güvenilir olarak kullanılan apoptotik değişimlerdir. Bu tez kapsamında, DNA fragmentasyonu, fosfatidilserinlerin hücre yüzeyine konumlanması, kaspaz aktivasyonu ve apoptozis ilişkili pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonları incelenerek SBV'nin apoptotik etkisi araştırıldı. Bu özelliklerin incelenmesinde sırasıyla, agar jel elektroforez, Annexin V/PI boyama ile akan hücre ölçer, kolorimetrik kaspaz kitleri ve real-time PZR yöntemleri kullanıldı. Tezde kullanılan tüm bu yöntemler pek çok farklı apoptozis araştırmasında da yaygın olarak kullanılmasına rağmen, SBV için ilk defa bu tez kapsamında kullanıldı.

DNA fragmentasyonu, hücrelerdeki apoptozisin belirlenmesinde kullanılan en temel testlerden birisidir ve hücrelerden elde edilen DNA örneklerinin agar jel

elektroforezi ile kolayca tespit edilebilmektedir. Bu tez kapsamında yapılan DNA fragmentasyon deneyinde, SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde DNA fragmentasyonu ilk olarak 18. saat enfeksiyonunda başlarken, 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde enfeksiyonun 24. saatinde başladığı gözlemlendi. DNA fragmentasyonu, virüsün türü, virüsün dozu ve enfeksiyonun saati ile değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin, SBV gibi *Peribunyaviridae* ailesinin bir üyesi olan Oropouche virüsün 10 MOI dozu ile enfekte edilmiş olan He-La hücreleri ile yapılan agar jel elektroforez sonucunda, DNA fragmentasyonunun enfeksiyonun 24. saatinde başladığı Acrani ve arkadaşları (2010) tarafından bildirilmiştir. Diğer virüs ailelerine ait virüslerle yapılan çalışmalarda da doz ve enfeksiyon saatinin DNA fragmentasyonuna etkisi görülmüştür. Influenza virüs H9N2 izolatının 2 MOI dozu ile enfekte edilen A549 hücrelerinde 16. saatte fragmentasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (Shahsavandi ve ark. 2013). Öte yandan, bazı virüslerin dozları ise DNA fragmentasyonuna etki etmemektedir. Örneğin, insan glioblastoma hücrelerinde (U-87 MG) chikungunya virüsün 0,1, 1 ve 10 MOI dozları ile yapılan enfeksiyonların tümünde DNA fragmentasyonunun 48. saatte başladığı bildirilmiştir (Abraham ve ark. 2013). Aynı aile hatta cins içinde yer alan farklı tür virüslerin, aynı hücre hattında DNA fragmentasyonu oluşturdukları enfeksiyon saatleri farklılık gösterebilmektedir. Lim ve arkadaşları (2005) ise, SBV ile aynı cins içinde sınıflandırılan (*Orthobunyavirus*) Akabane ve Aino virüsleri ile Vero hücrelerini enfekte etmişlerdir. Araştırmacılar, her iki virüsün de DNA fragmentasyonunu enfeksiyonun 48. saatinde başlattığını ve son DNA fragmentasyonunun 96. saatte gözlemlendiğini belirlemişlerdir. Tüm bu araştırmalara ait veriler göz önüne alındığında, SBV'nin farklı dozlarının Vero hücre hattında DNA fragmentasyonuna etki ettiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Sağlıklı fizyolojik koşullardaki hücrelerde fosfatidilserin molekülleri hücre membranının iç katmanında konumlanmaktadır. Hücrelerde apoptozis başladığında ise fosfatidilserinler hücre membranının dış katmanına geçmekte ve fagositik hücrelere fagositoz için sinyal göndermektedir (Segawa ve Nagata 2015). Bir antikoagülan protein olan Annexin V'in fosfatidilserinlere bağlanma özelliği kullanılarak hücrelerdeki apoptozis belirlenebilmektedir. Annexin V ile birlikte, bir hücre membran permeabilite belirteci olan ve DNA'ya bağlanan propidium iodid

(PI) kullanılarak hücrelerdeki canlılık, apoptozis ve nekrozis belirlenebilmektedir (Wlodkowic ve ark. 2009).

Bu tez ile, Annexin V/PI boyama ve akan hücre ölçer analizi SBV için ilk kez yapıldı. SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde %37,2 erken apoptozis ve %43,9 geç apoptozis oranları ile 72. saat örneğinde en yüksek oranlar belirlendi. SBV ile 0,01 MOI ile enfekte olan hücreler arasında da en yüksek apoptozis oranı yine 72. saat örneğinde belirlenirken bu hücrelerde erken apoptozis %22,7 ve geç apoptozis %52,1 oranında gözlemlendi.

Annexin V/PI boyama ile belirlenen apoptotik hücre oranları virüsün türüne, suşuna, dozuna, kullanılan hücre tipine ve enfeksiyon saatlerine göre farklılık göstermektedir. Saxena ve arkadaşlarının (2013) köpek parvovirüs-2 NS-1 ile transfekte ettikleri HeLa hücresindeki çalışmada, 24. saatte %75 erken apoptozis, %12 geç apoptozis belirlemişlerdir. Aynı çalışmada enfeksiyonun 72. saatinde ise erken apoptozis %61, geç apoptozis ise %19 olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, insan fütal astrosit hücre hattında insan herpesvirüsü-6A ile oluşturulan enfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerdeki apoptozis oranı Annexin V/PI ile belirlendiğinde apoptotik hücrelerin oranı sırasıyla yaklaşık %4,7, %7,7 ve %23,4 olarak bulunmuştur (Gu ve ark. 2011). Bu tez çalışması verileri haricinde, SBV için Annexin V/PI boyama ile akan hücre ölçer tekniğini kullanan başka bir çalışma literatürde henüz mevcut değildir.

SBV gibi *Orthobunyavirus* cinsinde sınıflandırılan Bunyamwera virüs ile yapılan bir çalışmada, IFN sistemi tam olan 2fTGH (insan fibrosarkom hücre hattı) ve IFN sistemi olmayan 2f/SV5-V (Simian virüs 5'in V proteinini eksprese eden insan fibrosarkom hücre hattı) hücrelerinde hem vahşi tip virüsün hem de NSs geni silinmiş virüsün oluşturduğu apoptotik etki Annexin V boyama ile akan hücre ölçerde analiz edilmiştir. Çalışmada, vahşi tip Bunyamwera virüs ile enfekte 2fTGH hücrelerinde 24. saatte toplam %12 apoptotik hücre, 2f/SV5-V hücrelerinde ise 24. saatte toplam %18 apoptotik hücre belirlenmiştir. NSs geni silinmiş Bunyamwera virüs ile enfekte edilen 2fTGH ve 2f/SV5-V hücrelerinde 24. saatte sırasıyla %25 ve %31 apoptotik hücre saptandığı bildirilmiştir (Kohl ve ark. 2003). Bu tez

çalışmasında kullanılan Vero hücre hattı da IFN tip I yanıtı olmayan bir hücre hattıdır (Chew ve ark. 2009). Vahşi tip Bunyamwera virüsün 1 MOI dozu ile 2f/SV5-V hücrelerindeki enfeksiyonu sonucunda 24. saatte toplam %18 apoptotik hücre belirlendiği rapor edilmiştir (Kohl ve ark. 2003). Bu tezde ise, SBV'nin 0,1 MOI dozu ile enfekte Vero hücrelerinde 24. saatte toplam apoptotik hücre oranı %33,1 olarak belirlendi. SBV'nin 0,01 MOI dozu ile enfeksiyonun 24. saatinde ise toplam apoptotik hücre oranı %26,5 olarak bulundu. Her ikisi de *Orthobunyavirus* cinsinin Simbu serogrubuna üye olan Bunyamwera virüs ile SBV'nin, IFN yetersiz hücre hatlarındaki apoptotik etkisinin akan hücre ölçer analizi sonuçları kıyaslandığında SBV'nin daha fazla oranda apoptozise neden olduğu görülmektedir. Ancak SBV'nin, 2f/SV5-V hücresi gibi diğer IFN yetersiz hücre hatlarındaki apoptotik etkisi henüz bilinmemektedir. Öte yandan SBV'nin NSs geni silindiğinde Vero hücre hattındaki apoptotik etkisi de henüz araştırılmamıştır.

Bunyavirales takımında yer alan HTNV ile enfekte insan embriyonik akciğer fibroblast (HEPF; human embryonic pulmonary fibroblasts) hücre hattında 24. saatte %3,28 oranında Annexin V pozitif hücre belirlendiği rapor edilmiştir (Xu ve ark. 2005). *Bunyavirales* takımındaki bazı virüsler ile ilgili çalışmalarda ise Annexin V boyama ile apoptozisin belirlenmesinde akan hücre ölçer analizi yerine floresan mikroskopisi kullanılmıştır (Ding ve ark. 2005). Bu nedenle tez çalışmasında elde edilen akan hücre ölçer sonuçları, *Bunyavirales* takımındaki bazı virüslere ait sonuçlarla kıyaslanamamıştır.

Kaspazlar, apoptozisin başlamasında ve sonlanmasında önemli derecede etkili olan sistein proteazlarıdır ve apoptozis sırasında hücredeki özgün substratlarını parçalar. Kaspazlar hem hücrelerdeki apoptozisin hem de apoptozisin iki temel yolağının belirlenmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında apoptoziste efektör kaspaz olan kaspaz-3 aktivasyonu kolorimetrik kit ile analiz edildi ve SBV ile enfekte Vero hücrelerinde apoptozisin tetiklenip tetiklenmediği belirlendi. Tez kapsamında buna ilaveten SBV'nin Vero hücresinde hangi apoptotik yolağı/yolakları kullandığının belirlenmesi için kaspaz-8 ve -9 aktivasyonu da yine kolorimetrik kitler ile incelendi. Kaspaz-8 dış yolak aktivasyonunun, kaspaz-9 ise iç yolak aktivasyonunun belirlenmesi için analiz edildi.

Bunyavirales takımında yer alan bazı virüslerin neden olduğu kaspaz aktivasyonu veya inhibisyonu, bazı çalışmalarda vestern blotlama ile gösterilirken (Karlberg ve ark. 2011, Karlberg ve ark. 2015, Matsumoto ve ark. 2019), bazı çalışmalarda ise kaspaz aktivasyonu belirlenmesi için florometrik kitler kullanılmıştır (Acrani ve ark. 2010, Ontiveros ve ark. 2010). Bu tez çalışmasında ise kaspaz aktivasyonunun belirlenmesinde kolorimetrik kaspaz kitler kullanılmış ve hücrelerdeki kaspaz aktivasyonu kat artışı olarak belirlenmiştir.

Tezde yapılan tüm kaspaz deneyleri sonucunda SBV ile enfekte Vero hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un aktive olduğu belirlenerek, SBV'nin apoptozisi uyardığı ve hem dış hem de iç yolakları kullandığı saptandı. Bu tez haricinde, yalnızca tek bir çalışmada SBV kaspaz aktivasyonu yönünden araştırılmıştır. Barry ve arkadaşları (2014) SBV'nin CPT-Tert ve HEK-293T hücrelerinde kaspaz-3/-7 aktivasyonuna neden olduğunu florometrik kit ile belirlemişlerdir. Ancak söz konusu çalışmada yalnızca kaspaz-3/-7 aktivasyonu analiz edilmiş, apoptozisin yolaklarına ilişkin bir deney yapılmamıştır (Barry ve ark. 2014).

Bu tez çalışmasında ise kaspaz-3 aktivasyonunun yanı sıra kaspaz-8 ve -9 aktivasyonları da incelendi. Dış yolakta etkili olan kaspaz-8 aktivasyonu, SBV ile enfekte Vero hücrelerinde hafif fakat istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. Böylece SBV'nin Vero hücrelerinde kaspaz-8 aktivasyonuna neden olduğu ve dış yolağı kullandığı belirlendi. Kaspaz-8 aktivasyonu 0,01 MOI enfeksiyonunda 2., 6., 12., 18. ve 24. saatlerde, 0,1 MOI ile enfekte hücelere kıyasla daha yüksek olarak saptandı. SBV'nin Vero hücresinde uyardığı apoptozisin ayrıntılı bir başka bilimsel çalışmada incelenmesi ile bu durum aydınlatılabilecektir. Tez kapsamında SBV'nin Vero hücrelerinde kaspaz-9 aktivasyonuna neden olduğu ve iç yolağı da kullandığı belirlendi. Tüm bu veriler, SBV'nin Vero hücresinde apoptozisi hem iç yolak hem de dış yolak üzerinden uyardığını gösterdi. SBV gibi *Bunyavirales* takımında sınıflandırılan KKKA virüsü ve Punta Toro virüsün de apoptozisi hem iç hem dış yolak üzerinden uyardığını bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur (Li ve ark. 2010, Barnwal ve ark. 2016).

Bcl-2 ailesinin üyeleri olan proteinler hem apoptoziste hem de hücrel diğ er reaksiyonlarda oldukça önemlidir. Apoptoziste Bcl-2 ailesi üyelerinin temel fonksiyonu ya apoptozisi inhibe etmek yani anti-apoptotik etkidir ya da apoptozisi indüklemek yani pro-apoptotik etkidir. Bcl-2 proteinlerinin apoptozis üzerine bu etkileri mitokondriyal dış membran permeabilitesi (MOMP) üzerinedir (Tsujimoto 1998, Shamas-Din ve ark. 2013). Bu tez çalışmasında SBV ile enfekte Vero hücrelerinde, enfeksiyonu takiben pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarındaki değişim incelendi. Pro-apoptotik genlerden *Bak*, *Bax* ve *Puma*; anti-apoptotik genlerden ise *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerinin hücredeki ekspresyonları real-time PZR ile analiz edildi ve gen seviyelerindeki değişimler *GAPDH* genine göre normalize edildi. SBV için bu genlerin ekspresyonlarının incelendiği başka bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Hücrede apoptozisin indüklenmesi ile birlikte pro-apoptotik genler arasında yer alan *Bak* geninin ekspresyon seviyesi artış göstermektedir. Bu tez çalışmasında SBV ile enfekte Vero hücrelerinde *Bak* geninin ekspresyonundaki artış en yüksek olarak 72. saatte belirlendi. *Bak* geni ekspresyonunda 72. saatte 0,1 MOI enfeksiyonunda 3,54 kat, 0,01 MOI enfeksiyonunda ise 4,87 kat artış saptandı. Bu sonuç, SBV'nin enfekte ettiği Vero hücrelerinde pro-apoptotik gen olan *Bak* genini artırdığını ve apoptozisi indüklediğini gösterdi. Li ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada, Orf virüsünün HEK293T hücrelerindeki enfeksiyonundan 24 ve 48 saat sonra *Bak* proteinini artırdığını bulmuşlardır. Vestern blotlama ile enfeksiyonun 24. saatinde yaklaşık 4 kat, 48. saatinde ise yaklaşık 5 kat artış saptadıklarını bildirmişlerdir (Li ve ark. 2018). Hepatitis C virüsü ile enfekte insanlara ait dokularda ve HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada ise doku ve hücrelerdeki *Bak* geninin ekspresyonunun artış gösterdiği RT-PZR ile gösterilmiştir. Doku ve hücrelerde apoptozisin başlaması ve artışıyla birlikte *Bak* geninde de artış gözleendiği bildirilmiştir (Zekri ve ark. 2011). Bir başka çalışmada ise, infeksiyöz bronşitis virüsü (IBV) ile enfekte edilen Vero ve tavuk fibroblast hücreleri ile embriyolu tavuk yumurtasında *Bak* geninde ekspresyon artışı belirlenmiştir. IBV ile 1 MOI ile enfekte edilen tavuk fibroblast hücrelerinde 8 ve 16 saat sonra *Bak* geninin sırasıyla 1,39 ve 2,09 kat, tavuk embriyolarında ise 48 saat sonra 2,37 kat artış gösterdiği RT-PZR ile gösterilmiştir. IBV ile enfekte Vero hücrelerinde *Bak* geninin 24. saatte 3,38 kat

arttığı western blotlama ile tespit edilmiştir. Tavuk embriyosundaki *Bak* geninin artışının real-time PZR ile de gösterildiği çalışmada IBV enfeksiyonundan 48 saat sonra 6,41 kat artış olduğu belirlenmiştir (Zhong ve ark. 2012). Yapılan bilimsel çalışmalar göz önüne alındığında SBV'nin de Vero hücrelerinde *Bak* artışına neden olarak apoptozisi indüklediği görülmektedir. Literatürde *Bunyavirales* takımındaki diğer virüslere ait *Bak* geninin ekspresyon seviyesinin incelendiği herhangi bir başka çalışma ise bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda bazı virüslerin ise Bak proteini ile etkileşime girdiği belirlenmiştir. Örneğin, papillomavirüs tip 6 ve 11'in E6 proteini ile transfekte edilmiş olan 293T hücrelerinde Bak proteinini proteazomal yıkımlama ile parçaladığını ve hücrelerde apoptozisi engellediği bildirilmiştir (Underbrink ve ark. 2016). Tavuk poksvirüsü ile yapılan bir çalışmada ise virüsün FPV039 proteininin hücrelerdeki Bak proteinine bağlandığı ve hücrede apoptozisi engellediği bildirilmiştir (Anasir ve ark. 2017). Bir başka çalışmada araştırmacılar, geyik poksvirüsünün DPV022 proteini de hücrelerdeki Bak proteinine bağlanarak onun konformasyonel aktivasyonunu engellediğini bulmuşlardır (Banadyga ve ark. 2011). Ancak SBV'nin enfekte ettiği hücrelerde Bak proteini ile etkileşime girip girmediği henüz bilinmemektedir.

Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik bir üyesi olan Bax proteini, hücrede apoptozis başladığında mitokondri membranında porlar oluşturarak mitokondrial proteinlerin apoptozisin ileriki basamaklarındaki biyokimyasal olayları başlatmalarına neden olmaktadır. Virüsle enfekte hücrede apoptozisin başlamasını takiben hücredeki *Bax* geni ekspresyonu artmaktadır. Bu tez çalışmasında, SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde *Bax* geni ekspresyonunda 48. saatte 1,48 kat artış; 72. saatinde ise 14,18 kat artış gerçekleşti. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde *Bax* geni ekspresyonunun en yüksek artışı ise 4,87 kat değişimi ile 72. saatte belirlendi. Bir çalışmada, SBV gibi *Bunyavirales* takımında yer alan KKA virüsünün, N proteini ile transfekte SW13 hücrelerinde Bax aracılı apoptozisin N proteini tarafından engellendiği belirlenmiştir (Karlberg ve ark. 2015). Bir başka çalışmada ise Enterovirüs 71'in enfekte ettiği hücrelerde Bax proteininde konformasyonel aktivasyona neden olduğu ve hücrede apoptozisi indüklediği belirlenmiştir (Han ve

Cong 2017). Batı Nil virüsü ile yapılan bir *in vitro* çalışmada, virüsün insan mononükleer hücre hattı olan K562 ve fare nöroblastoma hücre hattı olan Neuro2a hücrelerinde apoptozise yol açmakta olduğu ve apoptozisi indüklerken hücrelerdeki *Bax* gen ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Parquet ve ark. 2001). Distemper virüsü ile enfekte köpeklerin beyincik dokularındaki *Bax* gen ekspresyonu real-time PZR ile incelendiğinde ise ortalama 9,8 kat artış olduğu bulunmuştur (Del Puerto ve ark. 2010). Mink enteritis virüsü ile yapılan bir çalışmada virüsün NS1 proteini ile transfekte HEK293T hücrelerinde *Bax* ekspresyonunda artışa ve *Bax* proteinin mitokondriden sitoplazmaya geçişine neden olduğu belirlenmiştir (Lin ve ark. 2019).

Anti-apoptotik genler arasında yer alan *Bcl-2* geni normal koşullarda hücrede apoptozisin indüklenmesini engellemektedir. Hücrede apoptozis başlamasıyla *Bcl-2* geninin ekspresyonunda azalma olmaktadır. Bu tez çalışmasında, SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde *Bcl-2* geni ekspresyonunda sadece 72. saatte 2,96 kat artışı belirlenirken, diğer enfeksiyon saatlerinde ise azaldığı saptandı. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde 12. ve 72. saatler haricindeki tüm enfeksiyon saatlerinde *Bcl-2* geni ekspresyonunda azalma saptandı. Enfeksiyonun 12. saatinde 1,03 kat değişimi ile *Bcl-2* geni ekspresyonu kontrol hücre grubu seviyesine yükseldi. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde sadece 72. saatte *Bcl-2* geninde 2,85 kat artış belirlendi. Kang ve arkadaşlarının (1999) Hantaan virüsüyle yaptıkları çalışmada, virüsün Vero E6 hücrelerinde apoptozisi uyardığı ve *Bcl-2* protein seviyesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada northern blotlama ile hücrelerdeki *Bcl-2* mRNA seviyesi incelendiğinde ise enfekte olmayan grup ile enfekte hücre grubu arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Kang ve ark. 1999). Vero hücre hattında Simian varicella virüsü ile yapılan bir çalışmada ise virüsle enfekte hücrelerde *Bcl-2* mRNA ve protein seviyelerinin %50-70 oranında azaldığı saptanmıştır (Pugazhenti ve ark. 2009). Batı Nil virüsü ile Neuro2a hücrelerinde oluşturulan enfeksiyondan 6 saat sonra ise hücrelerde *Bcl-2* geninde azalma olduğu belirlenmiştir (Parquet ve ark. 2001).

Apoptozisin değerlendirilmesinde *Bcl-2* proteinlerinin oranları da bazı araştırmalarda incelenmektedir. Bu oranlardan “*Bcl-2/Bax*” oranı en sık incelenen anti-apoptotik/pro-apoptotik protein oranıdır. Enfeksiyon saati ilerledikçe *Bcl-2/Bax*

oranında azalma saptanmaktadır. Örneğin, bir araştırmada Batı Nil virüsü ile Neuro2a hücrelerinde oluşturulan enfeksiyonda hücrelerdeki Bcl-2/Bax oranları 0. saatte 3,50 olarak bulunmuş iken 6. saatte 0,40 olarak hesaplanmıştır (Parquet ve ark. 2001). Bu tezde ise Bcl-2/Bax oranı, 0,1 MOI enfeksiyonunda 2. saatte 0,82 iken 72. saatte 0,21 olarak; 0,01 MOI enfeksiyonunda ise 2. saatte 0,36 iken 72. saatte 0,59 olarak belirlendi.

Bcl-2 proteini bazı viral enfeksiyonlarda latentlikte etkili olarak bulunmuştur. Bazı çalışmalarda HIV, Epstein-Barr virüsü (EBV), sitomegalovirüs gibi bazı virüslerin latent enfeksiyonunda enfekte hücrelerdeki Bcl-2 seviyelerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. CD34⁺ hematopoetik progenitör hücrelerde insan sitomegalovirüsünün latent enfeksiyonunda hücrelerdeki Bcl-2 protein seviyesinin artış gösterdiği western blotlama ile belirlenmiştir (Poole ve ark. 2011). EBV'nin latent membran protein 1 (LMP1) ile transfekte edilmiş B hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücrelerdeki apoptozisi engellediği bildirilmiştir (Henderson ve ark. 1991). SBV'nin ise Bcl-2 üzerine etkisi sadece bu tez çalışmasında incelenmiştir. Tez sonuçlarına göre SBV'nin Vero hücrelerindeki Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı belirlendi.

Bazı virüsler ise Bcl-2 benzeri viral proteinleri kodlamakta ve bu proteinler aracılığı ile hücrede apoptozisi engellemektedirler. Herpesvirüsler, adenovirüsler, poksvirüsler, iridovirüsler, Afrika domuz vebası virüsü gibi pek çok viral etken, Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik proteinlerine benzer proteinleri viral genomlarında kodlamaktadır (Kvansakul ve ark. 2017). EBV'nin BHRF1 proteininin, virüsle enfekte hücrelerdeki pro-apoptotik proteinlerden Bid, Bak ve Puma proteinlerine bağlanıp apoptozisi engellediği ortaya konulmuştur (Kvansakul ve ark. 2010). Benzer şekilde Afrika domuz vebası virüsü de Bcl-2 homologu bir viral protein olan A179L proteinini kodlamaktadır. Bu proteinin hücrelerdeki Bid ve Bax proteinlerine bağlandığı ve böylece apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (Banjara ve ark. 2017). Bir başka çalışmada Ektromelia virüsün kodladığı anti-apoptotik etkili EVM025 proteininin hücrelerde Bak proteini ile etkileşime girdiği ve Bak ile Bax proteinlerinin konformasyonel aktivasyonunu engellediği bulunmuştur (Mehta ve ark. 2015). Kaposi sarkoma herpesvirüsün (KSHV) KSHV BCL-2 proteininin

hücrede Bim, Bid, Noxa, Bik ve Puma gibi pro-apoptotik proteinlere; KSHV'nin BHRF-1 proteininin ise Bim, Bid ve Puma proteinlerine bağlandığı belirlenmiştir (Flanagan ve Letai 2008). Buradaki örneklerden başka çok sayıdaki DNA virüsü pek çok viral Bcl-2 homologu protein kodlamaktadır. RNA virüslerinin Bcl-2 homologu anti-apoptotik etkili bir protein kodladığı henüz keşfedilmemiştir.

Tez çalışmasında incelenen bir diğer anti-apoptotik gen olan *Bcl-XL*, mitokondriyal permeabilizasyonu engellemekte ve hücrede apoptozis gelişmesine engel olmaktadır. Bcl-XL proteini anti-apoptotik etkisini Bax ve Bak proteinlerinin oligomerizasyonunu engelleme şeklinde gerçekleştirmektedir (Youle ve Strasser 2008). Tez çalışması sonuçlarına göre, SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde 48. ve 72. saatler haricinde *Bcl-XL* geninde azalma belirlendi. Enfeksiyonun 48. saatinde 1,30 kat; 72. saatinde 3,96 kat artışı belirlendi. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde ise 48. saatte 1,36 kat; 72. saatte 2,51 kat artışı belirlendi. KKKA virüsü ile Huh7 hücre hattında yapılan bir çalışmada, enfeksiyonu takiben hücrelerdeki *Bcl-XL* gen ekspresyon seviyeleri 24. saatte 1 MOI'de 2,1 kat, 48. saatte 0,1 MOI'de ise 1,9 kat artış gösterdiği bildirilmiştir (Rodrigues ve ark. 2012).

Bazı viral proteinler pro-apoptotik etkili olabilmekte ve bu etkisini Bcl-XL üzerinden gösterebilmektedir. Örneğin, domuzların reproduktif ve respiratorik sendrom virüsünün yapısal olmayan Nsp4 proteini, MARC145 (maymun böbrek hücresi) hücre hattında Bcl-XL proteinini parçalamakta ve hücredeki apoptozisi engellemektedir (Yuan ve ark. 2016). SBV'nin proteinlerinin Bcl-XL proteinini yıkımladığı veya parçaladığına dair bir çalışma ise henüz mevcut değildir.

Bir takım virüsler ise enfekte ettikleri hücrelerde Bcl-XL ekspresyonunda artışa neden olarak apoptozisi engellemektedir. Hepatitis C virüsünün insan fetal karaciğer kök hücrelerindeki enfeksiyonunun geç döneminde Bcl-XL ekspresyonunu artırarak apoptozisi engellediği bildirilmiştir (Guo ve ark. 2019). Bu tezden elde edilen veriler göz önüne alındığında, SBV'nin Bcl-XL ekspresyonunda artışa neden olmadığı belirlenmiştir.

Apoptotik gen ekspresyonlarının analizinde Bcl-2/Bax oranı yanı sıra "Bcl-XL/Bax" oranları da incelenmektedir. Batı Nil virüsü ile yapılan bir çalışmada, Bcl-

XL/Bax oranı K562 hücre hattında (insan mononükleer hücre hattı) oluşturulan enfeksiyonun ilk saatinde 7,89 iken 6. saatinde 0,71 olarak belirlenmiştir (Parquet ve ark. 2001). Bu tezde ise Bcl-XL/Bax oranı 0,1 MOI için 2. saatte 0,86; 72. saatte ise 0,28 olarak belirlendi. 0,01 MOI ile oluşturulan enfeksiyonda ise Bcl-XL/Bax oranı 2. saatte 0,48; 72. saatte ise 0,51 olarak hesaplandı.

Puma p53 bağımlı veya bağımsız olarak hücrede apoptozisin başlamasını tetikleyen pro-apoptotik bir proteindir. Puma geni, toksinler, endoplazmik retikulum stresi, iskemi ve enfeksiyonlar gibi pek çok farklı faktörle oluşan apoptoziste etkili olabilmektedir. Bu tez çalışmasında *Puma* geni, SBV 0,1 MOI ile enfekte hücrelerde enfeksiyon saati ilerledikçe artış göstererek 48. saatte 11,98 kat; 72. saatte 23,80 kat artış gösterdi. SBV 0,01 MOI ile enfekte hücrelerde *Puma* geni ekspresyonu enfeksiyonun 36. saatinde 10,91 kat; 72. saatinde ise 71,97 kat arttı. KKKKA virüsü ile yapılan bir çalışmada, Huh7 hücre hattında oluşturulan enfeksiyonu takiben hücrelerdeki *Puma* gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, enfeksiyondan 24 saat sonra 1 MOI ile enfeksiyonda 3,9 kat, 0,1 MOI ile enfeksiyonda ise 2,4 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada ılımlı insan patojeni olan ve KKKAV ile genetik yakınlığa sahip Dugbe virüs ile enfeksiyon sonrasında ise *Puma* gen ekspresyonunda değişim saptanmamıştır (Rodrigues ve ark. 2012). İnfluenza A virüsünün mast hücrelerindeki enfeksiyonu takiben 12 ve 24 saat sonra hücrelerde Puma artışına neden olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark. 2014). Herpes simpleks virüs 1 ve Semliki forest virüs ile yapılan bir çalışmada, her iki virüsün de enfekte ettikleri hücrelerde Puma mRNA ve proteininde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Papaianni ve ark. 2015). Bu tez çalışmasında SBV ile enfekte hücrelerde yalnızca Puma mRNA seviyeleri incelenirken, Puma proteini ise incelenmemiştir.

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler doğrultusunda, SBV'nin Vero hücrelerini enfeksiyonunu takiben özellikle Puma genini kullandığı belirlendi. SBV ile aynı takımın (*Bunyavirales*) bir başka üyesi olan RVFV ile yapılan bir çalışmada, virüsün p53 yolağını kullandığı ve Puma artışına neden olduğu belirlenmiştir (Austin ve ark. 2012). SBV'nin ise p53 yolağını kullanıp kullanmadığı henüz bilinmemektedir.

DNA virüslerinin aksine RNA virüslerinde Bcl-2 homologu anti-apoptotik protein kodlandığı görülmemesine rağmen, RNA virüslerinin sahip oldukları bazı viral proteinlerin hücrelerde anti-apoptotik etkili oldukları belirlenmiştir. Yavaş replike olan RNA virüslerinin de tıpkı DNA virüslerinde olduğu gibi, viral replikasyonu tamamlamak için hücre ölümüne engel oldukları düşünülmektedir. Örneğin, kızamıkçık (Rubella) virüsünün kapsit proteininin hücredeki Bax proteinine bağlandığı ve mitokondri üzerindeki por oluşumunu engelleyerek anti-apoptotik fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Ilkow ve ark. 2011). Ensefalomyokarditis virüs ile HeLa hücrelerinde yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre virüsün L (leader) proteini hücrelerde apoptozisi engellemektedir (Romanova ve ark. 2009). İnfluenza A virüsünün NS1 proteininin, hücredeki çeşitli sinyal yollarını kullanarak kaspaz-9 aktivasyonunu engellediği ve anti-apoptotik etkili olduğu bildirilmiştir (Ehrhardt ve ark. 2007). *Bunyavirales* takımındaki Rift Vadisi humması virüsünün (RVFV) NSm proteininin hücrelerde anti-apoptotik etkiye sahip olduğu farklı araştırmalarda ortaya konulmuştur (Won ve ark. 2007, Terasaki ve ark. 2013). Yine *Bunyavirales* takımının üyesi olan Hazara virüsün (HAZV) N proteininin de anti-apoptotik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Matsumoto ve ark. 2019). SBV gibi Orthobunyavirus cinsinde sınıflandırılan Bunyamwera virüsün NSs proteini, hücrelerde IRF-3 aracılı apoptozisi inhibe ederek anti-apoptotik etkisini göstermektedir (Kohl ve ark. 2003). SBV'nin proteinlerinin ise anti-apoptotik etkiye sahip olduğuna dair bir çalışma literatürde henüz mevcut değildir.

Real-time PZR ile yapılan gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan referans genler çeşitlilik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda yaygın biçimde kullanılan referans genler arasında GAPDH, beta aktin, 18S rRNA, 28S rRNA, alfa tubulin, hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT; hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), mikroglobulin, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH), RNA polimeraz, TATA-box bağlayıcı protein (TBP) gibi çok sayıda gen bulunmaktadır (Radonić ve ark. 2004). Referans genlerin ekspresyon stabiliteeleri virüse ve kullanılan hücre hatlarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin Chey ve arkadaşlarının (2010) Rubella virüs ile yaptıkları çalışmada, Vero hücre hattı için en uygun referans genlerin HPRT1 ve HUEL (Çözünen taşıyıcı aile üyesi 30) olduğunu belirlemişlerdir. Öte yandan MCF-7 (insan meme kanseri hücresi) hücre hattındaki

Rubella virüs enfeksiyonunda ise en uygun referans genlerin HUEL ve TBP olduğunu bildirmişlerdir (Chey ve ark. 2010). Çalışmalarda SBV için kullanılan hücre hattına göre en uygun referans genin hangisi olduğuna dair bir çalışma mevcut değildir.

Hücredeki referans genlerin stabilitesi enfeksiyonun zamanına bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin, rat kortikal nöron hücrelerinde Borna virüs ile yapılan bir çalışmada, en uygun referans gen enfeksiyonun 9. günü için asidik ribozomal fosfoprotein P0 (Acidic ribosomal phosphoprotein P0; ARBP) iken 12. günü için beta aktin olarak belirlenmiştir (Zhang ve ark. 2014). SBV için enfeksiyon saatlerine göre en uygun referans genin hangisi olduğunu belirleyen herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Referans gen seçimi sadece *in vitro* çalışmalarda değil *in vivo* çalışmalarda da önem arz etmektedir. Örneğin, küçük ruminant vebası virüsü ile enfekte koyun ve keçilerde yapılan bir çalışmada, iki türdeki hayvanlardan alınan örneklerin analizinde kullanılan referans genlerin uygunluklarının farklı olduğu tespit edilmiştir. Koyunlar için hidrokümetilbilan sentaz (Hydroxymethylbilane synthase; HMBS) ve HPRT1 en uygun referans genler iken, HMBS ve beta 2 mikroglobulin ise keçiler için uygun referans gen olarak belirlenmiştir (Sahu ve ark. 2018). SBV enfeksiyonunun sığır, koyun, keçi ve yabani ruminantları da kapsayan geniş bir konakçı spektrumuna sahip olduğu düşünüldüğünde, *in vivo* örnekleme sonrasındaki analizlerde seçilecek uygun referans genin veya genlerin belirlenmesi için bilimsel çalışmaların yapılması gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

SBV'nin ne Vero hücre hattında ne de diğer hücre hatlarında yapılan ekspresyon çalışmaları için kullanılacak referans genlerin karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Enfeksiyon saatlerine göre de referans gen seçimi ile ilgili çalışma literatürde bulunmamaktadır. SBV enfekte Vero hücre hattındaki ekspresyon çalışmaları için en stabil referans gen bilinmemektedir. Bu nedenlerle, diğer ekspresyon çalışmalarında en çok kullanılan referans genlerden biri olan GAPDH geni bu tez çalışmasında tercih edildi.

Sonuç olarak bu tez ile SBV'nin Vero hücre hattında apoptozisi indüklediği belirlendi. Vero hücre hattında SBV tarafından oluşturulan apoptozis oranının virüsün dozuna ve enfeksiyondan sonra geçen zamana göre değişkenlik gösterdiği saptandı. SBV'nin Vero hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etki yönünden incelendiğinde 0,1 MOI'de 18. saatte, 0,01 MOI'de 24. saatte sitopatik etki olduğu görüldü. Benzer olarak DNA fragmentasyonunun da 0,1 MOI'de 18. saatte, 0,01 MOI'de 24. saatte başladığı belirlendi. SBV ile enfekte Vero hücrelerinin akan hücre ölçerdeki analizinde en yüksek apoptozis oranları hem 0,1 MOI hem de 0,01 MOI için de 72. saat örneklerinde saptandı. Annexin V/PI ile belirlenen apoptozis oranlarının yine viral doz ile artış gösterdiği tespit edildi. 0,1 MOI ile oluşturulan enfeksiyonda (toplam %81,1) 0,01 MOI'ye (toplam %74,8) göre daha yüksek oranda erken ve geç apoptotik hücre belirlendi. Bu verilere göre SBV'nin enfeksiyon dozu ile oluşturduğu apoptozis arasında ilişki olduğu ortaya konulmuş oldu.

Tez çalışmasının diğer verisi ise, SBV ile enfekte Vero hücrelerinde anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerdir. Gen ekspresyon analizi real-time PZR ile incelendi ve normalize gen ekspresyonu *GAPDH* referans geni kullanılarak hesaplandı. Analiz sonuçlarına göre SBV, Vero hücrelerinde anti-apoptotik genlerden *Bcl-2* ve *Bcl-XL* ekspresyonlarında azalmaya; pro-apoptotik genlerden *Bak*, *Bax* ve *Puma* ekspresyonlarında ise artışa neden olmaktadır. Enfeksiyonun 72. saatinde anti-apoptotik genlerde az miktarda da olsa (2,5-3,9 kat arası) artış gözlenmesi, bu durumun hücrelerdeki şiddetli apoptozis ve kromozomal parçalanma ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

SBV'nin ekspresyonunu en yüksek oranda etkilediği gen ise *Puma* geni olarak belirlendi. SBV'nin moleküler patogenezinde *Puma* geni ve proteini ile olan ilişkisinin detaylı araştırmalar ile çalışılması, bu konunun aydınlatılması için önem arz etmektedir.

Tez kapsamında SBV'nin sadece Vero hücre hattındaki apoptotik etkisi incelendi. SBV'nin *in vitro* üretilmesinde kullanılan diğer hücre hatlarındaki apoptotik etkisinin araştırılmasının, viral moleküler patogenezin anlaşılması için bilimsel veri sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca SBV'nin enfekte ettiği

hayvanlardaki *in vivo* apoptotik etkisinin incelenmesi de virüsün patogenezi ve oluşturduğu patolojik değişimlerin detaylı olarak anlaşılmasına ışık tutacaktır.



KAYNAKLAR

- ABI-RIZK A, KANAAN T, EL HAGE J (2017) Seroprevalence of Schmallenberg virus and other Simbu group viruses among the Lebanese sheep. *Open Vet J*, 7, 290-293.
- ABRAHAM R, MUDALIAR P, PADMANABHAN A, SREEKUMAR E (2013) Induction of cytopathogenicity in human glioblastoma cells by chikungunya virus. *PLoS One*, 8, e75854.
- ACRANI GO, GOMES R, PROENÇA-MÓDENA JL, DA SILVA AF, CARMINATI PO, SILVA ML, SANTOS RI, ARRUDA E (2010) Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res*, 149, 56-63.
- AEBISCHER A, WERNIKE K, HOFFMANN B, BEER M (2014) Rapid genome detection of Schmallenberg virus and bovine viral diarrhoea virus by use of isothermal amplification methods and high-speed real-time reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 52, 1883-92.
- AKSOY E, AZKUR AK (2019) Schmallenberg virus affects T-bet, Gata3, RoRyt, Foxp3 and Eomes in mice brain. *Acta Virol*, 63, 286-291.
- AKYOL N, AZKUR AK, EKİCİ H (2015) Comparison of flow cytometric analysis and eosin-nigrosin staining methods for determining some morphological characteristics of bull epididymal spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 659-664.
- ALARCON P, HÄSLER B, RABOISSON D, WARET-SZKUTA A, CORBIÈRE F, RUSHTON J (2014) Application of integrated production and economic models to estimate the impact of Schmallenberg virus for various sheep production types in the UK and France. *Vet Rec Open*, 1, e000036.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2008) Molecular Biology of the Cell, 5th ed, Garland Science, New York, chapter 18.
- ALNEMRI ES, LIVINGSTON DJ, NICHOLSON DW, SALVESEN G, THORNBERRY NA, WONG WW, YUAN J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- ANASIR MI, CARIA S, SKINNER MA, KVANSAKUL M (2017) Structural basis of apoptosis inhibition by the fowlpox virus protein FPV039. *J Biol Chem*, 292, 9010-9021.
- ANDERSON P (1997) Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 33-46.
- ANONİM (2012a) Schmallenberg virus 'still circulating' in the UK. *Vet Rec*, 171, 140.

ANONİM (2012b) Schmallenberg virus antibodies detected in cattle in Wales. *Vet Rec*,171, 333.

ANONİM (2012c) ProMed-mail: Schmallenberg virus - Europe (20). Italy, Luxe: Luxembourg, OIE. Erişim:[<http://www.promedmail.org/direct.php?id=20120220.1047263>], Erişim tarihi: 06.01.2020.

ANONİM (2012d) Schmallenberg virus - Europe (68). Finland (Mainland): Europe update. Erişim:[<http://www.promedmail.org/direct.php?id=20121029.1373587>], Erişim tarihi: 06.01.2020.

ANONİM (2012e): Erişim: [<http://www.msd-animal-health.ie/diseases/sheep/schmallenberg/introduction.aspx>], Erişim tarihi: 06.01.2020.

ANONİM (2013a) Schmallenberg virus circulating in Scotland. *Vet Rec*. 172, 349.

ANONİM (2013b): Erişim:[<https://animalpharm.agribusinessintelligence.informa.com/AP003064/Provisional-approval-for-MSD-Schmallenberg-vaccine-in-the-UK>], Erişim tarihi: 06.01.2020.

ANONİM (2017): Erişim: [<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/zulvac-sbv>], Erişim tarihi: 06.01.2020.

ARCHAMBAULT D, ST-LAURENT G (2000) Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes*, 20, 143-147.

ARIZA A, TANNER SJ, WALTER CT, DENT KC, SHEPHERD DA, WU W, MATTHEWS SV, HISCOX JA, GREEN TJ, LUO M, ELLIOTT RM, FOOKS AR, ASHCROFT AE, STONEHOUSE NJ, RANSON NA, BARR JN, EDWARDS TA (2013) Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization. *Nucleic Acids Res*,41, 5912-26.

ASHKENAZI A, DIXIT V M (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.

ASLAN ME (2014) Ankara, Çorum, Kırıkkale ve Yozgat İllerinde Yetiştirilen Brucella Seronegatif İneklerde BVDV, BHV-1, BHV-4 ve BHV-5 Enfeksiyonlarının Hematolojik Değerlere Etkisi, Epidemiyolojisi ve Genetik Karakterizasyonun Araştırılması. Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

AUSTIN D, BAER A, LUNDBERG L, SHAFAGATI N, SCHOONMAKER A, NARAYANAN A, POPOVA T, PANTHIER JJ, KASHANCHI F, BAILEY C, KEHN-HALL K (2012) p53 activation following Rift Valley fever virus infection contributes to cell death and viral production. *PLoS One*, 7, e36327.

AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME, UNAL N (2011) Molecular and serological characterization of pestivirus infection among sheep in Kırıkkale, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak*

Derg, 17, 83-92.

- AZKUR AK, ALBAYRAK H, RISVANLI A, PESTIL Z, OZAN E, YILMAZ O, TONBAK S, CAVUNT A, KADI H, MACUN HC, ACAR D, ÖZENÇ E, ALPARSLAN S, BULUT H (2013) Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 45, 1825-8.
- AZKUR AK, BIYIKLI E, YILDIRIM M, YILDIZ K (2018) Schmallenberg virüs enfeksiyonu tanısında kullanılmak üzere ELISA ve real-time RT-PCR kitlerinin geliştirilmesi. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) araştırma - geliştirme destekleri proje sonuç raporu. TAGEM15/AR-GE/48.
- BAER A, KEHN-HALL K (2014) Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp*, 93, e52065.
- BALMER S, VÖGTLIN A, THÜR B, BÜCHI M, ABRIL C, HOUMARD M, DANUSER J, SCHWERMER H (2014) Serosurveillance of Schmallenberg virus in Switzerland using bulk tank milk samples. *Prev Vet Med*, 116, 370-9.
- BALSEIRO A, ROYO LJ, GÓMEZ ANTONA A, GARCÍA MARÍN JF (2015) First confirmation of Schmallenberg virus in cattle in Spain: tissue distribution and pathology. *Transbound Emerg Dis*, 62, e62-5.
- BANADYGA L, LAM SC, OKAMOTO T, KVANSAKUL M, HUANG DC, BARRY M (2011) Deerpox virus encodes an inhibitor of apoptosis that regulates Bak and Bax. *J Virol*, 85, 1922-34.
- BANJARA S, CARIA S, DIXON LK, HINDS MG, KVANSAKUL M (2017) Structural insight into African swine fever virus A179L-mediated inhibition of apoptosis. *J Virol*, 91, pii: e02228-16.
- BARNWAL B, KARLBERG H, MIRAZIMI A, TAN YJ (2016) The non-structural protein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus disrupts the mitochondrial membrane potential and induces apoptosis. *J Biol Chem*, 291, 582-92.
- BARRY G, VARELA M, RATINIER M, BLOMSTRÖM AL, CAPORALE M, SEEHUSEN F, HAHN K, SCHNETTLER E, BAUMGÄRTNER W, KOHL A, PALMARINI M (2014) NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery. *J Gen Virol*, 95, 1640-6.
- BAYROU C, GARIGLIANY MM, SARLET M, SARTELET A, CASSART D, DESMECHT D (2014) Natural intrauterine infection with Schmallenberg virus in malformed newborn calves. *Emerg Infect Dis*, 20, 1327-30.
- BELMOKHTAR C A, HILLION J, SEGAL-BENDIRDJIAN E (2001) Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 20, 3354-3362.

- BILK S, SCHULZE C, FISCHER M, BEER M, HLINAK A, HOFFMANN B (2012) Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol*, 159, 236-8.
- BIYIKLI E, AZKUR AK, TONBAK Ş, MACUN HC (2017) Buzağlarda Schmallenberg virus özgül maternal antikor varlığının izlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 31, 189-192.
- BLANCO FC, OCHS RL, SCHWARZ H, LOTZ M (1995) Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 146, 75-85.
- BLOMSTRÖM AL, STENBERG H, SCHARIN I, FIGUEIREDO J, NHAMBIRRE O, ABILIO AP, FAFETINE J, BERG M (2014) Serological screening suggests presence of Schmallenberg virus in cattle, sheep and goat in the Zambezia Province, Mozambique. *Transbound Emerg Dis*, 61, 289-92.
- BLOMSTRÖM AL, GU Q, BARRY G, WILKIE G, SKELTON JK, BAIRD M, MCFARLANE M, SCHNETTLER E, ELLIOTT RM, PALMARINI M, KOHL A (2015) Transcriptome analysis reveals the host response to Schmallenberg virus in bovine cells and antagonistic effects of the NSs protein. *BMC Genomics*, 16, 324.
- BOSHRA HY, CHARRO D, LORENZO G, SÁNCHEZ I, LAZARO B, BRUN A, ABRESCIA NG (2017) DNA vaccination regimes against Schmallenberg virus infection in IFNAR^{-/-} mice suggest two targets for immunization. *Antiviral Res*, 141, 107-115.
- BOUCHEMLA F, AGOLTSOV VA, LARIONOV SV, POPOVA OM, SHVENK EV (2018) Epizootiological study on spatiotemporal clusters of Schmallenberg virus and lumpy skin diseases: The case of Russia. *Vet World*, 11, 1229-1236.
- BOWEN MD, TRAPPIER SG, SANCHEZ AJ, MEYER RF, GOLDSMITH CS, ZAKI SR, DUNSTER LM, PETERS CJ, KSIAZEK TG, NICHOL ST, RVF TASK FORCE (2001) A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*, 291, 185-90.
- BRADSHAW B, MOONEY J, ROSS PJ, FURPHY C, O'DONOVAN J, SANCHEZ C, GOMEZ-PARADA M, TOOLAN D (2012) Schmallenberg virus cases identified in Ireland. *Vet Rec*, 171, 540-1.
- BRATTON DL, FADOK VA, RICHTER DA, KAILEY JM, GUTHRIE LA, HENSON PM (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*, 272, 26159-26165.
- BRÉARD E, LARA E, COMTET L, VIAROUGE C, DOCEUL V, DESPRAT A, VITOUR D, POZZI N, CAY AB, DE REGGE N, POURQUIER P, SCHIRRMEIER H, HOFFMANN B, BEER M, SAILLEAU C, ZIENTARA S (2013) Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One*, 8, e53446.

- BRILL A, TORCHINSKY A, CARP H, TODER V (1999) The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet*, 16, 512-519.
- BRUNELLE J K, LETAI A (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the bcl-2 family. *J Cell Sci*, 122, 437-441.
- BRZOWSKA A, LIPÍŃSKA AD, DEREWOŃKO N, LESIAK D, RYCHŁOWSKI M, RAŁBALSKI Ł, BIENKOWSKA-SZEWCZYK K (2018) Inhibition of apoptosis in BHV-1-infected cells depends on Us3 serine/threonine kinase and its enzymatic activity. *Virology*, 513, 136-145.
- CALZOLARI M, ALBIERI A (2013) Could drought conditions trigger Schmallenberg virus and other arboviruses circulation? *Int J Health Geogr*, 12, 7.
- CHAABANE W, USER SD, EL-GAZZAH M, JAKSIK R, SAJJADI E, RZESZOWSKA-WOLNY J, LOS MJ (2013) Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61, 43-58.
- CHAIŃTOUTIS SC, KIOSSIS E, GIADINIS ND, BROZOS CN, SAILLEAU C, VIAROUGE C, BRÉARD E, PAPANASTASSOPOULOU M, ZIENTARA S, PAPADOPOULOS O, DOVAS CI (2014) Evidence of Schmallenberg virus circulation in ruminants in Greece. *Trop Anim Health Prod*, 46, 251-5.
- CHANDAR N, VISELLI S (2012) Lippincott's Illustrated Reviews: Cell and Molecular Biology. Hücre ve Moleküler Biyoloji. Çeviren: YANIK B, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, s: 215-224.
- CHANG C-D, LIN P-Y, LIAO M-H, CHANG C-I, HSU J-L, YU F-L, WU H-Y, SHIH W-L (2013) Suppression of apoptosis by pseudorabies virus US3 protein kinase through the activation of PI3-K/Akt and NF-κB pathways. *Res Vet Sci*, 95, 764-774.
- CHEN TA, WANG JL, HUNG SW, CHU CL, CHENG YC, LIANG SM (2011) Recombinant VP1, an Akt inhibitor, suppresses progression of hepatocellular carcinoma by inducing apoptosis and modulation of CCL2 production. *PLoS One*, 6, e23317.
- CHENAIS E, STÅHL K, FRÖSSLING J, BLOMQVIST G, NÄSLUND K, SVENSSON L, RENSTRÖM L, MIEZIEWSKA K, ELVANDER M, VALARCHER JF (2015) Schmallenberg virus beyond latitude 65°N. *Transbound Emerg Dis*, 62, e11-8.
- CHEW T, NOYCE R, COLLINS SE, HANCOCK MH, MOSSMAN KL (2009) Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol*, 46, 393-9.
- CHEY S, CLAUS C, LIEBERT UG (2010) Validation and application of normalization factors for gene expression studies in rubella virus-infected cell lines with quantitative real-time PCR. *J Cell Biochem*, 110, 118-28.

- CHIARI M, SOZZI E, ZANONI M, ALBORALI LG, LAVAZZA A, CORDIOLI P (2014) Serosurvey for Schmallenberg virus in alpine wild ungulates. *Transbound Emerg Dis*, 61, 1-3.
- CHIPUK J E, MOLDOVEANU T, LLAMBI F, PARSONS M J, GREEN D R (2010) The Bcl-2 family reunion. *Mol Cell*, 37, 299-310.
- CLAINE F, COUPEAU D, WIGGERS L, MUYLKENS B, KIRSCHVINK N (2013) Schmallenberg virus among female lambs, Belgium. *Emerg Infect Dis*, 19, 1115-7.
- COLLINS ÁB, MEE JF, KIRKLAND PD (2018) Pathogenicity and teratogenicity of Schmallenberg virus and Akabane virus in experimentally infected chicken embryos. *Vet Microbiol*, 216, 31-37.
- COLLINS JA, SCHANDI CA, YOUNG KK, VESELY J, WILLINGHAM MC (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*, 45, 923-34.
- CONNOLLY PF, JAGER R, FEARNHEAD HO (2014) New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol*, 5, 149.
- COUPEAU D, CLAINE F, WIGGERS L, MARTIN B, KIRSCHVINK N, MUYLKENS B (2013a) Characterization of messenger RNA termini in Schmallenberg virus and related Simbuviruses. *J Gen Virol*, 94, 2399-405.
- COUPEAU D, CLAINE F, WIGGERS L, KIRSCHVINK N, MUYLKENS B (2013b) In vivo and in vitro identification of a hypervariable region in Schmallenberg virus. *J Gen Virol*, 94, 1168-74.
- COUPEAU D, CLAINE F, WIGGERS L, KIRSCHVINK N, MUYLKENS B (2016) S segment variability during the two first years of the spread of Schmallenberg virus. *Arch Virol*, 161, 1353-8.
- DALY JM, KING B, TARLINTON RA, GOUGH KC, MADDISON BC, BLOWEY R (2015) Comparison of Schmallenberg virus antibody levels detected in milk and serum from individual cows. *BMC Vet Res*, 11, 56.
- DARZYNKIEWICZ Z, GALKOWSKI D, ZHAO H (2008) Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44, 250-4.
- DE MARTINO L, MARFE G, IRNO CONSALVO M, STEFANO C D, PAGNINI U, SINIBALDI-SALIMEI P (2007) Antiapoptotic activity of bovine herpesvirus type-1 UL14 protein. *Vet Microbiol*, 123, 210-216.
- DE MARTINO L, MARFE G, LONGO M, FIORITO F, MONTAGNARO S, IOVANE V, DECARO N, PAGNINI U (2010) Bid cleavage, cytochrome c release and caspase activation in canine coronavirus-induced apoptosis. *Vet Microbiol*, 141, 36-45.

- DE REGGE N, DEBLAUWE I, DE DEKEN R, VANTIEGHEM P, MADDER M, GEYSEN D, SMEETS F, LOSSON B, VAN DEN BERG T, CAY AB (2012) Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis*, 59, 471-5.
- DE REGGE N, VAN DEN BERG T, GEORGES L, CAY B (2013) Diagnosis of Schmallenberg virus infection in malformed lambs and calves and first indications for virus clearance in the fetus. *Vet Microbiol*, 162, 595-600.
- DEJEAN L M, MARTINEZ-CABALLERO S, MANON S, KINNALLY K W (2006) Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by Bcl-2 family proteins. *Biochim biophys acta*, 1762, 191-201.
- DING X, XU F, CHEN H, TESH RB, XIAO SY (2005) Apoptosis of hepatocytes caused by Punta Toro virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) and its implication for Phlebovirus pathogenesis. *Am J Pathol*, 167, 1043-9.
- DOCEUL V, LARA E, SAILLEAU C, BELBIS G, RICHARDSON J, BRÉARD E, VIAROUGE C, DOMINGUEZ M, HENDRIKX P, CALAVAS D, DESPRAT A, LANGUILLE J, COMTET L, POURQUIER P, ELÉOUËT JF, DELMAS B, MARIANNEAU P, VITOUR D, ZIENTARA S (2013) Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res*, 44, 31.
- DOLEY J, SINGH L V, KUMAR G R, SAHOO A P, SAXENA L, CHATURVEDI U, SAXENA S, KUMAR R, SINGH P K, RAJMANI R S, SANTRA L, PALIA S K, TIWARI S, HARISH D R, KUMAR A, DESAI G S, GUPTA S, GUPTA S K, TIWARI A K (2014) Canine parvovirus type 2a (CPV-2a)-induced apoptosis in MDCK involves both extrinsic and intrinsic pathways. *Appl Biochem Biotechnol*, 172, 497-508.
- DONG H, LI P, ELLIOTT RM, DONG C (2013) Structure of Schmallenberg orthobunyavirus nucleoprotein suggests a novel mechanism of genome encapsidation. *J Virol*, 87, 5593-601.
- DUCOMBLE T, WILKING H, STARK K, TAKLA A, ASKAR M, SCHAADÉ L, NITSCHÉ A, KURTH A (2012) Lack of evidence for Schmallenberg virus infection in highly exposed persons, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis*, 18, 1333-5.
- EHRHARDT C, WOLFF T, PLESCHKA S, PLANZ O, BEERMANN W, BODE JG, SCHMOLKE M, LUDWIG S (2007) Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol*, 81, 3058-67.
- ELBERS AR, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, VAN DER POEL WH (2014) Schmallenberg virus antibody persistence in adult cattle after natural infection and decay of maternal antibodies in calves. *BMC Vet Res*, 10, 103.
- ELBERS AR, MEISWINKEL R, VAN WEEZEP E, KOOI EA, VAN DER POEL WH (2015) Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges in the Netherlands in 2012. *Transbound Emerg Dis*, 62, 339-42.

- ELLIOTT RM, BLAQORI G, VAN KNIPPENBERG IC, KOUDRIAKOVA E, LI P, MCLEES A, SHI X, SZEMIEL AM (2013) Establishment of a reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe. *J Gen Virol*, 94, 851-9.
- ELLIOTT RM (2014) Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol*, 12, 673-85.
- ELLIS HM, HORVITZ HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nemotode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-829.
- ELMAS A, ASLAN Ö, ŞAHNA KC (2018) Seroprevalence of Schmallenberg virus infection in sheep in Sivas province. *Harran Üniv Vet FakDerg*, 7, 56-59.
- ELMORE S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ENDALEW AD, MOROZOV I, DAVIS AS, GAUDREAULT NN, WERNIKE K, BAWA B, RUDER MG, DROLET BS, MCVEY DS, SHIVANNA V, MA W, FABURAY B, WILSON WC, RICHT JA (2018) Virological and serological responses of sheep and cattle to experimental Schmallenberg virus infection. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 18, 697-703.
- ENDALEW AD, FABURAY B, TRUJILLO JD, GAUDREAULT NN, DAVIS AS, SHIVANNA V, SUNWOO SY, MA W, DROLET BS, MCVEY DS, MOROZOV I, WILSON WC, RICHT JA (2019) Immunogenicity and efficacy of Schmallenberg virus envelope glycoprotein subunit vaccines. *J Vet Sci*, 20, e58.
- ERIKSSON S, KIM SK, KUBISTA M, NORDÉN B (1993) Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to AT regions of DNA: evidence for an allosteric conformational change. *Biochemistry*, 32, 2987-98.
- ESTEVEES F, MESQUITA JR, VALA H, ABREU-SILVA J, VAN DER POEL WH, NASCIMENTO MS (2016) Serological evidence for Schmallenberg virus infection in sheep of Portugal, 2014. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 16, 63-5.
- ESTEVEES F, CRUZ R, VASCONCELOS-NÓBREGA C, SANTOS C, FERREIRA AS, PETROVIC T, CARDOSO L, COELHO AC, VALA H, NASCIMENTO MSJ, MESQUITA JR (2018) Serologic evidence for Schmallenberg virus circulation at high altitude, central Portugal, 2015-2016. *Transbound Emerg Dis*, 65, 1553-1556.
- FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148, 2207-2216.
- FAN G, MA X, KREN BT, STEER CJ (1996) The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene*, 12, 1909-19.

- FAN G, STEER C J (1999) The role of retinoblastoma protein in apoptosis. *Apoptosis*, 4, 21-29.
- FEHÉR E, MARTON S, TÓTH ÁG, URSU K, WERNIKE K, BEER M, DÁN Á, BÁNYAI K (2017) Sequence analysis of Schmallenberg virus genomes detected in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 64, 373-384.
- FERNÁNDEZ-AGUILAR X, PUJOLS J, VELARDE R, ROSELL R, LÓPEZ-OLVERA JR, MARCO I, PUMAROLA M, SEGALÉS J, LAVÍN S, CABEZÓN O (2014) Schmallenberg virus circulation in high mountain ecosystem, Spain. *Emerg Infect Dis*, 20, 1062-4.
- FISCHER M, HOFFMANN B, GOLLER KV, HÖPER D, WERNIKE K, BEER M (2013a) A mutation 'hot spot' in the Schmallenberg virus M segment. *J Gen Virol*, 94, 1161-7.
- FISCHER M, SCHIRMEIER H, WERNIKE K, WEGELT A, BEER M, HOFFMANN B (2013b) Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems. *Viol J*, 10, 327.
- FLANAGAN AM, LETAI A (2008) BH3 domains define selective inhibitory interactions with BHRF-1 and KSHV BCL-2. *Cell Death Differ*, 15, 580-8.
- FREIRE CC, IAMARINO A, SOUMARÉ PO, FAYE O, SALL AA, ZANOTTO PM (2015) Reassortment and distinct evolutionary dynamics of Rift Valley Fever virus genomic segments. *Sci Rep*, 5, 11353.
- FRIDMAN J S, LOWE S W (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22, 9030-9040.
- FULLER J, SURTEES RA, SHAW AB, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ B, SLACK GS, BELL-SAKYI L, MANKOURI J, EDWARDS TA, HEWSON R, BARR JN (2019) Hazara nairovirus elicits differential induction of apoptosis and nucleocapsid protein cleavage in mammalian and tick cells. *J Gen Virol*, 100, 392-402.
- GALLUZZI L, ZAMZAMI N, DE LA MOTTE ROUGE T, LEMAIRE C, BRENNER C, KROEMER G (2007) Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis*, 12, 803-13.
- GALLUZZI L, BRENNER C, MORSELLI E, TOUAT Z, KROEMER G (2008) Viral control of mitochondrial apoptosis. *Plos Pathog*, 4, 1-16.
- GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON SA, ABRAMS JM, ADAM D, AGOSTINIS P, ALNEMRI ES, ALTUCCI L, AMELIO I, ANDREWS DW, ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI M, ANTONOV AV, ARAMA E, BAEHRECKE EH, BARLEV NA, BAZAN NG, BERNASSOLA F, BERTRAND MJM, BIANCHI K, BLAGOSKLONNY MV, BLOMGREN K, BORNER C, BOYA P, BRENNER C, CAMPANELLA M, CANDI E, CARMONA-GUTIERREZ D, CECCONI F, CHAN FK, CHANDEL NS, CHENG EH, CHIPUK JE, CIDLOWSKI JA, CIECHANOVER A, COHEN GM, CONRAD M, CUBILLOS-RUIZ JR, CZABOTAR PE, D'ANGIOLELLA V, DAWSON TM, DAWSON VL, DE LAURENZI V, DE MARIA R, DEBATIN KM, DEBERARDINIS RJ, DESHMUKH M, DI DANIELE N, DI

VIRILIO F, DIXIT VM, DIXON SJ, DUCKETT CS, DYNLACHT BD, EL-DEIRY WS, ELROD JW, FIMIA GM, FULDA S, GARCÍA-SÁEZ AJ, GARG AD, GARRIDO C, GAVATHIOTIS E, GOLSTEIN P, GOTTLIEB E, GREEN DR, GREENE LA, GRONEMEYER H, GROSS A, HAJNOCZKY G, HARDWICK JM, HARRIS IS, HENGARTNER MO, HETZ C, ICHIJO H, JÄÄTTELÄ M, JOSEPH B, JOST PJ, JUIN PP, KAISER WJ, KARIN M, KAUFMANN T, KEPP O, KIMCHI A, KITSIS RN, KLIONSKY DJ, KNIGHT RA, KUMAR S, LEE SW, LEMASTERS JJ, LEVINE B, LINKERMANN A, LIPTON SA, LOCKSHIN RA, LÓPEZ-OTÍN C, LOWE SW, LUEDDE T, LUGLI E, MACFARLANE M, MADEO F, MALEWICZ M, MALORNI W, MANIC G, MARINE JC, MARTIN SJ, MARTINOU JC, MEDEMA JP, MEHLEN P, MEIER P, MELINO S, MIAO EA, MOLKENTIN JD, MOLL UM, MUÑOZ-PINEDO C, NAGATA S, NUÑEZ G, OBERST A, OREN M, OVERHOLTZER M, PAGANO M, PANARETAKIS T, PASPARAKIS M, PENNINGER JM, PEREIRA DM, PERVAIZ S, PETER ME, PIACENTINI M, PINTON P, PREHN JHM, PUTHALAKATH H, RABINOVICH GA, REHM M, RIZZUTO R, RODRIGUES CMP, RUBINSZTEIN DC, RUDEL T, RYAN KM, SAYAN E, SCORRANO L, SHAO F, SHI Y, SILKE J, SIMON HU, SISTIGU A, STOCKWELL BR, STRASSER A, SZABADKAI G, TAIT SWG, TANG D, TAVERNARAKIS N, THORBURN A, TSUJIMOTO Y, TURK B, VANDEN BERGHE T, VANDENABEELE P, VANDER HEIDEN MG, VILLUNGER A, VIRGIN HW, VOUSDEN KH, VUCIC D, WAGNER EF, WALCZAK H, WALLACH D, WANG Y, WELLS JA, WOOD W, YUAN J, ZAKERI Z, ZHIVOTOVSKY B, ZITVOGEL L, MELINO G, KROEMER G (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25, 486-541.

GARIGLIANY MM, HOFFMANN B, DIVE M, SARTELET A, BAYROU C, CASSART D, BEER M, DESMECHT D (2012) Schmallenberg virus in calfborn at term with porencephaly, Belgium. *Emerg Infect Dis*, 18, 1005-6.

GARIGLIANY MM, DESMECHT D, BAYROU C, PEETERS D (2013) No serologic evidence for emerging Schmallenberg virus infection in dogs (*Canis domesticus*). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 13, 830-3.

GARTNER JJ, SETHUPATHY P, HATZIGEORGIOU AG, FRASER NW (2008) Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*, 451, 600.

GERHAUSER I, WEIGAND M, HAHN K, HERDER V, WOHLSEIN P, HABIERSKI A, VARELA M, PALMARINI M, BAUMGÄRTNER W (2014) Lack of Schmallenberg virus in ruminant brain tissues archived from 1961 to 2010 in Germany. *J Comp Pathol*, 150, 151-4.

GOFFREDO M, MONACO F, CAPELLI G, QUAGLIA M, FEDERICI V, CATALANI M, MONTARSI F, POLCI A, PINONI C, CALISTRI P, SAVINI G (2013) Schmallenberg virus in Italy: a retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev Vet Med*, 111, 230-6.

GOLENDER N, BUMBAROV VY, ERSTER O, BEER M, KHINICH Y, WERNIKE K (2018) Development and validation of a universal S-segment-based real-time RT-PCR assay for the detection of Simbu serogroup viruses. *J Virol Methods*, 261, 80-85.

GOLLER KV, HÖPER D, SCHIRRMEIER H, METTENLEITER TC, BEER M (2012) Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect Dis*, 18, 1644-6.

- GOUZIL J, FABLET A, LARA E, CAIGNARD G, COCHET M, KUNDLACZ C, PALMARINI M, VARELA M, BREARD E, SAILLEAU C, VIAROUGE C, COULPIER M, ZIENTARA S, VITOUR D (2016) Nonstructural protein NSs of Schmallenberg virus is targeted to the nucleolus and induces nucleolar disorganization. *J Virol*, 91, e01263-16.
- GROSS A, JOCKEL J, WEI M C, KORSMEYER S J (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*, 17, 3878-3885.
- GROSS A, KATZ SG (2017) Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ*, 24, 1348-1358.
- GU B, ZHANG G-F, LI L-Y, ZHOU F, FENG D-J, DING C-L, CHI J, ZHANG C, GUO D-D, WANG J-F, ZHOU H, YAO K, HU W-X (2011) Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol J*, 8, 530.
- GUICCIARDI M E, GORES G J (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J*, 23, 1625-1637.
- GUO X, LIU WL, YANG D, SHEN ZQ, QIU ZG, JIN M, LI JW (2019) Hepatitis C virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human fetal liver stem cells. *J Pathol*, 248, 155-163.
- HAHN K, HABIERSKI A, HERDER V, WOHLSEIN P, PETERS M, HANSMANN F, BAUMGÄRTNER W (2013) Schmallenberg virus in central nervous system of ruminants. *Emerg Infect Dis*, 19, 154-5.
- HAN X, CONG H (2017) Enterovirus 71 induces apoptosis by directly modulating the conformational activation of pro-apoptotic protein Bax. *J Gen Virol*, 98, 422-434.
- HARADA T, KAPONIS A, IWABE T, TANIGUCHI F, MAKRYDIMAS G, SOFIKITIS N, PASCHOPOULOS M, PARASKEVAIDIS E, TERAKAWA N (2004) Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update*, 10, 29-38.
- HECHINGER S, WERNIKE K, BEER M (2013) Evaluating the protective efficacy of a trivalent vaccine containing Akabane virus, Aino virus and Chuzan virus against Schmallenberg virus infection. *Vet Res*, 5, 44, 114.
- HECHINGER S, WERNIKE K, BEER M (2014) Single immunization with an inactivated vaccine protects sheep from Schmallenberg virus infection. *Vet Res*, 45, 79.
- HELLERT J, AEBISCHER A, WERNIKE K, HAOUZ A, BROCCHI E, REICHE S, GUARDADO-CALVO P, BEER M, REY FA (2019) Orthobunyavirus spike architecture and recognition by neutralizing antibodies. *Nat Commun*, 10, 879.

- HENDERSON S, ROWE M, GREGORY C, CROOM-CARTER D, WANG F, LONGNECKER R, KIEFF E, RICKINSON A (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, 65, 1107-15.
- HERDER V, WOHLSEIN P, PETERS M, HANSMANN F, BAUMGÄRTNER W (2012) Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallerberg virus in Germany. *Vet Pathol*, 49, 588-91.
- HERDER V, HANSMANN F, WOHLSEIN P, PETERS M, VARELA M, PALMARINI M, BAUMGÄRTNER W (2013) Immunophenotyping of inflammatory cells associated with Schmallerberg virus infection of the central nervous system of ruminants. *PLoS One*, 8, e62939.
- HOFFMANN B, LIEBERMANN D A (2008) Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*, 27, 6462-6472.
- HOFFMANN B, SCHEUCH M, HÖPER D, JUNGBLUT R, HOLSTEG M, SCHIRRMIEIER H, ESCHBAUMER M, GOLLER KV, WERNIKE K, FISCHER M, BREITHAUPT A, METTENLEITER TC, BEER M (2012) Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis*, 18, 469-72.
- HOFFMANN B, SCHULZ C, BEER M (2013) First detection of Schmallerberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012. *Vet Microbiol*, 167, 289-95.
- HOFMANN MA, MADER M, FLÜCKIGER F, RENZULLO S (2015) Genetic stability of Schmallerberg virus in vivo during an epidemic, and in vitro, when passaged in the highly susceptible porcine SK-6 cell line. *Vet Microbiol*, 176, 97-108.
- HUANG DCS, CORY S, STRASSER A (1997) Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene*, 14, 405-414.
- ICTV (2018) Virus Taxonomy: 2018b Release. International Committee on Taxonomy of Viruses. Erişim: [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>] Erişim tarihi: 23.10.2019
- ILCHMANN A, ARMSTRONG AA, CLAYTON RF (2017) Schmallerberg virus, an emerging viral pathogen of cattle and sheep and a potential contaminant of raw materials, is detectable by classical in-vitro adventitious virus assays. *Biologicals*, 49, 28-32.
- ILKOW CS, GOPING IS, HOBMAN TC (2011) The Rubella virus capsid is an anti-apoptotic protein that attenuates the pore-forming ability of Bax. *PLoS Pathog*, 7, e1001291.
- JACKS T, FAZELI A, SCHMITT E M, BRONSON R T, GOODELL M A, WEINBERG R A (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*, 359, 295-300.
- JACOTOT E, RAVAGNAN L, LOEFFLER M, FERRI KF, VIEIRA HL, ZAMZAMI N, COSTANTINI P, DRUILLENNEC S, HOEBEKE J, BRIAND JP, IRINOPOULOU T,

- DAUGAS E, SUSIN SA, COINTE D, XIE ZH, REED JC, ROQUES BP, KROEMER G (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med*, 191, 33-46.
- JACOTOT E, FERRI K F, EL HAMEL C, BRENNER C, DRUILLENNEC S, HOEBEKE J, RUSTIN P, METIVIER D, LENOIR C, GEUSKENS M, VIEIRA HLA, LOEFFLER M, BELZACQ A-S, BRIAND J-P, ZAMZAMI N, EDELMAN L, XIE ZH, REED JC, ROQUES BP, KROEMER G (2001) Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *J Exp Med*, 193, 509-519.
- JIN H, XIAO C, ZHAO G, DU X, YU Y, KANG Y, WANG B (2007) Induction of immature dendritic cell apoptosis by foot and mouth disease virus is an integrin receptor mediated event before viral infection. *J Cell Biochem*, 102, 980-991.
- JONES C (2013) Bovine herpes virus 1 (BHV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) promote survival of latently infected sensory neurons, in part by inhibiting apoptosis. *J Cell Death*, 6, 1-16.
- JONES S, EDEN L, MCKAY H, BOLLARD N, DUNHAM S, DAVIES P, TARLINTON R (2019) Schmallenberg virus neutralising antibody responses in sheep. *BMC Vet Res*, 15, 426.
- JULIEN O, WELLS JA (2017) Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 24, 1380-1389.
- KABSCH K, ALONSO A (2002) The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 76, 12162-12172.
- KAJITA M, KATAYAMA H, MURATA T, KAI C, HORI M, OZAKI H (2006) Canine distemper virus induces apoptosis through caspase-3 and -8 activation in vero cells. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53, 273-7.
- KALE J, LIU Q, LEBER B, ANDREWS D W (2012) Shedding light on apoptosis at subcellular membranes. *Cell*, 151, 1179-1184.
- KANG JI, PARK SH, LEE PW, AHN BY (1999) Apoptosis is induced by hantaviruses in cultured cells. *Virology*, 264, 99-105.
- KARLBERG H, TAN YJ, MIRAZIMI A (2011) Induction of caspase activation and cleavage of the viral nucleocapsid protein in different cell types during Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection. *J Biol Chem*, 286, 3227-34.
- KARLBERG H, TAN YJ, MIRAZIMI A (2015) Crimean-Congo haemorrhagic fever replication interplays with regulation mechanisms of apoptosis. *J Gen Virol*, 96, 538-46.
- KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.

- KĘSIK-MALISZEWSKA J, LARSKA M (2016) Detection of Schmallenberg virus RNA in bull semen in Poland. *Pol J Vet Sci*, 19, 655-657.
- KĘSIK-MALISZEWSKA J, JABŁOŃSKI A, LARSKA M (2017) Were Polish wild boars exposed to Schmallenberg virus? *J Vet Res*, 61, 151-155.
- KĘSIK-MALISZEWSKA J, ANTOS A, ROLA J, LARSKA M (2018) Comparison of Schmallenberg virus sequences isolated from mammal host and arthropod vector. *Virus Genes*, 54, 792-803.
- KĘSIK-MALISZEWSKA J, POMORSKA-MÓL M, COLLINS ÁB, ROLA J, LARSKA M (2019) Potential use of hematological and acute phase protein parameters in the diagnosis of acute Schmallenberg virus infection in experimentally infected calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 64, 146-152.
- KNUDSEN K E, WEBER E, ARDEN K C, CAVENEE W K, FERAMISCO J R, KNUDSEN E S (1999) The retinoblastoma tumor suppressor inhibits cellular proliferation through two distinct mechanisms: inhibition of cell cycle progression and induction of cell death. *Oncogene*, 18, 5239-45.
- KOHL A, CLAYTON RF, WEBER F, BRIDGEN A, RANDALL RE, ELLIOTT RM (2003) Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J Virol*, 77, 7999-8008.
- KÖNIG P, WERNIKE K, HECHINGER S, TAUSCHER K, BREITHAUPT A, BEER M (2019) Fetal infection with Schmallenberg virus - An experimental pathogenesis study in pregnant cows. *Transbound Emerg Dis*, 66, 454-462.
- KRAATZ F, WERNIKE K, HECHINGER S, KÖNIG P, GRANZOW H, REIMANN I, BEER M (2015) Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol*, 89, 1825-37.
- KRAATZ F, WERNIKE K, REICHE S, AEBISCHER A, REIMANN I, BEER M (2018) Schmallenberg virus non-structural protein NSm: Intracellular distribution and role of non-hydrophobic domains. *Virology*, 516, 46-54.
- KU B-K, KIM S-B, MOON O-K, LEE S-J, LEE J-H, LYOO Y-S, KIM H-J, SUR J-H (2005) Role of apoptosis in the pathogenesis of asian and south american foot-and-mouth disease viruses in swine. *J Vet Med Sci*, 67, 1081-1088.
- KUMAR V, ABBAS AK, ASTER JC (2012) Robbins Basic Pathology, 9th ed, Elsevier Health Sciences, Philadelphia, chapter 1.
- KVANSAKUL M, WEI AH, FLETCHER JI, WILLIS SN, CHEN L, ROBERTS AW, HUANG DC, COLMAN PM (2010) Structural basis for apoptosis inhibition by Epstein-Barr virus BHRF1. *PLoS Pathog*, 6, e1001236.

- KVANSAKUL M, CARIA S, HINDS MG (2017) The Bcl-2 family in host-virus interactions. *Viruses*, 9, pii: E290.
- LADELFA M F, KOTSIAS F, DEL MEDICO ZAJAK M P, VAN DEN BROEKE C, FAVOREEL H, ROMERA S A, CALAMANTE G (2011) Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. *Vet Microbiol*, 153, 361-366.
- LALOY E, RIOU M, BARC C, BELBIS G, BRÉARD E, BRETON S, CORDONNIER N, CROCHET D, DELAUNAY R, MOREAU J, POZZI N, RAIMBOURG M, SARRADIN P, TRAPP S, VIAROUGE C, ZIENTARA S, PONSART C (2015) Schmallenberg virus: experimental infection in goats and bucks. *BMC Vet Res*, 11, 221.
- LALOY E, BRAUD C, BRÉARD E, KAANDORP J, BOURGEOIS A, KOHL M, MEYER G, SAILLEAU C, VIAROUGE C, ZIENTARA S, CHAI N (2016) Schmallenberg virus in zoo ruminants, France and the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 22, 2201-2203.
- LALOY E, BRÉARD E, TRAPP S, POZZI N, RIOU M, BARC C, BRETON S, DELAUNAY R, CORDONNIER N, CHATEAU-JOUBERT S, CROCHET D, GOUZIL J, HÉBERT T, RAIMBOURG M, VIAROUGE C, VITOUR D, DURAND B, PONSART C, ZIENTARA S (2017) Fetopathic effects of experimental Schmallenberg virus infection in pregnant goats. *Vet Microbiol*, 211, 141-149.
- LAN Y, ZHAO K, WANG G, DONG B, ZHAO J, TANG B, LU H, GAO W, CHANG L, JIN Z, GAO F, HE W (2013) Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus induces apoptosis in a porcine kidney cell line via caspase-dependent pathways. *Virus Res*, 176, 292-7.
- LARSKA M, POLAK MP, GROCHOWSKA M, LECHOWSKI L, ZWIĄZEK JS, ZMUDZIŃSKI JF (2013a) First report of Schmallenberg virus infection in cattle and midges in Poland. *Transbound Emerg Dis*, 60, 97-101.
- LARSKA M, LECHOWSKI L, GROCHOWSKA M, ŻMUDZIŃSKI JF (2013b) Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides* *sobsoletus*/scoticus complex and *C. punctatus*--the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet Microbiol*, 166, 467-73.
- LARSKA M, KRZYSIAK MK, KĘSIK-MALISZEWSKA J, ROLA J (2014) Cross-sectional study of Schmallenberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at the end of the vector season of 2013. *BMC Vet Res*, 10, 967.
- LAZUTKA J, ZVIRBLIENE A, DALGEDIENE I, PETRAITYTE-BURNEIKIENE R, SPAKOVA A, SEREIKA V, LELESIUS R, WERNIKE K, BEER M, SASNAUSKAS K (2014) Generation of recombinant Schmallenberg virus nucleocapsid protein in yeast and development of virus-specific monoclonal antibodies. *J Immunol Res*, 2014, 160316.
- LAZUTKA J, SPAKOVA A, SEREIKA V, LELESIUS R, SASNAUSKAS K, PETRAITYTE-BURNEIKIENE R (2015) Saliva as an alternative specimen for detection of Schmallenberg virus-specific antibodies in bovines. *BMC Vet Res*, 11, 237.

- LEASK R, BOTHA AM, BATH GF (2013) Schmallerberg virus--is it present in South Africa? *J S Afr Vet Assoc*, 84, E1-4.
- LECHNER I, WÜTHRICH M, MEYLAN M, VAN DEN BORNE BHP, SCHÜPBACH-REGULA G (2017) Association of clinical signs after acute Schmallerberg virus infection with milk production and fertility in Swiss dairy cows. *Prev Vet Med*, 146, 121-129.
- LEE JH, SEO HJ, PARK JY, KIM SH, CHO YS, KIM YJ, CHO IS, JEOUNG HY (2015) Detection and differentiation of Schmallerberg, Akabane and Aino viruses by one-step multiplex reverse-transcriptase quantitative PCR assay. *BMC Vet Res*, 11, 270.
- LI G, REN J, XU F, FERGUSON MR (2010) Non-structural and nucleocapsid proteins of Punta Toro virus induce apoptosis of hepatocytes through both intrinsic and extrinsic pathways. *Microbiol Immunol*, 54, 20-30.
- LI J, YUAN J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27, 6194-6206.
- LI W, CHEN H, DENG H, KUANG Z, LONG M, CHEN D, LIAO X, LI M, ROCK DL, LUO S, HAO W (2018) Orf Virus Encoded Protein ORFV119 Induces Cell Apoptosis Through the Extrinsic and Intrinsic Pathways. *Front Microbiol*, 2018, 9, 1056.
- LIM S I, KWEON C H, YANG D K, TARK D S, KWEON J H (2005) Apoptosis in Vero cells infected with Akabane, Aino and Chuzan virus. *Vet Sci*, 6, 251-254.
- LIN P, CHENG Y, SONG S, QIU J, YI L, CAO Z, LI J, CHENG S, WANG J (2019) Viral Nonstructural Protein 1 Induces Mitochondrion-Mediated Apoptosis in Mink Enteritis Virus Infection. *J Virol*, 93, e01249-19.
- LIN Y-Z, CAO X-Z, LI L, LI L, JIANG C-G, WANG X-F, MA J, ZHOU J-H (2011) The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression and apoptosis in macrophages. *Virus Res*, 160, 274-282.
- LIU B, MENG D, WEI T, ZHANG S, HU Y, WANG M (2014) Apoptosis and pro-inflammatory cytokine response of mast cells induced by influenza A viruses. *PLoS One*, 9, e100109.
- LIU C, XU HY, LIU D X (2001) Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*, 75, 6402-6409.
- LIU X, HAPPEL C, ZIEGELBAUER JM (2017) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs target GADD45B to protect infected cells from cell cycle arrest and apoptosis. *J Virol*, 91, pii: e02045-16.
- LOEFFEN W, QUAK S, DE BOER-LUIJTZE E, HULST M, VAN DER POEL W, BOUWSTRA R, MAAS R (2012) Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallerberg virus and serological results in suspect and infected herds. *Acta Vet Scand*. 54, 44.

- LUO X, BUDIARDJO I, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X (1998) Bid, a Bcl-2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490.
- LUTTIKHOLT S, VELDHUIS A, VAN DEN BROM R, MOLL L, LIEVAART-PETERSON K, PEPPERKAMP K, VAN SCHAİK G, VELLEMA P (2014) Risk factors for malformations and impact on reproductive performance and mortality rates of Schmallenberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PLoS One*, 9, e100135.
- MACLACHLAN NJ, DUBOVI E J (2011) Fenner's Veterinary Virology, 4th Ed, Academic Press Elsevier, chapter 4.
- MACUN HC, AZKUR AK, KALENDER H, ERAT S (2017) Seroprevalance of Schmallenberg virus and its relationship with some geographical features in sheep reared in Kirikkale. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64, 93-97.
- MACUN HC, ÇINAR M, AZKUR AK, KALENDER H, ERAT S (2018) Oxidative stress in Akkaraman ewes with seropositive for Schmallenberg virus. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 13, 128-134.
- MAHMOOD Z, SHUKLA Y (2010) Death Receptor: Targets for cancer therapy. *Exp Cell Res*, 316, 887-899.
- MAJTNEROVÁ P, ROUŠAR T (2018) An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep*, 45, 1469-1478.
- MANLEY R, HARRUP LE, VERONESI E, STUBBINS F, STONER J, GUBBINS S, WILSON A, BATTEN C, KOENRAADT CJ, HENSTOCK M, BARBER J, CARPENTER S (2015) Testing of UK populations of *Culex pipiens* L. for Schmallenberg virus vector competence and their colonization. *PLoS One*, 10, e0134453.
- MANSFIELD KL, LA ROCCA SA, KHATRI M, JOHNSON N, STEINBACH F, FOOKS AR (2013) Detection of Schmallenberg virus serum neutralising antibodies. *J Virol Methods*, 188, 139-44.
- MARINO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE EH, KROEMER G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 81-94.
- MARTI A, JAGGI R, VALLAN C, RITTER PM, BALTZER A, SRINIVASAN A, DHARMARAJAN AM, FRIIS RR (1999) Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases. *Cell Death Differ*, 6, 1190-1200.
- MARTINELLE L, DAL POZZO F, GAUTHIER B, KIRSCHVINK N, SAEGERMAN C (2014) Field veterinary survey on clinical and economic impact of Schmallenberg virus in Belgium. *Transbound Emerg Dis*, 61, 285-8.

- MARTINELLE L, POSKIN A, DAL POZZO F, DE REGGE N, CAY B, SAEGERMAN C (2015) Experimental infection of sheep at 45 and 60 days of gestation with Schmallerberg virus readily led to placental colonization without causing congenital malformations. *PLoS One*, 10, e0139375.
- MARTINELLE L, POSKIN A, DAL POZZO F, MOSTIN L, VAN CAMPE W, CAY AB, DE REGGE N, SAEGERMAN C (2017) Three different routes of inoculation for experimental infection with Schmallerberg virus in sheep. *Transbound Emerg Dis*, 64, 305-308.
- MATHEW C, KLEVAR S, ELBERS AR, VAN DER POEL WH, KIRKLAND PD, GODFROID J, MDEGELA RH, MWAMENGELE G, STOKSTAD M (2015) Detection of serum neutralizing antibodies to Simbusero-group viruses in cattle in Tanzania. *BMC Vet Res*, 11, 208.
- MATSUMOTO Y, NOUCHI T, OHTA K, NISHIO M (2019) Regulation of Hazara virus growth through apoptosis inhibition by viral nucleoprotein. *Arch Virol*, 164, 1597-1607.
- MCARTHUR K, KILE BT (2018) Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol*, 28, 475-493.
- MCILROY D, TANAKA M, SAKAHIRA H, FUKUYAMA H, SUZUKI M, YAMAMURA K, OHSAWA Y, UCHIYAMA Y, NAGATA S (2000) An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev*, 14, 549-558.
- MEHTA N, TAYLOR J, QUILTY D, BARRY M (2015) Ectromelia virus encodes an anti-apoptotic protein that regulates cell death. *Virology*, 475, 74-87.
- MEHRBOD P, ANDE SR, ALIZADEH J, RAHIMIZADEH S, SHARIATI A, MALEK H, HASHEMI M, GLOVER KKM, SHER AA, COOMBS KM, GHAVAMI S (2019) The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence*, 10, 376-413.
- METZ GE, SERENA MS, ABEYA MM, DULBECCO AB, MASSONE A, DIAZ S, ECHEVERRIA MG (2014) Equine arteritis virus gP5 protein induces apoptosis in cultured insect cells. *Virus Res*, 183, 81-84.
- METZ GE, GALINDO I, ABEYÁ MM, ECHEVERRÍA MG, ALONSO C (2016) Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus Res*, 213, 219-223.
- METZ GE, ABEYÁ MM, SERENA MS, PANEI CJ, ECHEVERRÍA MG (2019) Evaluation of apoptosis markers in different cell lines infected with equine arteritis virus. *Biotech Histochem*, 94, 115-125.
- MITOMO S, OMATSU T, TSUCHIAKA S, NAGAI M, FURUYA T, MIZUTANI T (2016) Activation of c-Jun N-terminal kinase by Akabane virus is required for apoptosis. *Res Vet Sci*, 107, 147-151.

- MIYASHITA T, REED JC (1995) Tumor Suppressor p53 is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax gene. *Cell*, 80, 293-299.
- MOLINI U, CAPOBIANCO DONDONA A, HILBERT R, MONACO F (2018) Antibodies against Schmallenberg virus detected in cattle in the Otjozondjupa region, Namibia. *J S Afr Vet Assoc*, 89, e1-e2.
- MONACO F, GOFFREDO M, FEDERICI V, CARVELLI A, CAPOBIANCO DONDONA A, POLCI A, PINONI C, DANZETTA ML, SELLI L, BONCI M, QUAGLIA M, CALISTRI P (2013) First cases of Schmallenberg virus in Italy: surveillance strategies. *Vet Ital*, 49, 269-75.
- MONDAL B, SREENIVASA BP, DHAR P, SINGH RP, BANDYOPADHYAY SK (2001) Apoptosis induced by peste des petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. *Virus Res*, 73, 113-119.
- MORTOLA E, NOAD R, ROY P (2004) Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J Virol*, 78, 2875-2883.
- MOUCHANTAT S, WERNIKE K, LUTZ W, HOFFMANN B, ULRICH RG, BÖRNER K, WITTSTATT U, BEER M (2015) A broad spectrum screening of Schmallenberg virus antibodies in wildlife animals in Germany. *Vet Res*, 46, 99.
- MURAKAMI S, TAKENAKA-UEMA A, KOBAYASHI T, KATO K, SHIMOJIMA M, PALMARINI M, HORIMOTO T (2017) Heparan sulfate proteoglycan is an important attachment factor for cell entry of Akabane and Schmallenbergviruses. *J Virol*, 91, e00503-17.
- NAGALEEKAR VK, TIWARI AK, KATARIA RS, BAIS MV, RAVINDRA PV, KUMAR S (2007) Bluetongue virus induces apoptosis in cultured mammalian cells by both caspase-dependent extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Arch Virol*, 152, 1751-1756.
- NAKAMICHI K, MATSUMOTO Y, OTSUKA H (2002) Bovine herpesvirus 1 Us ORF8 protein induces apoptosis in infected cells and facilitates virus egress. *Virology*, 304, 24-32.
- NAKANO K, VOUSDEN KH (2001) Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-694.
- NAKAZONO-KUSABA A, TAKAHASHI-YANAGA F, MORIMOTO S, FURUE M, SASAGURI T (2002) Staurosporine-induced cleavage of alpha-smooth muscle actin during myofibroblast apoptosis. *J Invest Dermatol*, 119, 1008-13.
- NÄSLUND K, BLOMQVIST G, VERNERSSON C, ZIENTARA S, BRÉARD E, VALARCHER JF (2014) Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological detection of Schmallenberg virus antibodies in ruminants using whole virus antigen. *Acta Vet Scand*, 56, 71.
- O'BRIEN V (1998) Viruses and apoptosis. *J Gen Virol*, 79, 1833-1845.

- ODA E, OHKI R, MURASAWA H, NEMOTO J, SHIBUE T, YAMASHITA T, TOKINO T, TANIGUCHI T, TANAKA N (2000) Noxa, a BH-3 only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-1058.
- OLUWAYELU D, WERNIKE K, ADEBIYI A, CADMUS S, BEER M (2018) Neutralizing antibodies against Simbuserogroup viruses in cattle and sheep, Nigeria, 2012-2014. *BMC Vet Res*, 14, 277.
- ONTIVEROS SJ, LI Q, JONSSON CB (2010) Modulation of apoptosis and immune signaling pathways by the Hantaan virus nucleocapsid protein. *Virology*, 401, 165-78.
- PAGÈS N, TALAVERA S, VERDÚN M, PUJOL N, VALLE M, BENSALD A, PUJOLS J (2018) Schmallenberg virus detection in Culicoides biting midges in Spain: First laboratory evidence for highly efficient infection of Culicoides of the Obsoletus complex and Culicoides imicola. *Transbound Emerg Dis*, 65, e1-e6.
- PAPAIANNI E, EL MAADIDI S, SCHEJTMAN A, NEUMANN S, MAURER U, MARINOMERLO F, MASTINO A, BORNER C (2015) Phylogenetically distant viruses use the same BH3-only protein Puma to trigger Bax/Bak-dependent apoptosis of infected mouse and human cells. *PLoS One*, 10, e0126645.
- PARQUET MC, KUMATORI A, HASEBE F, MORITA K, IGARASHI A (2001) West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett*, 500, 17-24.
- PARK SY, KIM IS (2019) Stabilin Receptors: Role as Phosphatidylserine Receptors. *Biomolecules*, 9, pii: E387.
- PEDRERA M, GOMEZ-VILLAMANDOS JC, ROMERO-TRAVEJO JL, RISALDE MA, MOLINA V, SANCHEZ-CORDON P (2009) Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1: activation of effector caspase-3 and role of macrophages. *J Gen Virol*, 90, 2650-2659.
- PEJAKOVIĆ S, WIGGERS L, COUPEAU D, KIRSCHVINK N, MASON J, MUYLKENS B (2018) Test selection for antibody detection according to the seroprevalence level of Schmallenberg virus in sheep. *PLoS One*, 13, e0196532.
- PEKOSZ A, PHILLIPS J, PLEASURE D, MERRY D, GONZALEZ-SCARANO F (1996) Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. *J Virol*, 70, 5329-35.
- PENG J-M, LIANG S-M, LIANG C-M (2004) VP1 of foot-and-mouth disease virus induces apoptosis via the akt signaling pathway. *J Biol Chem*, 279, 52168-52174.
- PEPERKAMP NH, LUTTIKHOLT SJ, DIJKMAN R, VOS JH, JUNKER K, GREIJDANUS S, ROUMEN MP, VAN GARDEREN E, MEERTENS N, VAN MAANEN C, LIEVAART K, VAN WUYCKHUISE L, WOUDA W (2015) Ovine and bovine congenital abnormalities associated with intrauterine infection with Schmallenberg virus. *Vet Pathol*, 52, 1057-66.

- PFAFFL MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PFANKUCHE VM, HAHN K, BODEWES R, HANSMANN F, HABIERSKI A, HAVERKAMP AK, PFAENDER S, WALTER S, BAECHLEIN C, POSTEL A, STEINMANN E, BECHER P, OSTERHAUS A, BAUMGÄRTNER W, PUFF C (2018) Comparison of different in situ hybridization techniques for the detection of various RNA and DNA viruses. *Viruses*, 10, pii: E384.
- PILLET S, VON MESSLING V (2009) Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. *J Virol*, 83, 6279-6287.
- PONSART C, POZZI N, BRÉARD E, CATINOT V, VIARD G, SAILLEAU C, VIAROUGE C, GOUZIL J, BEER M, ZIENTARA S, VITOUR D (2014) Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res*, 45, 37.
- POOLE E, MCGREGOR DALLAS SR, COLSTON J, JOSEPH RS, SINCLAIR J (2011) Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34⁺ progenitors. *J Gen Virol*, 92, 1539-49.
- POSKIN A, VAN CAMPE W, MOSTIN L, CAY B, DE REGGE N (2014a) Experimental Schmallenberg virus infection of pigs. *Vet Microbiol*, 170, 398-402.
- POSKIN A, MARTINELLE L, MOSTIN L, VAN CAMPE W, DAL POZZO F, SAEGERMAN C, CAY AB, DE REGGE N (2014b) Dose-dependent effect of experimental Schmallenberg virus infection in sheep. *Vet J*, 201, 419-22.
- POSKIN A, VERITE S, COMTET L, VAN DER STEDE Y, CAY B, DE REGGE N (2015) Persistence of the protective immunity and kinetics of the isotype specific antibody response against the viral nucleocapsid protein after experimental Schmallenberg virus infection of sheep. *Vet Res*, 46, 119.
- POSKIN A, MARTINELLE L, VAN DER STEDE Y, SAEGERMAN C, CAY B, DE REGGE N (2017) Genetically stable infectious Schmallenberg virus persists in foetal envelopes of pregnant ewes. *J Gen Virol*, 98, 1630-1635.
- PUGAZHENTHI S, GILDEN DH, NAIR S, MCADOO A, WELLISH M, BRAZEAU E, MAHALINGAM R (2009) Simian varicella virus induces apoptosis in monkey kidney cells by the intrinsic pathway and involves downregulation of bcl-2 expression. *J Virol*, 83, 9273-82.
- RABOISSON D, WARET-SZKUTA A, RUSHTON J, HÄSLER B, ALARCON P (2014) Application of integrated production and economic models to estimate the impact of Schmallenberg virus for various beef suckler production systems in France and the United Kingdom. *BMC Vet Res*, 10, 254.

- RADONIĆ A, THULKE S, MACKAY IM, LANDT O, SIEGERT W, NITSCHKE A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 856-62.
- RASEKH M, SARANI A, HASHEMI SH (2018) Detection of Schmallenberg virus antibody in equine population of Northern and Northeast of Iran. *Vet World*, 11, 30-33.
- RASMUSSEN LD, KRISTENSEN B, KIRKEBY C, RASMUSSEN TB, BELSHAM GJ, BØDKER R, BØTNER A (2012) Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis*, 18, 1204-6.
- RASMUSSEN LD, KIRKEBY C, BØDKER R, KRISTENSEN B, RASMUSSEN TB, BELSHAM GJ, BØTNER A (2014) Rapid spread of Schmallenberg virus-infected biting midges (Culicoides spp.) across Denmark in 2012. *Transbound Emerg Dis*, 61, 12-6.
- REUSKEN C, VAN DEN WIJNGAARD C, VAN BEEK P, BEER M, BOUWSTRA R, GODEKE GJ, ISKEN L, VAN DEN KERKHOF H, VAN PELT W, VAN DER POEL W, REIMERINK J, SCHIELEN P, SCHMIDT-CHANASIT J, VELLEMA P, DE VRIES A, WOUTERS I, KOOPMANS M (2012) Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis*, 18, 1746-54.
- REZAEI S A R, CUNNINGHAM C, DAVIDSON A J, BLACKBOURN D J (2006) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *J Gen Virol*, 87, 1781-1804.
- RODRIGUES R, PARANHOS-BACCALA G, VERNET G, PEYREFITTE CN (2012) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-infected hepatocytes induce ER-stress and apoptotic crosstalk. *Plos One*, 7, 1-11.
- RODRÍGUEZ-PRIETO V, KUKIELKA D, MOURIÑO M, PARADELL H, PLAJA L, URNIZA A, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO JM (2016) Natural immunity of sheep and lambs against the Schmallenberg virus infection. *Transbound Emerg Dis*, 63, e220-8.
- ROMAN-SOSA G, BROCCHI E, SCHIRRMIEIER H, WERNIKE K, SCHELP C, BEER M (2016) Analysis of the humoral immune response against the envelope glycoprotein Gc of Schmallenberg virus reveals a domain located at the amino terminus targeted by mAbs with neutralizing activity. *J Gen Virol*, 97, 571-80.
- ROMAN-SOSA G, KARGER A, KRAATZ F, AEBISCHER A, WERNIKE K, MAKSIMOV P, LILLIG CH, REIMANN I, BROCCHI E, KELLER M, BEER M (2017) The amino terminal subdomain of glycoprotein Gc of Schmallenberg virus: disulfide bonding and structural determinants of neutralization. *J Gen Virol*, 98, 1259-1273.
- ROMANOVA LI, LIDSKY PV, KOLESNIKOVA MS, FOMINYKH KV, GMYL AP, SHEVAL EV, HATO SV, VAN KUPPEVELD FJ, AGOL VI (2009) Antiapoptotic activity of the cardiovirus leader protein, a viral "security" protein. *J Virol*, 83, 7273-84.

- RUBINSTEIN A D, KIMCHI A (2012) Life in the balance-a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*, 125, 5259-5268.
- SAEGERMAN C, MARTINELLE L, DAL POZZO F, KIRSCHVINK N (2014) Preliminary survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of Belgium. *Transbound Emerg Dis*, 61, 469-72.
- SAHU AR, WANI SA, SAXENA S, RAJAK KK, CHAUDHARY D, SAHOO AP, KHANDURI A, PANDEY A, MONDAL P, MALLA WA, KHAN RIN, TIWARI AK, MISHRA B, MUTHUCHELVAN D, MISHRA BP, SINGH RK, GANDHAM RK (2018) Selection and validation of suitable reference genes for qPCR gene expression analysis in goats and sheep under Peste des petits ruminants virus (PPRV), lineage IV infection. *Sci Rep*, 8, 15969.
- SAIKUMAR P, VENKATACHALAM MA (2009) Apoptosis and Cell Death. In: Basic Concepts of Molecular Pathology. Ed. P T CAGLE, Springer Science+Business Media, New York, p: 29-40.
- SAILLEAU C, BRÉARD E, VIAROUGE C, DESPRAT A, DOCEUL V, LARA E, LANGUILLE J, VITOUR D, ATTOUI H, ZIENTARA S (2013a) Acute Schmallenberg virus infections, France, 2012. *Emerg Infect Dis*, 19, 321-2.
- SAILLEAU C, BOOGAERTS C, MEYRUEIX A, LALOY E, BRÉARD E, VIAROUGE C, DESPRAT A, VITOUR D, DOCEUL V, BOUCHER C, ZIENTARA S, NICOLIER A, GRANDJEAN D (2013b) Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. *Emerg Infect Dis*, 19, 1896-8.
- SALL AA, ZANOTTO PM, SENE OK, ZELLER HG, DIGOUTTE JP, THIONGANE Y, BOULOY M (1999) Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature. *J Virol*, 73, 8196-200.
- SAX J K, FEI P, MURPHY M E, BERNHARD E, KORSMEYER S J, EL-DEIRY W S (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, 4, 842-849.
- SAXENA L, KUMAR G R, SAXENA S, CHATURVEDI U, SAHOO A P, SINGH L V, SANTRA L, PALIA S K, DESAI G S, TIWARI A K (2013) Apoptosis induced by NS1 gene of canine parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Virus Res*, 173, 426-430.
- SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHULZ C, WERNIKE K, BEER M, HOFFMANN B (2014) Infectious Schmallenberg virus from bovine semen, Germany. *Emerg Infect Dis*, 20, 338-40.
- SCHULZ C, BEER M, HOFFMANN B (2015a) Schmallenberg virus infection in South American camels: Field and experimental investigations. *Vet Microbiol*, 180, 171-9.

- SCHULZ C, VAN DER POEL WH, PONSART C, CAY AB, STEINBACH F, ZIENTARA S, BEER M, HOFFMANN B (2015b) European interlaboratory comparison of Schmallenberg virus (SBV) real-time RT-PCR detection in experimental and field samples: The method of extraction is critical for SBV RNA detection in semen. *J Vet Diagn Invest*, 27, 422-30.
- SCHULZE-OSTHOFF K, FERRARI D, LOS M, WESSELBORG S, PETER ME (1998) Apoptosis signaling by death receptor. *Eur J Biochem*, 254, 439-459.
- SCROCHI MR, ZANUZZI CN, FUENTEALBA N, NISHIDA F, BRAVI ME, PACHECO ME, SGUAZZA GH, GIMENO EJ, PORTIANSKY EL, MUGLIA CI, GALOSI CM, BARBEITO CG (2017) Investigation of apoptosis in cultured cells infected with equine herpesvirus 1. *Biotech Histochem*, 92, 560-568.
- SEEHUSEN F, HAHN K, HERDER V, WEIGAND M, HABIERSKI A, GERHAUSER I, WOHLSEIN P, PETERS M, VARELA M, PALMARINI M, BAUMGÄRTNER W (2014) Skeletal muscle hypoplasia represents the only significant lesion in peripheral organs of ruminants infected with Schmallenberg virus during gestation. *J Comp Pathol*, 151, 148-52.
- SÉGARD A, GARDÈS L, JACQUIER E, GRILLET C, MATHIEU B, RAKOTOARIVONY I, SETIER-RIO ML, CHAVERNAC D, CÊTRE-SOSSAH C, BALENGHIEN T, GARROS C (2018) Schmallenberg virus in *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) populations in France during 2011-2012 outbreak. *Transbound Emerg Dis*, 65, e94-e103.
- SEGAWA K, NAGATA S (2015) An apoptotic 'Eat Me' signal: Phosphatidylserine exposure. *Trends Cell Biol*, 25, 639-650.
- SHAHSAVANDI S, EBRAHIMI MM, SADEGHI K, MOSAVI SZ, MOHAMMADI A (2013) Dose- and time-dependent apoptosis induced by avian H9N2 influenza virus in human cells. *Biomed Res Int*, 2013, 524165.
- SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, KUMAR S (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, 22, 526-39.
- SHAMANNA RA, HOQUE M, PEERY T, MATHEWS MB (2013) Induction of p53, p21 and apoptosis by silencing the NF90/NF45 complex in human papilloma virus-transformed cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 24, 5176-5185.
- SHAMAS-DIN A, KALE J, LEBER B, ANDREWS DW (2013) Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008714.
- SHI Y, CHEN J, WENG C, CHEN R, ZHENG Y, CHEN Q, TANG H (2003) Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 989-996.
- SIBHAT B, AYELET G, GEBREMEDHIN EZ, SKJERVE E, ASMARE K (2018) Seroprevalence of Schmallenberg virus in dairy cattle in Ethiopia. *Acta Trop*, 178, 61-67.

- SOLÀ-RIERA C, GUPTA S, MALEKI KT, GONZÁLEZ-RODRIGUEZ P, SAIDI D, ZIMMER CL, VANGETI S, RIVINO L, LEO YS, LYE DC, MACARY PA, AHLM C, SMED-SÖRENSEN A, JOSEPH B, BJÖRKSTRÖM NK, LJUNGGREN HG, KLINGSTRÖM J (2019a) Hantavirus inhibits TRAIL-mediated killing of infected cells by downregulating Death Receptor 5. *Cell Rep*, 28, 2124-2139.e6.
- SOLÀ-RIERA C, GUPTA S, LJUNGGREN HG, KLINGSTRÖM J (2019b) Orthohantaviruses belonging to three phylogroups all inhibit apoptosis in infected target cells. *Sci Rep*, 9, 834.
- SPEAD O, VERREET T, DONELSON CJ, POULAIN FE (2018) Characterization of the caspase family in zebrafish. *PLoS One*, 13, e0197966.
- STEINRIGL A, SCHIEFER P, SCHLEICHER C, PEINHOPF W, WODAK E, BAGÓ Z, SCHMOLL F (2014) Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013. *Prev Vet Med*, 116, 350-9.
- ST-LOUIS MC, MASSIE B, ARCHAMBAULT D (2005) The bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. *Vet Res*, 36, 213-227.
- ST-LOUIS MC, ARCHAMBAULT D (2007) The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation. *Virology*, 367, 147-55.
- SUZUKI K, MATSUI Y, MIURA Y, SENTSUI H (2008) Equine coronavirus induces apoptosis in cultured cells. *Vet Microbiol*, 129, 390-395.
- SUZUKI T, FUJIKURA K, HIGASHIYAMA T, TAKATA K (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*, 45, 49-53.
- TAIT S W G, GREEN D R (2010) Mitochondria and cell death outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 621-632.
- TAUSCHER K, WERNIKE K, FISCHER M, WEGELT A, HOFFMANN B, TEIFKE JP, BEER M (2017) Characterization of Simbu serogroup virus infections in type I interferon receptor knock-out mice. *Arch Virol*, 162, 3119-3129.
- TERASAKI K, WON S, MAKINO S (2013) The C-terminal region of Rift Valley fever virus NSm protein targets the protein to the mitochondrial outer membrane and exerts antiapoptotic function. *J Virol*, 87, 676-82.
- TEWARI M, DIXIT VM (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem*, 270, 3255-3260.
- THALER R, SPITZER S, KARLIC H, KLAUSHOFER K, VARGA F (2012) DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics*, 7, 635-651.

- THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.
- TILSTON-LUNEL NL, SHI X, ELLIOTT RM, ACRANI GO (2017) The Potential for Reassortment between Oropouche and Schmallenberg Orthobunyaviruses. *Viruses*, 9, E220.
- TIZARD I R (2009) Veterinary Immunology, 8th Ed, Elsevier, chapter 17.
- TOLANI B, MATTA H, GOPALAKRISHNAN R, PUNJ V, CHAUDHARY P M (2014) NEMO is essential for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vFLIP K13-induced gene expression and protection against death receptor-induced cell death, and its N-terminal 251 residues are sufficient for this process. *J Virol*, 88, 6345-6354.
- TONBAK S, AZKUR AK, PESTIL Z, BIYIKLI E, ABAYLI H, BAYDAR E, VAN DER POEL WHM, BULUT H (2016) Circulation of Schmallenberg virus in Turkey, 2013. *Turk J Vet Anim Sci*, 40, 175-180.
- TSUJIMOTO Y (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria. *Genes cells*, 3, 697-707.
- UNDERBRINK MP, HOWIE HL, BEDARD KM, KOOP JI, GALLOWAY DA (2008) E6 Proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*, 82, 10408–10417.
- UNDERBRINK MP, DUPUIS C, WANG J, TYRING SK (2016) E6 proteins from low-risk human papillomavirus types 6 and 11 are able to protect keratinocytes from apoptosis via Bak degradation. *J Gen Virol*, 97, 715-24.
- VAN DEN BROM R, LUTTIKHOLT SJ, LIEVAART-PETERSON K, PEPERKAMP NH, MARS MH, VAN DER POEL WH, VELLEMA P (2012) Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneeskd*, 137, 106-11.
- VAN DER HEIJDEN HM, BOUWSTRA RJ, MARS MH, VAN DER POEL WH, WELLENBERG GJ, VAN MAANEN C (2013) Development and validation of an indirect Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Schmallenberg virus in blood samples from ruminants. *Res Vet Sci*, 95, 731-5.
- VAN DER POEL WH, PARLEVLIET JM, VERSTRATEN ER, KOOI EA, HAKZE-VAN DER HONING R, STOCKHOFEN (2014a) Schmallenberg virus detection in bovine semen after experimental infection of bulls. *Epidemiol Infect*, 142, 1495-500.
- VAN DER POEL WH, CAY B, ZIENTARA S, STEINBACH F, VALARCHER JF, BØTNER A, MARS MH, HAKZE-VAN DER HONING R, SCHIRRMIEIER H, BEER M (2014b) Limited interlaboratory comparison of Schmallenberg virus antibody detection in serum samples. *Vet Rec*, 174, 380.

- VARELA M, SCHNETTLER E, CAPORALE M, MURGIA C, BARRY G, MCFARLANE M, MCGREGOR E, PIRAS IM, SHAW A, LAMM C, JANOWICZ A, BEER M, GLASS M, HERDER V, HAHN K, BAUMGÄRTNER W, KOHL A, PALMARINI M (2013) Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog*, 9, e1003133.
- VARELA M, PINTO RM, CAPORALE M, PIRAS IM, TAGGART A, SEEHUSEN F, HAHN K, JANOWICZ A, DE SOUZA WM, BAUMGÄRTNER W, SHI X, PALMARINI M (2016) Mutations in the Schmallenberg virus Gc glycoprotein facilitate cellular protein synthesis shutoff and restore pathogenicity of NSs deletion mutants in mice. *J Virol*, 90, 5440-5450.
- VARELA M, PIRAS IM, MULLAN C, SHI X, TILSTON-LUNEL NL, PINTO RM, TAGGART A, WELCH SR, NEIL SJD, KREHER F, ELLIOTT RM, PALMARINI M (2017) Sensitivity to BST-2 restriction correlates with Orthobunyavirus host range. *Virology*, 509, 121-130.
- VELDHUIS AM, SANTMAN-BERENDS IM, GETHMANN JM, MARS MH, VAN WUYCKHUISE L, VELLEMA P, HOLSTEG M, HÖRETH-BÖNTGEN D, CONRATHS FJ, VAN SCHAİK G (2014) Schmallenberg virus epidemic: impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Prev Vet Med*, 116, 412-22.
- VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C (1995) A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- WANG J, WANG Y, LIU J, DING L, ZHANG Q, LI X, CAO H, TANG J, ZHENG SJ (2012) A critical role of N-myc and STAT interactor (Nmi) in foot-and-mouth disease virus (FMDV) 2C-induced apoptosis. *Virus Res*, 170, 59-65.
- WARD TH, CUMMINGS J, DEAN E, GREYSTOKE A, HOU JM, BACKEN A, RANSON M, DIVE C (2008) Biomarkers of apoptosis. *Br J Cancer*, 99, 841-846.
- WARET-SZKUTA A, ALARCON P, HASLER B, RUSHTON J, CORBIÈRE F, RABOISSON D (2017) Economic assessment of an emerging disease: the case of Schmallenberg virus in France. *Rev Sci Tech*, 36, 265-277.
- WASILENKO ST, BANADYGA L, BOND D, BARRY M (2005) The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol*, 79, 14031-14043.
- WENSMAN JJ, BLOMQUIST G, HJORT M, HOLST BS (2013) Presence of antibodies to Schmallenberg virus in a dog in Sweden. *J Clin Microbiol*, 51, 2802-3.
- WERNIKE K, ESCHBAUMER M, BREITHAUPT A, HOFFMANN B, BEER M (2012a) Schmallenberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus? *Vet Res*, 43, 84.

- WERNIKE K, BREITHAUPT A, KELLER M, HOFFMANN B, BEER M, ESCHBAUMER M (2012b) Schmallenberg virus infection of adult type I interferon receptor knock-out mice. *PLoS One*, 7, e40380.
- WERNIKE K, ESCHBAUMER M, SCHIRRMEIER H, BLOHM U, BREITHAUPT A, HOFFMANN B, BEER M (2013a) Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Vet Microbiol*, 165, 155-9.
- WERNIKE K, HOFFMANN B, BRÉARD E, BØTNER A, PONSART C, ZIENTARA S, LOHSE L, POZZI N, VIAROUGE C, SARRADIN P, LEROUX-BARC C, RIOU M, LALOY E, BREITHAUPT A, BEER M (2013b) Schmallenberg virus experimental infection of sheep. *Vet Microbiol*, 166, 461-6.
- WERNIKE K, NIKOLIN VM, HECHINGER S, HOFFMANN B, BEER M (2013c) Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine*, 31, 3558-63.
- WERNIKE K, HOLSTEG M, SCHIRRMEIER H, HOFFMANN B, BEER M (2014) Natural infection of pregnant cows with Schmallenberg virus--a follow-up study. *PLoS One*, 9, e98223.
- WERNIKE K, BROCCHI E, CORDIOLI P, SÉNÉCHAL Y, SCHELP C, WEGELT A, AEBISCHER A, ROMAN-SOSA G, REIMANN I, BEER M (2015) A novel panel of monoclonal antibodies against Schmallenberg virus nucleoprotein and glycoprotein Gc allows specific orthobunyavirus detection and reveals antigenic differences. *Vet Res*, 46, 27.
- WERNIKE K, BEER M (2016) Stability of Schmallenberg virus during long-term storage. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 129, 144-6.
- WERNIKE K, BROCCHI E, BEER M (2016) Effective interference between Simbu serogroup orthobunyaviruses in mammalian cells. *Vet Microbiol*, 196, 23-26.
- WERNIKE K, AEBISCHER A, ROMAN-SOSA G, BEER M (2017) The N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc is highly immunogenic and can provide protection from infection. *Sci Rep*, 7, 42500.
- WERNIKE K, HOLSTEG M, SZILLAT KP, BEER M (2018a) Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallenberg virus in naturally infected cattle. *BMC Vet Res*, 14, 368.
- WERNIKE K, MUNDT A, LINK EK, AEBISCHER A, SCHLOTTHAUER F, SUTTER G, FUX R, BEER M (2018b) N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc delivered by recombinant equine herpesvirus type 1 and modified vaccinia virus Ankara: Immunogenicity and protective efficacy in cattle. *Vaccine*, 36, 5116-5123.
- WERNIKE K, BEER M (2019) Misinterpretation of Schmallenberg virus sequence variations: the sample material makes the difference. *Virus Genes*, 55, 123-126.

- WHITE E, SABBATINI P, DEBBAS M, WOLD WS, KUSHER DI, GOODING LR (1992) The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*, 12, 2570-80.
- WICKREMASINGHE RG, HOFFBRAND AV (1999) Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, 93, 3587-3600.
- WISLØFF H, NORDVIK BS, SVILAND S, TØNNESEN R (2014) The first documented clinical case of Schmallenberg virus in Norway: fetal malformations in a calf. *Vet Rec*, 174, 120.
- WLODKOWIC D, SKOMMER J, DARZYNKIEWICZ Z (2009) Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol*, 559, 19-32.
- WLODKOWIC D, SKOMMER J, DARZYNKIEWICZ (2012) Cytometry of apoptosis historical perspective and new advances. *Exp Oncol*, 34, 255-262.
- WON S, IKEGAMI T, PETERS CJ, MAKINO S (2007) NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J Virol*, 81, 13335-45.
- WU M, DING H-F, FISHER D E (2001) Apoptosis: molecular mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, Macmillan Press.
- WÜTHRICH M, LECHNER I, AEBI M, VÖGTLIN A, POSTHAUS H, SCHÜPBACH-REGULA G, MEYLAN M (2016) A case-control study to estimate the effects of acute clinical infection with the Schmallenberg virus on milk yield, fertility and veterinary costs in Swiss dairy herds. *Prev Vet Med*, 126, 54-65.
- XU FL, LEE YL, TSAI WY, LIN SJ, YANG ZQ, YANG CC, LIU HY, CHENG L, XIAO H, WEN L (2005) Effect of cordycepin on Hantaan virus 76-118 infection of primary human embryonic pulmonary fibroblasts--characterization of apoptotic effects. *Acta Virol*, 49, 183-93.
- XU X, ZHANG K, HUANG Y, DING L, CHEN G, ZHANG H, TONG D (2012) Bovine herpesvirus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virol J*, 9, 202-212.
- YANASE T, KATO T, AIZAWA M, SHUTO Y, SHIRAFUJI H, YAMAKAWA M, TSUDA T (2012) Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch Virol*, 157, 1611-6.
- YEW PR, LIU X, BERK AJ (1994) Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p 53. *Genes Dev*, 8, 190-202.
- YILMAZ H, HOFFMANN B, TURAN N, CIZMECIGIL UY, RICHT JA, VAN DER POEL WH (2014) Detection and partial sequencing of Schmallenberg virus in cattle and sheep in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14, 223-5.

- YOULE RJ, STRASSER A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47-59.
- YUAN S, ZHANG N, XU L, ZHOU L, GE X, GUO X, YANG H (2016) Induction of apoptosis by the nonstructural protein 4 and 10 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One*, 11, e0156518.
- ZEKRI AR, BAHNASSY AA, HAFEZ MM, HASSAN ZK, KAMEL M, LOUTFY SA, SHERIF GM, EL-ZAYADI AR, DAOUD SS (2011) Characterization of chronic HCV infection-induced apoptosis. *Comp Hepatol*, 10, 4.
- ZEYNALOVA S, VATANI M, ASAROVA A, LANGE CE (2019) Schmallerberg virus in Azerbaijan 2012-2018. *Arch Virol*, 164, 1877-1881.
- ZHAI D, YU E, JIN C, WELSH K, SHIAU C-W, CHEN L, SALVESEV GS, LIDDINGTON R, REED JC (2010) Vaccinia virus protein F1L is a caspase-9 inhibitor. *J Biol Chem*, 285, 5569 – 5580.
- ZHAI SL, LV DH, WEN XH, ZHU XL, YANG YQ, CHEN QL, WEI WK (2018) Preliminary serological evidence for Schmallerberg virus infection in China. *Trop Anim Health Prod*, 50, 449-453.
- ZHANG G, ALDRIDGE S, CLARKE M C, MCCAULEY J W (1996) Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol*, 77, 1677-1681.
- ZHANG L, LIU S, ZHANG L, YOU H, HUANG R, SUN L, HE P, CHEN S, ZHANG H, XIE P (2014) Real-time qPCR identifies suitable reference genes for Borna disease virus-infected rat cortical neurons. *Int J Mol Sci*, 15, 21825-39.
- ZHANG M, SUN Y, CHEN W, BU Z (2018) The 135 gene of goatpox virus encodes an inhibitor of NF- κ B and apoptosis and may serve as an improved insertion site to generate vectored live vaccine. *J Virol*, 92, pii: e00190-18.
- ZHANG Y, WU S, WANG J, WERNIKE K, LV J, FENG C, ZHANG J, WANG C, DENG J, YUAN X, LIN X (2013) Expression and purification of the nucleocapsid protein of Schmallerberg virus, and preparation and characterization of a monoclonal antibody against this protein. *Protein Expr Purif*, 92, 1-8.
- ZHANG Y, WU S, SONG S, LV J, FENG C, LIN X (2015) Preparation and characterization of a stable BHK-21 cell line constitutively expressing the Schmallerberg virus nucleocapsid protein. *Mol Cell Probes*, 29, 244-53.
- ZHANG Y, WU S, SONG S, LV J, FENG C, LIN X (2017) Generation and characterization of a potentially applicable Vero cell line constitutively expressing the Schmallerberg virus nucleocapsid protein. *Cytotechnology*, 69, 145-156.

ZHANG Z, HAN Y, SUN G, LIU X, JIA X, YU X (2019) MicroRNA-325-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by down-regulation of aquaporin 5. *Cell Mol Biol Lett*, 24, 13.

ZHONG Y, LIAO Y, FANG S, TAM JP, LIU DX (2012) Up-regulation of Mcl-1 and Bak by coronavirus infection of human, avian and animal cells modulates apoptosis and viral replication. *PLoS One*, 7, e30191.

ZHOU X, JIANG W, LIU Z, LIU S, LIANG X (2017) Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses*, 9, pii: E316.



ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Emel

Soyadı: AKSOY

Doğum Yeri ve Tarihi: Samsun/1987

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Evli

Adres: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı

Yahşihan- Kırıkkale

Telefon: 03183573301 / 6486

E- posta: emelbiyikli@kku.edu.tr

II. Eğitimi

2005-2010: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Samsun

2001-2005: Halıcı Ahmet Urkay Anadolu Lisesi, Marmaris-Muğla

Yabancı Dili: İngilizce

III. Mesleki deneyimi

2014- : Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Araştırma
Görevlisi

IV. Yayınları:

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. AZKUR AK, **AKSOY E** (2018) Buzağı Hastalıklarında Koruyucu Önlemler.
Lalahan Hay Araşt Enst Derg, 58, 56-63.

2. **BIYIKLI E**, AZKUR AK, TONBAK Ş, MACUN HC (2017) Buzağlarda Schmallerberg virüs özgül maternal antikor varlığının izlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 31, 189 – 192.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **AKSOY E**, AZKUR AK (2019) Schmallerberg virus affects T-bet, Gata3, RoRryt, Foxp3 and Eomes in mice brain. *Acta Virol*, 63, 286-291.
2. **AKSOY E**, AZKUR AK (2019) Schmallerberg virus induces apoptosis in Vero cell line via extrinsic and intrinsic pathways in a time and dose dependent manner. *J Vet Med Sci*, 81, 204-212.
3. ASLAN ME, AZKUR AK, **BIYIKLI E**, GAZYAĞCI S, SÖZDUTMAZ İ (2016) Comparison of hematological parameters of Brucella-seronegative naturally infected cattle with BVDV, BHV-1, and BHV-4. *Turk J Vet Anim Sci*, 40, 112-119.
4. TONBAK Ş, AZKUR AK, PESTİL Z, **BIYIKLI E**, ABAYLI H, BAYDAR E, VAN DER POEL WHM, BULUT H (2016) Circulation of Schmallerberg virus in Turkey, 2013. *Turk J Vet Anim Sci*, 40, 175-180.

Ulusal Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. TONBAK Ş, AZKUR AK, **BIYIKLI E**, BULUT H. (2014) Schmallerberg virüsünün virüs nötralizasyon testi ile belirlenmesi. XI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 21-24 Ekim 2014, Antalya.
2. **BIYIKLI E**, AZKUR AK, GAZYAĞCI S, ASLAN ME (2014) Retrospektif Bakış: Kırıkkale'deki küçük ruminantların bazı viral hastalıklarının araştırılması. XI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 21-24 Ekim 2014, Antalya.
3. TONBAK Ş, BULUT H, AZKUR AK, ABAYLI H, **BIYIKLI E**, VAN DER POEL WHM (2014) Schmallerberg virüsü'nün real time PZR ile belirlenmesi ve S segmentinin genetik karakterizasyonu. XI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 21-24 Ekim 2014, Antalya.
4. ASLAN ME, AZKUR AK, **BIYIKLI E**, GAZYAĞCI S, SÖZDUTMAZ İ (2014) BVDV, BHV-1, BHV-4 ile enfekte olan ve olmayan ineklerin kan

parametrelerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. XI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 21-24 Ekim 2014, Antalya.

Uluslararası Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **AKSOY E**, AZKUR AK (2018) Schmallenberg virus induces apoptosis in Vero cell line via extrinsic and intrinsic pathways in a time and dose dependent manner. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 16-19 October 2018, Antalya, Turkey.
2. **AKSOY E**, AZKUR AK (2018) Schmallenberg virus affects T-BET, GATA3, ROR γ T, FOXP3 and EOMES in mice brain. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 16-19 October 2018, Antalya, Turkey.
3. AZKUR AK, **AKSOY E**, YILDIRIM M, YILDIZ K (2018) Development of indirect ELISA for diagnosis of Schmallenberg virus infection. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 16-19 October 2018, Antalya, Turkey.
4. AZKUR AK, **AKSOY E**, YILDIRIM M, YILDIZ K (2018) Development of quantitative real-time RT-PCR for diagnosis of Schmallenberg virus infection. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 16-19 October 2018, Antalya, Turkey.
5. TONBAK Ş, AZKUR AK, PESTİL Z, **BIYIKLI E**, ABAYLI H, BAYDAR E, VAN DER POEL WHM, BULUT H (2016) Circulation of Schmallenberg virus in Turkey, 2013. Xth International Congress of Veterinary Virology of ESVV, August 31st - September 3rd 2015, Paris.

V. Projeler

Ulusal Projeler

1. YAĞCI BB, AZKUR AK, KARA E, **AKSOY E** (2019) Kırıkkale ve çevre illerinde neonatal ishallerde buzağılarda sığır rotavirüsü ve sığır koronavirüsünün genetik karakterizasyonu. KÜBAP 2019/051.
2. AZKUR AK, ÖZGÜNER MH, KÖKSAL Y, **BIYIKLI E** (2016) Kanser tanısı almış pediatrik hastaların periferik kan ve kemik iliği örneklerinden bazı viral

etkenlerin araştırılması. KÜBAP 2016/116.

3. AZKUR AK, **BIYIKLI E** (2015) Schmallenberg virüsünün Vero hücre hattındaki apoptotik etkisinin araştırılması. KÜBAP 2015/52.
4. AZKUR AK, **BIYIKLI E**, YILDIRIM M, YILDIZ K (2015) Schmallenberg virüs enfeksiyonu tanısında kullanılmak üzere ELISA ve real-time RT-PCR kitlerinin geliştirilmesi. TAGEM 15/AR-GE 48.

VI. Diğer Bilgiler

1. Fikri Mülkiyet Hakları ve Patent Eğitimi (2018) Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale.
2. Buzağı Kayıpları Sempozyumu (2017) Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale.
3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2012) Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Deney Hayvanları Kullanım Kursu, Bursa.