

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKUT KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALARINDA mikroRNA  
İFADELERİNİN ANALİZİ

Zekiye Cemre DEMİR

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

OCAK  
2016

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Zekiye Cemre DEMİR



Prof. Dr. Aykut ÖZKUL danışmanlığında, Zekiye Cemre DEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../.... Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman :Prof. Dr. Aykut ÖZKUL.

İmza:

Üye :Doç. Dr. Koray ERGÜNAY

İmza:

Üye :Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **Akut Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında mikroRNA İfadelerinin Analizi**

Zekiye Cemre Demir

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) ile konak hücre arasındaki ilişkinin tanımlanmasına olanak sağlayacak ipuçlarını elde edebilmek amacıyla miRNA ifade profillerinin irdelenmesi önem arz etmektedir. Bu konuda daha önce yapılmış herhangi bir çalışma bulunmaması ise miRNA ifade profillerinin incelenmesi sonucu elde edilen verileri değerli kılmaktadır. Bu noktadan hareketle, KKKA hastalığı tanısı konmuş 8 birey ile kontrol grubunu oluşturmak üzere sağlıklı 5 kişiden alınan kan örneklerinde tanımlanmış tüm insan miRNA'nın ifade analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla söz konusu bireylerin beyaz küre hücrelerinden (WBC) elde edilen RNA ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu eş-zamanlı PZR Dizin yöntemi kullanılarak bu hastalıkta anlamlı olarak ifade değişikliği gösteren miRNA'lar tespit edildi. Elde edilen veriler  $\Delta\Delta C_t$  istatistiksel yöntemi kullanılarak analiz edildi. Değerlendirmeye alınan miRNA'lar analiz sonucu elde edilen kat değişimlerine ve p değerlerine göre seçildi. Seçilen miRNA'lar ile yolak zenginleştirme analizi yapıldı. Elde edilen veriler ışığında ifade oranlarında azalma tespit edilen miR-146a, miR-410, miR-493 ve miR-655 ile ifade oranlarında artış tespit edilen miR-451, miR-486-5p miR-608 ve miR-541'in enfeksiyonun başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Gerçekleştirilen yolak zenginleştirme analizleri ise MAPK sinyali, sitokin-sitokin etkileşim, Wnt sinyal ve endositozis gibi yolakların KKKA hastalığın patogenizinde önemli rol alabileceğini ortaya koymaktadır.

2016, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü  
PZR, Eş Zamanlı PZR, mikroRNA.



## **ABSTRACT**

M.Sc Thesis

Analysis of microRNA Expression Profiles in Acute Crimean Congo Hemorrhagic Fever  
Patients

Zekiye Cemre DEMİR

Ankara University Health Sciences Institute

Supervisor: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enlightening the microRNA expression profiles is crucial to be able to identify the key points that will likely to enlighten relationship between Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHV) and its host cell. There is not any published data about that topic which makes the results of this study important. To do so, in this study, 13 RNA samples from 8 CCHF patients and five control groups were compiled and processed using the real-time PCR Array method to analyze the most abundant expressed and best identified 1066 miRNAs in human. Using real-time PCR Array method, miRNAs which show significant fold change were selected.  $\Delta\Delta C_t$  statistics was employed for analyzing the data. MicroRNAs were selected based on their fold change and p values, and pathway enrichment analysis was performed accordingly. Our hypotheses are that miR-146a, miR-410, miR-493 and miR-655 have decreased expression levels and miR-451, miR-486-5p miR-608 and miR-541 have increased expression levels and they may have an important roles in the devolepment of CCHFV infection. Pathway enrichment results suggest that MAPK signaling, cytokine-cytokine interaction receptor, wnt signaling, endocytosis pathways may have important roles in the disease pathogenesis.

2016, 60 pages

Keywords: Crimean Congo Hemorrhagic Fever, Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus PCR, Real Time RT-PCR, microRNA

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek Lisans tez çalışmam boyunca bilgisini, tecrübesini ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her önümü göremediğimde bana yolumu çizmemde yardımcı olan, her türlü hatamda bile arkamda durup sonsuz hoşgörüsünü benden eksik etmeyen, bilim yapmanın önce etiğini sonra tekniğini öğreten ve bana güvenip imkanlarından yararlanmamı sağlayan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a ,

Tez çalışmamda kullanılan hasta ve sağlıklı kan örneklerini bize temin ederek işbirliği yaptığımız Ankara Numune Araştırma ve Eğitim Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği çalışanları Sayın Prof. Dr. Hürrem BODUR ve Sayın Uz. Dr. Aliye BAŞTUĞ'a,

Tez çalışmam süresince laboratuvarlarını kullanmama izin veren ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU ve ekibine,

Hayatım boyunca beni hep destekleyen, ne olursa olsun hep arkamda duran, istediklerimi elde edebilmek için hep en büyük destekçilerim olan canım annem ve babam Lütfiye ve Necdet DEMİR'e, hayattaki en büyük destekçilerim olan birtanecik kardeşlerim Merva DEMİR ve Mina DEMİR'e

İlk tanıştığımız günden beri benden dostluğunu, sevgisini, yardımlarını hiç eksik etmeden hep yanımda duran canım dostum Büşra YAĞABASAN'a, yüksek lisansım boyunca arkadaşlığını esirgemediğim hep yanımda olan Hatice YILDIZHAN'a, her ihtiyacım olduğunda yanımda duran, akademik/manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve tezde kullandığım makalelerin neredeyse tamamını temin eden sevgili arkadaşım Serkan DEMİRKILIÇ'a

Bu süreçte her türlü desteğiyle hep yanımda olan ve beni destekleyen hocam Sayın Prof. Dr. Engin YILMAZ'a

Tez çalışmamım laboratuvar aşaması için imkanlarından faydalandığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na,

Sonsuz teşekkür ederim.



Zekiye Cemre DEMİR

ANKARA, Ocak 2016



## İÇİNDEKİLER

<b><u>1. GİRİŞ.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2. KURAMSAL TEMELLER .....</u></b>	<b><u>2</u></b>
<b>2.1 MİKRORNA .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 MİKRORNA FONKSİYON VE REGÜLASYONU	2
2.1.2 MİKRORNA'LARIN KEŞFİ	2
2.1.3 MİKRORNA BİYOGENEZİ	3
2.1.4 MİKRORNA HEDEF BÖLGELERİ	4
2.1.5 TRANSLASYONEL BASKILAMA	5
2.1.6 MİKRORNA'LARIN YIKIMI	6
2.1.7 MİKRORNA İFADESİNİN REGÜLASYONU	6
<b>2.2 VİRAL ENFEKSİYON .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 VİRÜSLERİN HÜCREYE GİRİŞİ	7
2.2.2 DNA VİRÜSLERİ	7
2.2.3 RNA VİRÜSLERİ	8
2.2.4 VİRAL ENFEKSİYONLARDAN ETKİLENEN MİKRORNA'LAR	8
2.2.5 HÜCRESEL MİKRORNA'LARIN VİRÜSLER TARAFINDAN BASKILANMASI	9
<b>2.3 KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ.....</b>	<b>10</b>
2.3.1 KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜNÜN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ	11
2.3.2 KKKAV'NÜN YAŞAM DÖNGÜSÜ VE HÜCREYE GİRİŞİ	13
2.3.3 KKKAV'NÜN TRANSKRİPSİYON VE REPLİKASYONU	13
<b>2.4 EŞ ZAMANLI PZR DİZİNİ.....</b>	<b>14</b>
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAÇ .....</u></b>	<b><u>16</u></b>
<b>3.1 GEREKÇE VE AMAÇ .....</b>	<b>16</b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b>4.1 MATERYAL .....</b>	<b>17</b>
4.1.1 AKUT KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTA KANLARI	17
4.1.2 KİTLER	17
<b>4.2 YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>

4.2.1 AKUT KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALARI VE KONTROL GRUBU KANLARINDAN PERİFERAL LENFOSİTLERİN ELDE EDİLMESİ:	18
4.2.2 PERİFERAL LENFOSİT HÜCRELERİNDEN TOTAL RNA İZOLASYONU VE JEL ELEKTROFOREZİ İLE KALİTE KONTROLÜ:	18
4.2.3 EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSIYONU DİZİNİ	19
4.2.3.1 cDNA Sentezi .....	19
4.2.3.2 Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	20
4.2.4 VERİ ANALİZİ	21
4.2.4.1 Eş-Zamanlı PZR Dizin Analizi.....	21
4.2.4.2 MikroRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Yolak Analizi .....	22
<b><u>5. BULGULAR.....</u></b>	<b><u>24</u></b>
<b>5.1 KKKK HASTALARINDAN VE KONTROL GRUBU KANLARINDAN PERİFERAL LENFOSİTLERİN ELDE EDİLMESİ .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 RNA KALİTESİ.....</b>	<b>24</b>
<b>5.3 EŞ ZAMANLI PZR DİZİN SONUÇLARI.....</b>	<b>26</b>
<b>5.4 KKKAV VİRAL YÜK TESPİTİ SONUÇLARI .....</b>	<b>26</b>
<b>5.5 KKKAV İLE ANLAMLI KAT DEĞİŞİMİ GÖSTEREN MİKRORNA’LARIN BELİRLENMESİ .....</b>	<b>27</b>
<b>5.5.1 HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ VE YOLAK ANALİZLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ</b>	<b>31</b>
<b><u>6. TARTIŞMA.....</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b>6.1 MAPK SİNYAL YOLAĞI.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2 TGF-B SİNYAL YOLAĞI .....</b>	<b>38</b>
<b>6.3 WNT SİNYAL YOLAĞI .....</b>	<b>38</b>
<b>6.4 ENDOSİTOZ SİNYAL YOLAĞI .....</b>	<b>39</b>
<b><u>7. SONUC .....</u></b>	<b><u>41</u></b>
<b><u>KAYNAKLAR.....</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b><u>8. EKLER .....</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b><u>9. ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>	<b><u>51</u></b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1 MikroRNA biyogenezinin şematik gösterimi (11).....	4
Şekil 2.4.1 SybrGreen tekniğini kullanan eş-zamanlı PZR prensibinin gösterimi.....	14
Şekil 5.1.1 Araştırmada kullanılan kan örneklerinden lenfosit fraksiyonunun Biocoll ile ayrılması. ....	24
Şekil 5.2.1 Lenfositlerden izole edilen RNA'ların % 2 Agaroz jel'deki görüntüsü.....	25
.Şekil 5.3.1 Eş zamanlı PZR dizin çalışması sonucunun bir örneği. ....	26
Şekil 5.5.1 KKKA hastalarındaki mikroRNA'ların ifade analizini 3 boyutlu plaka düzeninde göstermektedir.....	28
Şekil 5.5.2 miRNA'lar ve rol aldıkları yolları gösteren dendrogram. ....	33
Şekil 5.5.3 TGF- $\beta$ Sinyal yolağı KEGG yolak analizi. ....	34
Şekil 6.3.1 Wnt Sinyal Yolak Analizi. ....	39

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 4.1 cDNA sentezi reaksiyon karışımı. ....	<b>20</b>
Çizelge 4.2 miRNA PZR Dizin reaksiyon karışımı. ....	<b>20</b>
Çizelge 4.3 Real Time PCR için reaksiyon karışımı bileşenleri. ....	<b>23</b>
Çizelge 4.4 Real Time RT-PCR işleminde kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüleri. ..	<b>23</b>
Çizelge 5.1 İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometre ölçüm değerleri. ....	<b>25</b>
Çizelge 5.2 Araştırma kapsamına alınan KKKK hastalığı tanısı konan 8 kişiye ait viral gRNA yükleri. ....	<b>27</b>
Çizelge 5.3 Anlamlı olarak ifadesinde azalma ve artış görülen mikroRNA'ların kat değişimini göstermektedir. ....	<b>29</b>
Çizelge 5.4 PZR dizini sonucunda kontrol örneklerine kıyasla anlamlı pozitif kat değişimi gösteren ilk 10 miRNA'nın örnek listesi. ....	<b>30</b>
Çizelge 5.5 PZR dizini sonucunda kontrol örneklerine kıyasla anlamlı negatif kat değişimi gösteren miRNA'ların örnek listesi. ....	<b>30</b>
Çizelge 5.6.İfadesinde artış gösteren miR-451, miR-486, miR-608, miR-363, miR31, miR-32, miR-575'in miRWalk veritabanından elde edilen örnek ortak hedef gen listesi .....	<b>31</b>
Çizelge 5.7 İfadesinde azalma görülen miRNA'ların hedef gen listelerinden yapılan yolak zenginleştirme analizi sonuçları .....	<b>32</b>
Çizelge 5.8 İfadesinde artış görülen miRNA'ların ortak hedef gen listelerinden yapılan yolak zenginleştirme analizi sonuçları .....	<b>32</b>

## SİMGELER DİZİNİ

$\mu$ l	Mikrolitre
ng	Nanogram
$\mu$ M	Mikromolar
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
RISC	RNA-induced silencing complex
Ago2	Protein argonaute-2
UTR	Untranslated region
eIF4	Eukaryotic initiation factor 4
PABP	Poly(A) binding Protein
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu

## 1. GİRİŞ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı günümüzde Türkiye'nin de içinde bulunduğu Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Ortadoğu'da görülen ölümcül viral bir enfeksiyondur. Hastalık *Bunyaviridae* ailesinin Nairovirüs cinsine mensup olan Kırım Kongo Kanamalı ateşi virüsü (KKKAV) tarafından meydana getirilmektedir. KKKAV, temel olarak, insanlara virüsle enfekte *Hyalomma* soyuna ait kenelerin ısırması ile bulaşmaktadır. KKKAV tek sarmallı, segmentli, 90–120 nm çapında ve konak hücre zarından köken alan kılıflı yapıya sahip olan bir RNA virüsüdür. RNA genomu segmentli ve negatif anlamlı olup, nükleotid uzunluğuna bağlı olarak küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olarak üçe ayrılmaktadır. L-RNA segmenti viral RNA polimerazı, M-RNA segmenti Gc ve Gn glikoproteinlerini, S-RNA segmenti ise Nükleoprotein yapısını (NP) kodlamaktadır. Gc ve Gn glikoproteinleri virüse duyarlı hücrelerin membranında bulunan reseptörlerin tanınmasından sorumludur. KKKA son 10 yılda ortaya koyduğu mevsimsel seyir özelliği ile her yıl yaklaşık % 5 oranında fatalite ile seyreden bir hastalık olarak Türkiye'de insan sağlığı açısından ciddi bir risk oluşturmaktadır. Diğer taraftan yaşanan tüm bu olumsuzluklara ek olarak, virüs enfeksiyonuna maruz kalmış ve hastalıktan mağdur bireylerde tedaviye yönelik olumlu bir gelişme henüz bulunmamaktadır. KKKA'nın bir diğer önemli özelliği ise bir çok evcil hayvan türünün virüs taşıyıcısı olması, bir başka deyişle kanlarında uzun süre (14 gün) ile ve yüksek değerlerde virüsü buldurmalarına rağmen insanlarda gözlenen hastalık tablosuna benzer bir durumu sergilemiyor olmasıdır. Bu durumun gerçek nedeni henüz anlaşılamamıştır.

MikroRNA'lar protein kodlamayan ve protein ifadesinde düzenleyici rolü bulunan RNA molekülleridirler. Yapılan çalışmalar mikroRNA'ların gen ifadelerinin düzenlenmesinde etkin rol aldığı ortaya konmuştur. Bununla birlikte yapılan literatür çalışmalarında, mikroRNA'ların bir çok hastalıkla ilişkili olduğu ve başka virüslerin de hücrel mikroRNA ifadelerinde farklılık yaratabileceği gözlemlenmiştir. KKKAV gibi bir RNA virüsü olan ve *Bunyaviridae* ailesinde yer alan hantavirüslerle enfekte edilen hücrelerde bazı mikroRNA'ların ifadesinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiş ve bu değişikliklerin virüsün neden olduğu zarara ilave bir etki oluşturdukları belirlenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 MikroRNA

Yeni çeşit kodlamayan RNA moleküllerinin keşfi, genomun nasıl işlediği konusunda oldukça önemli bilgiler vermiştir. Bu keşiflerin en önemlisi, mikroRNA olarak adlandırılan ve yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda bulunan; küçük ve kodlamayan RNA moleküllerinin belirlenmesi ile gerçekleşmiştir (1). mikroRNA'lar çekirdekte, saç tokası öncül transkriptleri şeklinde kodlanırlar. Burada kodlandıktan sonra çeşitli proteinler aracılığı ile sitoplazmaya taşınırlar. Daha sonra öncül miRNA transkriptleri, Dicer adı verilen bir enzim ile kesilerek olgun, tek zincirli fonksiyonel moleküller haline dönüşmektedir. Hayvanlarda, miRNA'lar genellikle çoğunlukla rastlantısal eşleşme ile hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucunda hedef mRNA yıkımı ve translasyon baskılanması gerçekleşmektedir (2).

#### 2.1.1 MikroRNA Fonksiyon ve Regülasyonu

MikroRNA'lar gen ifadesinin merkezinde rol oynayan önemli faktörler olarak gelişim, farklılaşım, büyüme ve apoptoz gibi bir çok hücrel olaylarda görev almaktadırlar (3).

#### 2.1.2 MikroRNA'ların Keşfi

MikroRNA'lar üzerine yapılan ilk çalışmalar *Caenorhabditis elegans* ile gerçekleştirilmiştir. İlk çalışma bu canlı üzerindeki *lin-4* geni ile yapılmıştır. *Lin-4* geninin LIN-14 proteininin baskılanmasında görev aldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda *lin-4* geninin herhangi bir proteini kodlamadığı görülmüştür. Bunun yerine yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki bir RNA molekülü ürettiği gözlenmiştir. Bu RNA molekülünün *lin-14* 'ün mRNA'sının 3'UTR bölgesine komplementer olduğu bulunmuştur (4)

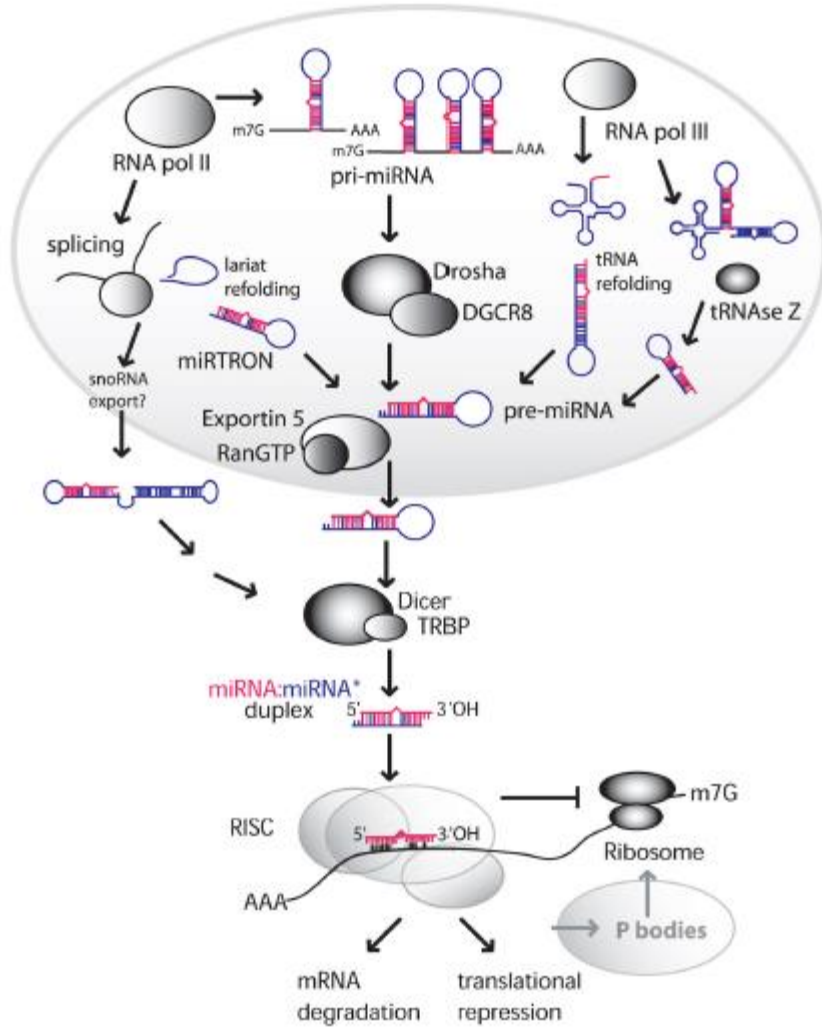
*Lin-4* ile beraber *C.elegans*'ta *let-7* adı verilen genin de kodlama yapmayan ve çeşitli mRNA'ların 3'UTR bölgelerine komplementer bölgeler içeren küçük RNA moleküllerini oluşturduğu tespit edilmiştir. *Let-7* ile ilgili yapılan keşfin diğer önemli bir yanı ise, *let-7*'nin çoğu türde korunmuş bölgelerinin bulunmasıdır. Bu bilgi ile keşfi yapılan bu küçük RNA moleküllerinin yani mikroRNA'ların gen ifadesinde önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır (5).

### 2.1.3 MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA'ların viral enfeksiyonlardaki rolünü anlayabilmek için transkripsiyonunun nasıl gerçekleştiği ve nasıl işlendiği bilgileri önem arz etmektedir. Bugüne kadar tanımlanmış hücresel mikroRNA'ların hepsi RNA Polimeraz II enzimi tarafından birincil miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan uzun RNA öncülleri olarak kopyalanmaktadır. Tek bir birincil miRNA tek başına birden fazla miRNA'nın dizisini içerebiliyorken sadece bir miRNA'nın dizisini de içerebilmektedir ve aynı pri-miRNA üzerinde olan miRNA'lar genelde benzer fonksiyonlara sahip olmaktadır (6,7).

MiRNA dizileri RNA'nın çift zincirli saç tokası bölgesinde konumlandırılmış olabilirler. Bu bölgeler RNAz III enzimi olan Drosha tarafından tanınırlar. Bu tanıma süreci hücrenin çekirdeğinde gerçekleşir (Şekil 1). Memelilerde, Drosha enzimi DGCR8 olarak bilinen bir protein ile beraber çalışarak pri-miRNA'yı keserek 70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA oluştururlar. Bu işlemin ardından pre-miRNA Exportin 5 yardımı ile çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya ulaştıktan sonra Dicer adı verilen RNAz III enzimi pre-miRNA'yı keserek, 21-23 nükleotid uzunluğunda dubleks oluşturur (8). Bu dubleks oluşuktan sonra Dicer miRNA'nın RISC olarak adlandırılan komplekse toplanmasına aracı olur ve ipliklerden biri kesilerek yıkımlanır. RISC kompleksinin içinde bulunan elemanlar tam olarak bilinmese de genel olarak Argonaute proteinin anahtar element olduğu bilinmektedir. MiRNA RISC kompleksi ile birleşip miRISC yapısını oluşturmaktadır ve dubleksten hangi zincirin seçileceği dubleksin uçlarının kararlılığına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Diğer zincir ise muhtemelen Ago2 proteinin helikaz aktivitesi ile dubleksten çıkarılarak yıkımı gerçekleştirilir (9,10).





Şekil 2.1.1 MikroRNA biyogenezinin şematik gösterimi (11).

#### 2.1.4 mikroRNA Hedef Bölgeleri

MikroRNA'lar bitkilerde siRNA gibi çalışarak, mükemmel bir eşleşme ile, hedef RNA'ları parçalarlar. Bunun yerine hayvan modellerinde miRNA'lar hedef mRNA'lara kısmen bağlanarak işlevlerini tamamlarlar. Hedef diziler de kendilerini tam eşleşmeden kaçmaya uygun şekilde evrimleşmişlerdir. miRNA'ların hedeflerini mükemmel olmayan eşleşmeler ile bulmaları, hedeflerin hesaplanmalarında zorluk çıkarmaktadır. Bunu kolaylaştırmak için çeşitli kurallar bulunmuştur. Bunlardan biri de, miRNA'daki "çekirdek bölge" adı verilen 2-7 nükleotid arasındaki Watson-Crick baz eşleşmesidir. Bu çekirdek bölge genelde miRNA hedefi için güzel bir gösterge olmasına karşın bazı yapıların bu kurala uymadığı gözlenmektedir. Bu tip yapılarda çekirdek bölge yerine, miRNA'nın 3' ucuna komplementer olan bölgelerin varlığı ya da etrafındaki ikincil yapılar bu hedefleri

belirlemede de kullanılabilir. Bu tahmin edilen mRNA hedeflerinin deneysel olarak doğrulanması oldukça uzun zaman alabilen bir adımdır. miRNA'ların hedef proteinler üzerindeki etkisi deneysel olarak kontrol edilmelidir (12,13).

Bugüne kadar belirlenen miRNA hedef bölgelerinin büyük bir kısmının mRNA'ların 3'UTR bölgelerinde bulunduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu miRNA'ların hangi koşullarda ve ne ölçüde mRNA'nın 5'UTR bölgesini hedeflediği henüz kesinlik kazanmamış bir konudur. Son zamanlarda yapılan biyoinformatik analizler, Drosophila'nın 3'UTR bölgesinde korunmuş bölgeler olduğu gibi çok az miktarda 5'UTR bölgesinde hedef bölgeler olduğunu göstermiştir (14).

### **2.1.5 Translasyonel Baskılama**

Hayvan sistemlerinde, miRNA'ların 3'UTR hedef bölgelerine bağlanmaları, hedef mRNA tarafından kodlanan proteinin sentezinin baskılanması ile sonuçlanır. Protein sentezinin baskılanmasının hangi mekanizma ile gerçekleştirildiği ve bu baskılamanın protein seviyelerine etkisi hakkında hala tartışmalar devam etmektedir.

Translasyon 3 ana aşamada gerçekleşmektedir; başlama, uzama ve sonlanma. Ökaryotik mRNA'lar genelde 5' 7-metilganozin başlık ve 3' poly(A) kuyruk ile sentezlenmekte ve bu iki unsurda translasyonun başlaması için gerekli iki önemli yapı olmaktadır. eIF4F protein kompleksi başlığa bağlandıktan sonra 40S ribozomal altüniteyi bir araya getirmektedir. Bu sırada poly(A)'ya bağlanan protein PABP, eIF4F ile etkileşime girerek mRNA'nın sirküler hale gelmesini ve translasyonun başlamasını sağlamaktadır. Translasyon başladıktan sonra AUG kodonuna gelene kadar işlem devam eder ve bu kodona gelince 60S ribozom altünitesi katılır. Uzama ise, 80S ribozomun kodlama alanında polipeptidi kodlaması ile devam etmektedir. Ribozom stop kodonu ile karşılaşıncada ribozom mRNA'dan ayrılır ve translasyon biter (15).

Yapılan farklı çalışmalarda, miRNA'nın translasyonu başlama aşamasında baskıladığı ve ribozomun mRNA'dan ayrıldığı görülmüştür. Bunun dışında translasyon başlamadan da baskılayabilmektedir. Baskılamanın mekanizması ve tam olarak nasıl olduğu konusunda ise tartışmalar devam etmektedir (2,16).

### **2.1.6 MikroRNA'ların Yıkımı**

Yapılan ilk çalışmalarda, miRNA'nın translasyonu baskılamasının mRNA seviyelerinde herhangi bir etki yaratmadığı düşünülmüştür. Ancak daha sonra gerçekleştirilen araştırmalar mRNA kararlılığında bir takım değişiklikler olduğu ortaya koymuştur. Buna göre miRNA'ların hedef mRNA'lara bağlanması deadenilasyona neden olmaktadır. Bunun sonucunda da mRNA'da bulunan başlık (Cap) çıkar ve yıkım gerçekleşir. Bu da mRNA'nın sitoplazmik p cisimcikleri ile birleşmesi ile olmaktadır(2,16). Bu sitoplazmik cisimcikler, yıkılan ve translasyonel olarak baskılanmış mRNA'ların toplandığı yerlerdir. Yapılan mikroskopik çalışmalarda, p cisimciklerinin içinde miRISC, miRNA ve hedef mRNA'lara rastlanmıştır. Ancak miRNA baskılaması için bu p cisimciklerinin varlığı gerekli değildir. Bu da miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonel baskılama yaptığını da ortaya koymaktadır.

Hedef mRNA seviyesinde azalmalar, hücre genelinde yaygın olan bir durumdur. Bu da hedef mRNA'ların mikrodizin ile belirlenmesinde yardımcı olmaktadır (17).

### **2.1.7 MikroRNA İfadesinin Regülasyonu**

Çoğu miRNA oldukça spesifik ve sıkı bir şekilde kontrol edilen ifade yapısı çizmektedir. Bu da spesifik, belirli biyolojik süreçleri kontrol eder. Bazı miRNA'lar sürekli ifade edilirken diğer bazı miRNA yapıları da belirli zamanda, sadece belirli doku ve hücrelerde bulunarak ifade edilirler. Bu ifade profillerindeki değişikliklerin çeşitli hastalıklara neden olabileceği gösterilmiştir (18).

miRNA ifadesinin regülasyonu çoğunlukla pri-miRNA transkripsiyonu aşamasında gerçekleşmektedir. Spesifik pri-miRNA ifadelerini kontrol eden çeşitli transkripsiyon faktörleri belirlenmiştir (19).

Ayrıca Dicer ve Drosha'nın ve yardımcı kofaktörleri olan DGCR8 ve HIV-1 TAR RNA binding protein (TRBP) seviyeleri memelilerde regülasyonda önemli elementlerdir. Let-7 tarafından hedeflenen Dicer mRNA'sı miRNA biyogenezinde negatif bir geribildirim oluşturmaktadır. Bununla beraber LIN-28'in let-7 ailesinin elemanlarının ifade edilmesini engellediği görülmüştür. LIN-28 pri-let-7'nin sonundaki daire şeklindeki bölge ile

etkileşime girerek Dicer işlenmesini engellemektedir. Bu da pri-let-7'nin yıkımına neden olmaktadır (8,20).

Genel olarak, miRNA kararlılığının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Fakat durumun böyle olmadığı şartlarda ortaya çıkmıştır. MiR-122'ye Germ Line Development 2 (GLD) enzimi tarafından tek 3' adenin eklenmekte ve bu da miRNA kararlılığını artırmaktadır (21).

## **2.2 VİRAL ENFEKSİYON**

Virüsler, yaşam döngülerini devam ettirebilmek için konakçı hücre faaliyetlerine ihtiyaç duyan zorunlu hücre-içi parazitlerdir. Farklı virüsler, konakçı hücre mekanizmasını ele geçirmek için farklı mekanizmalar geliştirmişlerdir (22).

### **2.2.1 Virüslerin Hücreye Girişi**

Hücreye giriş ilk olarak virionun, hücre yüzeyine yapışmasını veya tutunmasını gerektirmektedir. Bu da viral proteinlerin ve hücre yüzeyindeki moleküller arasındaki özgül etkileşim ile gerçekleşmektedir. Virüs proteinlerinin çok geniş çeşitte hücre yüzeyi moleküllerini tanıma yetenekleri vardır. Bu da enfeksiyonun yönelimini etkilemekte ve belirlemektedir. Virüslerin hücre yüzeyini geçip, sitoplazmaya ulaşmaları için çeşitli mekanizmalar vardır. Bunlar arasında; virüs ve konakçı arasındaki zar füzyonu, endositoz gibi mekanizmalar yer almaktadır (23,24).

### **2.2.2 DNA Virüsleri**

DNA virüslerinin genomları bir nükleokapsid ile çevrilmiştir. Hücre sitoplazmasını bu halde geçmek zorundadırlar. Ancak yoğun olan sitoplazmayı geçmek çoğu zaman tek başlarına mümkün olmamaktadır. Bunun için konakçı hücrenin motor proteinlerini kullanabilmektedirler. Sitoplazmayı geçip çekirdeğe ulaştıklarında ise NPC (nükleer kanal kompleksi) ile etkileşime geçerek nükleokapsidden kurtulurlar ve genomlarını nükleoplazmaya bırakırlar (24,25). Viral genomu çekirdeğe girdiği zaman burada hücre mekanizmalarını kullanarak kendi genomunu transkripsiyonunu gerçekleştirir. Bunun sonucunda da viral proteinlerin ifadesi oluşur ve virüs bu şekilde konakçı hücrede çoğalmaya başlar. DNA virüsleri çoğunlukla, çoğalabilmek ve genomlarını kopyalayabilmek için konakçı hücrenin RNA polimeraz II enzimini kullanırlar (26). Çekirdekte çoğalan ve kopyalanan DNA virüslerine istisna olarak poxvirüsleri tamamen sitoplazmada replike olurlar (22).

### 2.2.3 RNA Virüsleri

RNA virüsleri hücreye giriş yaptıktan sonra farklı enfeksiyon stratejileri geliştirirler. Retrovirüsler ve influenza virüsü hariç çoğu RNA virüsleri sitoplazmada genomlarını kopyalayıp, çoğalırlar. RNA virüslerinin, negatif polariteli tek iplikli, pozitif polariteli tek iplikli, çift iplikli ve ters transkripsiyon çeşitleri vardır. **Pozitif polariteli tek iplikli** RNA virüsleri mRNA zinciri ile aynıdır ve kendini direkt kopyalayabilmektedir. **Negatif polariteli tek iplikli** RNA virüsleri ise mRNA zincirine komplementer dizilere sahiptir. Transkripsiyonun olması için önce pozitif polariteli yapıya dönüştürülür. Bundan sonra genomunu kopyalar. Pozitif polariteye RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ile çevrilirler. Çift zincirli RNA virüslerinin genomu ise sitoplazmaya bırakılmadan doğrudan kapsid içinde RdRp tarafından kopyalanır (27,28).

### 2.2.4 Viral Enfeksiyonlardan Etkilenen mikroRNA'lar

Yapılan çalışmalar sonucunda, hücrel miRNA'ların viral enfeksiyon sonucunda etkilendiği ortaya çıkmıştır. Bu da hem konak hücre bağışıklık sistemini ve de viral faktörleri önemli ölçüde etkileyerek hücrel çevrede değişiklikler yaratmaktadır. Örneğin; yapılan çalışmalarda Epstein-Barr virüslerinin miR-146a ifadesini B hücrelerinde arttırdığı gözlemlenmiştir. miR-146a'nın aynı zamanda monositlerin, bakteriyel liposakkarit (LPS) indüklenmesinde de arttığı bildirilmiştir. Bu noktadan hareketle miR-146a'nın LPS tarafından aktive edilen elementleri hedefleyerek, TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1 (IRAK1) ve Toll-like receptor (TLR) sinyal yolları, bağışıklık sisteminin cevabını kısıtlayıcı negatif geri bildirim oluşturduğu söylenebilmektedir (29,30).

Onkogenik insan papillomavirüsleri enfekte ettikleri hücredeki p53 ve Rb yollarını engelleyen E6 ve E7 olmak üzere 2 tane viral proteini kodlamaktadır. Dolayısıyla, bu yolları kontrol eden hücrel miRNA'lar da bu virüsün enfeksiyonu ile etkilenmiş olurlar. E6, miR-34a'nın ifadesini baskılamakta, p53 tarafından kontrol edilen miRNA, hücre büyümesinde artışa neden olur. E6 ayrıca miR-218'i azaltarak laminin 5 seviyesini arttırarak ve hücre göçü ve tümör oluşumunu tetiklemektedir (31,32).

İnsan Sitomegalovirüs (hCMV) enfeksiyonunun, miR-100 ve miR-101'i baskıladığı ve bunun sonucunda mTOR sinyal yolağında etkilere neden olduğunu gösterilmiştir. mTOR

yolağı, büyüme, metabolizma ve yaşam gibi çeşitli faaliyetlerde rol alır ve birçok herpesvirüs tarafından değişikliğe uğratılabilmektedir. Bilinen bazı hCMV proteinlerinin TOR yolağında direkt değişiklikler yaptığı da bildirilmiştir (33).

Influenza virüsü ile yapılan bir çalışmada, viral enfeksiyon ile birlikte miR-485'in ifade edilmeye başladığını ve bunun da -retinoic acid inducible gene-1- *RIGI* mRNA yıkımını hedeflediğini göstermiştir. *RIGI*'in aktivasyonunun antiviral bağışıklık cevabını başlattığı bilgisiyle beraber, miR-485'in antiviral cevabı baskıladığı görülmüştür (34).

H1N1 influenza virüsü ile yapılan son çalışmalarda mikroRNA'ların, virüs-konak hücre ilişkisine ve antiviral cevaba etkisini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Burada da görülmüştür ki, miR-124-3p gibi mikroRNA'ların ifadesinde önemli değişiklikler olmuştur. Bu mikroRNA ise bağışıklık sisteminde etkili rollere sahip JAK-Stat, Toll like receptor gibi yolakları hedeflemektedir. Bu da mikroRNA'ların antiviral ve antiinflamatuvar cevapta etkili rol aldığına dair işaret olarak gösterilmiştir (35).

Canine influenza virüsü (CIV) ile yapılan çalışmada da, virüs enfeksiyonu ile beraber bir çok mikroRNA'nın ifadesinde değişiklik olduğu ve bu mikroRNA'ların büyük bir bölümünün bağışıklık cevabını hedefleyen yolakları etkilediği gösterilmiştir (36). Aynı şekilde, H5N1 avian influenza virüsü ile yapılan benzer bir başka çalışmada dalak ve bağışıklık organlarındaki mikroRNA'ların ifadelerine bakılmış ve bu iki organdaki miRNA'ların önemli ölçüde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu da miRNA'ların antiviral cevapta önemli role sahip olduğuna işaret etmektedir (37).

### **2.2.5 Hücresel MikroRNA'ların Virüsler Tarafından Baskılanması**

Hücresel miRNA'ların viral faktörler tarafından kesin olarak baskılandığını ya da aktive edildiğini söylemek zordur. İki hücresel miRNA miR-17-5p ve miR-20a'nın HIV I enfeksiyonu sırasında baskılandığı tespit edilmiştir. Bu iki miRNA'da bir hücresel histon asetilaz olan PCAF'ı hedeflemektedir (38). Tıpkı hCMV enfeksiyonunda olduğu gibi, bu baskılamanın viral faktörler tarafından mı olduğu yoksa konağın bağışıklık cevabı ile ilgili mi olduğu tam olarak ortaya konulamamıştır.

Adenovirüs ilişkili virus RNA'ları, çekirdekte Exportin 5 için hücresel pri-miRNA'lar ile yarışarak sitoplazmada Dicer'in işleyişini engellemekte ve miRNA biyogenezine negatif etkide bulunmaktadır (39,40).

Virüsler bunun haricinde kendi viral miRNA'larının ifade ederek, global olarak hücresel miRNA'lar üzerinde etki yapabilmektedirler. Murin CMV (mCMV) enfeksiyonu sırasında sentezlenen miRNA'larının hücresel miRNA'lara hakim olduğu gözlemlenmiştir (41). Bununla beraber virüsler, spesifik miRNA'ların fonksiyonuna etki etmek için çeşitli protein ve RNA'lar ifade edebilirler. Buna en güzel örnek olarak mCMV enfeksiyonu ile miR-27a'nın baskılanması gösterilebilir. İlginç bir şekilde miR-27a'nın fazla ifade edilmesi ise viral titrasyonda azalmaya neden olmuştur. Bu da miR-27a'nın mCMV'nin yaşam döngüsünün bazı kısımlarında engellemelere sebep olduğu düşüncesini ortaya koymuştur (42). Bu da bazı miRNA'ların baskılanmasının viral replikasyonu artırdığını ortaya koymuştur.

### **2.3 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi**

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) orta Afrika, asya ve doğu Avrupa'da etkisini gösteren ölümcül viral bir hastalıktır. Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü Bunyaviridae ailesinin *Nairovirus* cinsine mensup olup, hastalığın meydana geldiği ülkelere göre değişmek üzere % 3-30 civarında ölüme sebebiyet vermektedir. Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü (KKKAV), keneler aracılığı ile iletilen virüsler arasında geniş bir coğrafi alanda en fazla etkili olan virüsdür. KKKAV'nün insanlara geçişi temel olarak enfekte kenelerin ısırması, bunun yanında daha nadiren KKKA'ne yakalanmış hastanın sekret ve/veya ekskretlerine temas suretiyle olmaktadır (43).

Geniş bir coğrafi alandan etkisini göstermesi ve insanlar üzerinde ölümcül hastalığa neden olması gibi sebepler Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsünü önemli bir patojen haline getirmiştir.

1970 yılı öncesinde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) vakalarının daha çok Bulgaristan, eski Sovyetler Birliği ve Afrika'nın bir bölümünde etkisini gösterdiği gözlemlenmiştir. 1970 yılı sonrasında yeni vakalar Ortadoğu'da görülmeye başlamıştır.

2000 yılı ve sonrasında ise Türkiye'nin de içinde bulunduğu Hindistan, Pakistan, İran ve Kenya gibi ülkelerde de kendini göstermeye başlamıştır (44).

Hastalıkta ortalama ölüm oranı % 30 olup % 70'e kadar çıkabilmektedir. Hastalığın şiddeti kan içindeki virüs miktarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hastalığın semptomlarının belirsizliği ve virüsün kuluçka süresinin değişkenlik göstermesi hastalığın tanısının konmasında güçlükler neden olmaktadır (45).

Hastalık birbirini takip eden 4 farklı aşamadan oluşmaktadır: kuluçka dönemi, prehemoraji, hemoraji ve nekrotik fazı. Bu fazların süresi ve semptomları kişiler arasında değişkenlik gösterebilmektedir (46).

### **2.3.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Moleküler Biyolojisi**

*Bunyaviridae* ailesine mensup virionlar ortalama 100 nm büyüklüğünde, zarf ile çevrili ve küresel bir yapıya sahiptir. Bu ailenin virüsleri; küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olmak üzere 3 tane negatif anlamlı tek zincirli RNA (ssRNA) segmentinden oluşmaktadır. Bu RNA segment dizilerinin terminal nükleotidleri kendi içerisindeki dizilere komplementerdir ve bunun sonucunda "panhandle" (tava sapı) adı verilen pseudo-circular (yalancı-dairesel) yapı meydana gelmektedir. Bu yapı genel olarak viral polimeraz için bir promotor bölgesi oluşturmaktadır (45).

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün S segmenti NP proteinini, M segmenti ise birer zarflı glikoprotein olan  $G_n$  ve  $G_c$  ve  $NS_m$  için öncül polipeptid kodlamaktadır. Virion içinde paketlenen en büyük segment olan L segmenti ise RNA-bağımlı RNA polimerazı kodlamaktadır. KKKAV'nin L segmenti yaklaşık olarak 12 kb büyüklüğündedir ve 4000 amino asit uzunluğundaki bir proteini kodlayan açık çerçeveye (open reading frame - ORF) sahiptir. KKKAV'nin bu segmenti aynı ailedeki diğer virüsler ile karşılaştırıldığında, diğer virüslere göre çok daha büyük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, L segmentinin dizisinin de *Bunyaviridae* ailesinin diğer virüslerinden oldukça farklı olduğu gözlemlenmiştir. KKKAV'nin dizileri diğer negatif anlamlı, tek zincirli RNA virüsleri olan arenavirüs gibi virüslerle karşılaştırıldığında, *Bunyaviridae* ailesine mensup virüslere göre daha çok benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu da KKKAV'nin *Bunyaviridae* dışındaki diğer negatif anlamlı, ssRNA virüslerle ortak ata paylaştığını desteklemektedir (47).



L segmentinin RNA-bağımlı RNA polimerazı kodladığı ve RNA replikasyonu ve mRNA sentezinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu segmentin büyüklüğünün aynı ailedeki diğer virüslere oranla daha büyük olması, bu arada polimeraz dışında proteinlerin de kodlandığına işaret etmektedir. Bu bilgiden yola çıkılarak yapılan çalışmalarda, L segmentinde “putative” ovaryen tümör proteaz (OTU) bölgesi tanımlanmıştır. Bu bölge (OTU) sistein proteaz grubunda yer almakta ve substrat-spesifik ubikuitinlerin proteinlerden çıkartılmasına katılmaktadır. Protein ubikuitinasyonu, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık sisteminin aktivasyonu için gereklidir. Viral polimerazın proteinlerdeki ubikuitinleri kaldırması, virüsün ubikuitine bağlı antiviral yollarını engellemesine yol açmaktadır. Bu da bu bölgenin virüsün immün sistemden kaçışında rol oynadığını göstermektedir (48,49).

KKKAV'nün M segmenti tarafından kodlanan glikoproteinler, virionun yüzeyinde zarfta konumlanmışlardır. L segmentinden de anlaşılacağı gibi, nairovirüslerin genom boyutları *Bunyaviridae* ailesindeki diğer üyelere göre daha fazladır. Bu yüzden de KKKA'nin M segmentinde kodlanan glikoproteinler diğerlerinden daha komplekstir. Bu nedenle olgun glikoproteinlerinin oluşması için, poliproteinler çeşitli ara moleküller ve işlemlerden geçerler. Bu ara işlemleri gerçekleştirebilmek için KKKAV konakçı hücrenin protezlarını kullanarak poliproteinleri öncül  $preG_n$  ve  $preG_c$  yapılarına dönüştürür. Bu öncül glikoproteinler, daha sonra birer hücresel serin endoproteazı olan SKI-1/S1P'nı kullanarak olgun glikoproteini oluştururlar. Enfeksiyöz nitelikli virioun oluşabilmesi bu olgun glikoproteinlerin SKI-1/S1P endoproteazlarına bağlıdır. KKKAV, Dugbe ve Hazara virüslerinin enfekte edebilen virionlara dönüşebilmeleri için bu endonükleazlara ihtiyaçları varken diğer *Bunyaviridae* ailesindeki virüslerde böyle bir gereklilik bulunmamaktadır. Bununla beraber arenavirüslerin de glikoproteinlerin işlenmesinde SKI-1/S1P endonükleazına ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Bu endonükleazların KKKA açısından önemi ise, ileride inhibitör moleküllerin tasarlanmasında güçlü bir hedef olmalarıdır (50).

$G_n$  ve  $G_c$  glikoproteinlerinin temel görevi, hücre yüzey reseptörleri ile etkilişime geçerek virüsün hücreye girişine yardım etmektir. Bunun dışında glikoproteinler nötralizan antikolar için hedef moleküllerdir. Konvalesan dönemi hastalardan alınan serumların, virusun bu protein(ler)ine karşı antikor içerdiği gösterilmiştir (51). Ancak hastalığa karşı korunma, duruma göre değişiklik gösterebilmektedir. Bertolotti-Ciarlet'in yaptığı

çalışmada (47), farelerde G<sub>n</sub> glikoproteinini hedef alan antikorlar fareleri hastalığa bağlı ölümden korurken, *in vitro* yapılan çalışmada antikorlar hastalığa karşı korumada başarılı olamamışlardır.

Viral nükleoprotein (NP) virüsün S genom segmenti tarafından kodlanır. Bu protein viral genomunu ribonükleoprotein kapsit adı verilen kılıf proteinleri ile çevrenmesinde görev alır. Viral enfeksiyon geçirmiş hasta hücrelerinde NP proteinleri perinükleer alanda bulunmaktadır. NP proteinleri aktin iplikçikleri ile etkileşim halinde olup, aktin iplikçiklerinin NP proteinlerini perinükleer bölgeye yönlendirdiği düşünülmektedir. Bu nedendir ki, enfekte olmuş hücreleri cytochalasin D ile muamele etmek NP proteinlerinin perinükleer bölgede lokalize olmasını engellemektedir (45).

### **2.3.2 KKKAV'nün Yaşam Döngüsü ve Hücreye Girişi**

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün hücreye giriş mekanizması ayrıntılarıyla ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Virüslerin genel olarak hücreye giriş yöntemleri düşünüldüğünde ve bugüne kadar yapılan birkaç çalışmaya bakıldığında, KKKAV'nün konakçı hücrenin reseptörlerine, virüs yüzeyinde bulunan glikoproteinler aracılığı ile bağlandığı ve kltrin bağımlı endositoz ile hücreye girdiği düşünülmektedir. Bununla beraber Simon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada virüsün hücreye girişinin ortamdaki pH'tan etkilendiği görülmüştür (23,52).

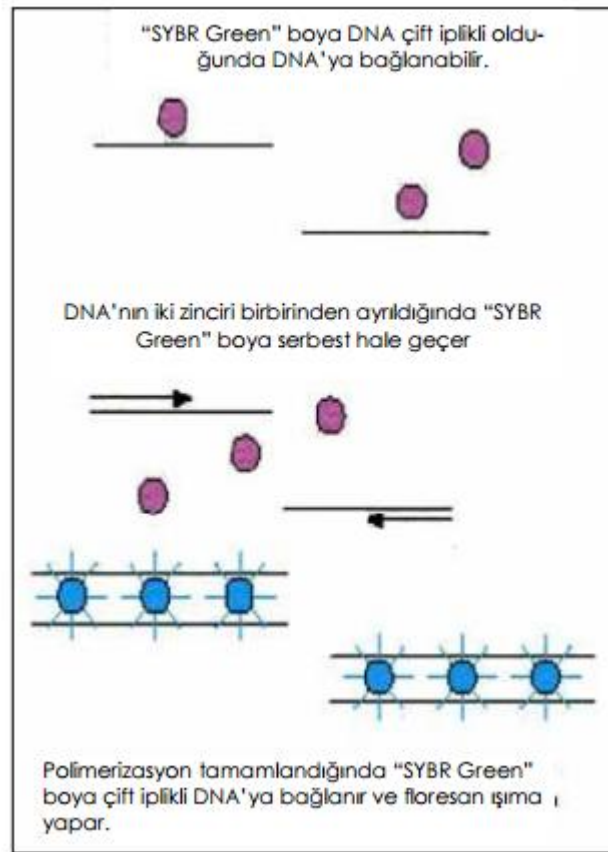
### **2.3.3 KKKAV'nün Transkripsiyon ve Replikasyonu**

Negatif anlamlı tek iplikli RNA virüslerinin replikasyonun gerçekleşebilmesi için negatif anlamlı RNA zincirinin pozitif mRNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu işlem de virionun RNA bağımlı RNA polimerazı ile gerçekleştirilmektedir. Bu dönüşüm de genelde enfeksiyondan 6 saat sonra görülmeye başlanmaktadır.

Yapılan bazı çalışmalar KKKAV replikasyonunun mikrotübüle ve yeteri miktarda NP proteini bulunmasına bağımlı olarak gerçekleştiğini göstermiştir. NP proteinleri replikasyonla beraber yeni sentezlenen genomu kılıf içine almaktadır bu yüzden viral NP proteinleri replikasyon esnasında perinükleer bölgede konumlanmaktadır (53,54).

## 2.4 Eş Zamanlı PZR Dizini

Nükleik asitlerin miktarının belirlenmesinde kullanılan bir metod olan eş-zamanlı PZR temel olarak klasik PCR yöntemini baz alır. Klasik PCR yönteminden farkı ise, nükleik asitlerin amplifikasyonu gerçekleşirken aynı zamanda miktar tayini yapılabilir. Nükleik asitlerinin miktarının belirlenmesinde temel olarak 2 yöntem vardır. Bunlar floresan boya ve probların kullanımına dayalı tekniklerdir. Floresan olarak SYBR-Green gibi çift zincirli DNA'ya bağlanan boyalar kullanılmaktadır. Ancak ışıkları güçlü olmakla beraber, ortamdaki spesifik olmayan DNA'lara da bağlanma özelliğini bulundurmaktadır. Bu nedenle duyarlı ama özgül olmayan bir yöntemler olarak kabul edilmektedirler. Diğer bir alternatif ise olan sekans spesifik probların kullanımı olup bunlar floresan boya aksine özgüldür.



Şekil 2.4.1 SybrGreen tekniğini kullanan eş-zamanlı PZR prensibinin gösterimi

Eş zamanlı PZR dizini gen ifadesi tayin etmede altın standart olup diğer yöntemlere göre düşük maliyetli fakat yüksek özgüllüğe sahiptir. Eş-zamanlı PZR dizini ile aynı anda tek plaka ile birçok mikroRNA'nın ifadesi tayin edilebilmektedir.



### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

#### 3.1 Gerekçe ve Amaç

Kırım Kongo kanamalı ateşi özellikle Asya, Afrika, doğu Avrupa ve Türkiye'yi içine alan bölgede, son yıllarda etkisini arttırarak insanlar üzerinde ölümcül etki bırakacak bir hastalık haline gelmiştir.

Virüsün hızla yayılmasına karşın, hastalığın insan vücudunda ilerleyişi ve patogenezi hakkında birçok bilinmez bulunmaktadır. Aynı zamanda aynı virüsün hayvanlar üzerinde herhangi ölümcül bir etki bırakmazken insanlar üzerinde ölüme kadar götürebilecek etkiler bırakması temelindeki hücresel mekanizmaların büyük bölümü de bu bilinmezler arasında yer almaktadır.

mikroRNA'lar son yıllarda gen regülasyonu üzerinde etkin rol oynadığı gösterilen 20-22 nükleotid uzunluğundaki protein kodlamayan RNA molekülleridir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar mikroRNA'ların hücre döngüsünden, çoğalmasına kadar birçok hücresel olayda düzenleyici rol aldıkları gösterilmiştir.

Tıpkı KKKAV gibi bir RNA virüsü olan HIV, HCV, Andes virüs gibi virüsler üzerinde yapılan çalışmalar mikroRNA'ların, RNA virüs enfeksiyonunda etkili rollere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Bu tez çalışması, KKKAV'nün insanlar dışında memelilerde zarara yol açmazken, insanlarda ölüme sebebiyet vermesinden ve hastalığın patogeneziine dair birçok bilinmez bulunmasından yola çıkarak KKKAV ile konak hücre arasındaki ilişkinin tanımlanmasına olanak sağlayacak ipuçlarını elde edebilmek amacıyla miRNA ifade profillerinin irdelenmesini amaçlamaktadır.

**Hipotez:** Sağlıklı ve akut Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalarının mikroRNA ifadelerinin analizi sonucu seçilen belirli mikroRNA'lar ve bunlarla ilişkili hücresel yollar virüs – konakçı etkileşimine ve dolayısıyla hastalığın patogeneziine ait bilinmezlerin sorgulanmasında uygun hedefler olacaklardır.

## **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **4.1 Materyal**

#### **4.1.1 Akut Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hasta Kanları**

Proje kapsamında, 01-Ekim 2014 tarihli ve 309/2014 karar no'lu etik kurulu onayı (EK 1) ile Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden alınan 5 tane sağlıklı ve 8 tane akut Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı tanısı konulmuş hastaların tam kanları kullanılmıştır.

#### **4.1.2 Kitler**

Alınan kan örneklerinden lenfositleri elde etmek için Biocoll (Biochrom, Almanya) ayırıştırma solüsyonu kullanıldı. Elde edilen lenfosit hücrelerinden total RNA ise Qiazol (Qiagen, 79306) kullanılarak elde edildi. İzolasyonu gerçekleştirilen total RNA'ların cDNA sentezi miScript II RT (Qiagen, 218160) kiti kullanılarak yapıldı. cDNA'lar Human miRNome PCR Array (Qiagen , MIHS 3126Z) kullanılarak miRNA profil analizi gerçekleştirildi. Hastalığa ait viral yük tespiti için Quantitect probe based OneStep Rt-PCR (Qiagen, Almanya) kiti kullanıldı.

### **4.2 Yöntem**

Uygulanan yöntem aşağıda sıralanmıştır;

- Hasta ve sağlıklı kontrol birey kanlarından lenfosit izolasyonu
- Lenfosit hücrelerinden total RNA izolasyonu
- Elde edilen RNA'ların jel elektroforezi ile kalite tayini
- Kaliteli olduğu tespit edilen RNA örneklerinin eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirilmesi
- KKKA viral yük tespiti
- Biyoinformatik analiz ile hedef mRNA'ların belirlenmesi ve yolak analizlerinin yapılması.

### **Uygulama**

#### **4.2.1 Akut Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastaları ve Kontrol Grubu Kanlarından Periferik Lenfositlerin Elde Edilmesi:**

Sekiz adet KKKA hastası ve 5 adet sağlıklı bireye ait heparinize kanlardan lenfositlerin izole edilmesi süreci Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Yüksek Biyogüvenlik Laboratuvarında (BSL-3) gerçekleştirildi. Kan örneklerinden söz konusu hücreleri izole etmek için Biocoll (Biochrom, Almanya) ayrıştırma solüsyonu kullanıldı. Bunun için bütün kan örneklerine eşit hacimde olacak şekilde Biocoll ayrıştırma solüsyonu eklendi. Bu şekilde üzerine ayrıştırma solüsyonu eklenmiş karışım 1200 g'de 20 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj aşamasından sonra fazlara ayrılmış olan karışımdan, orta faz, lenfositler toplandı. Toplanan lenfositlerin üzerine hücre kültürü medyumunu olan Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) eklenip 1200 g'de 15 dakika santrifüj edilmek suretiyle yapılan yıkama işlemi, 2 kere tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra hücreler kullanılabildiği kadar -80°C'de saklandı.

#### **4.2.2 Periferik Lenfosit Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu ve Jel Elektroforezi ile Kalite Kontrolü:**

Hasta ve kontrol gruplarına ait toplam 13 adet kandan elde edilen periferik lenfositlerin üzerine 700 µl Qiazol solüsyonundan (Qiagen, Kat No: 79306) eklendi. Hücrelerin patlamasının ve dağılımının iyi yapılabilmesi için pipetaj yapıldı. Hücreler Qiazol'un içinde çözüldükten sonra üzerine 200 µl kloroform (Sigma, C2432) eklendi. Karışım iyice ve sertçe karıştırıldıktan sonra 5 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 25 dakika süre ile 12.000 g'de ve +4°C'de santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra 3 farklı faz oluşumu gözlemlendi. Burada en üst tabaka RNA, orta faz DNA, pembe olan en alt faz ise organik fazdır. En üst fazdaki RNA orta fazda bulunan DNA'ya değmeyecek şekilde, yaklaşık 300-400 µl, alındı ve RNase içermeyen farklı bir tüpe konuldu. Üzerine 500 µl isopropanol (Sigma, 19516) ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Örnek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 12.000 g'de 25 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi takiben isopropanol pelletine zarar vermeden alındı ve pelletin üzerine % 70 'lik soğuk etil alkolden 1 ml eklenip, 5 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüj etmek suretiyle yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 2 kere tekrarlandı. Etil alkol pelletine zarar vermeden alındı ve pelletin üzerinde kalan etil alkol kalıntısı 5 dakika oda sıcaklığında

bekletilerek uçuruldu. Pellet üzerine 12 µl RNAz'dan arındırılmış ultra saf su eklemek suretiyle pellet çözüldü.

Elde edilen tüm örnekler Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak RNA konsantrasyonlarının tespiti amacıyla ölçüme tabi tutuldu. Konsantrasyonlar ölçüldükten sonra elde edilen RNA'lar % 2'lik agaroz jelde 90 V'da 30 dakika yürütüldü. Agaroz jel 0,5 M, pH8 TBE tamponu kullanılarak hazırlandı.

### **4.2.3 Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Dizini**

#### **4.2.3.1 cDNA Sentezi**

Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirmek için izolasyonu gerçekleştirilen RNA'lardan öncelikli olarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlendi. Kullanılan kit protokolüne göre; elde edilen total RNA'ların içindeki mRNA'ların 3'ucunda bulunan polyA kuyruğu, cDNA sentezi için başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Ancak mikroRNA'larda polyA kuyruğu bulunmamaktadır. Bu nedenle, cDNA sentezinde bu başlangıç noktasını oluşturup, primerin bağlanmasına olanak sağlamak amacıyla mikroRNA'ların 3' ucuna polyA polimeraz ile polyA kuyruğu içeren bir universal dizi eklendi. Bu universal dizinine uygun olan oligo-dT primerleri ile cDNA sentezi yapıldı. Bu işlemde miScript II RT (Qiagen) kiti kullanıldı.

Final reaksiyon karışımında RNA miktarı 240 ng olacak şekilde, aşağıdaki tabloda verildiği gibi cDNA reaksiyon karışımı hazırlandı.



Çizelge 4.1 cDNA sentezi reaksiyon karışımı.

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (µl)</b>
5X miScript HiSpec Buffer	4
10X miScript Nucleics mix	2
RNAz içermeyen su	Değişken
miScript RT mix	2
Kalıp RNA	Değişken
<b>TOPLAM</b>	20

Tabloda belirtilen karışım kalıp RNA ve su eklenmeden hazırlanmıştır. Her reaksiyon tüpüne final konsantrasyon 240 ng olacak şekilde su ve kalıp RNA'dan eklendi. Nazikçe karıştırıldıktan sonra, kısaca santrifüj edildi. Bundan sonra tüpler thermal cycler kullanılarak 37°C'de 60 dakika ve takiben 95°C'de 5 dakika inkubasyona bırakıldı. Bu işlemten sonra her reaksiyon tüpüne 310 µl RNAz içermeyen su eklenerek toplamda 330 µl olacak şekilde eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda her bir plakada 100 µl kullanılmak üzere seyreltildi.

#### 4.2.3.2 Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA sentezi gerçekleştirilen ve su ile seyreltilen örnekler Polimeraz Zincir Reaksiyonu karışımı ile hazırlandıktan sonra 384 kuyulu, her kuyunun içerisinde farklı bir mikroRNA'yı hedef alan primer bulunduran plaka içine 10 µl olacak şekilde dağıtıldı. miRNA PZR Dizini için reaksiyon karışımı Çizelge 4.2'de sunulduğu şekilde hazırlandı.

Çizelge 4.2 miRNA PZR Dizin reaksiyon karışımı.

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar (µl)</b>
2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix	2050
10X miScript Universal Primer	410
RNAz içermeyen su	1540
Kalıp cDNA	100

Mikro RNA PZR dizin reaksiyon karışımı hazırlanıp 384 kuyulu plakaya dağıtıldıktan sonra üzeri kit içinde sağlanan şeffaf bant ile kapatıldı. Sonrasında 1000 g ve 15°C' de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. LightCycler480 (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak

amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan termal döngü protokolü aşağıda sunuldu;

95°C’de 10 dakika Ön denatürasyon

45 kez (siklus) tekrarlamak üzere

94°C’de 15 sn Denatürasyon

55°C’de 30 sn Primer bağlanması (Okuma)

70°C’de 30 sn Uzama

Yeşil filtre ile okumalar her siklusun primer bağlanması basamağında gerçekleştirildi.

#### **4.2.4 Veri Analizi**

##### **4.2.4.1 Eş-Zamanlı PZR Dizin Analizi**

LightCycler480 cihazında gerçekleştirilen eş-zamanlı PZR çalışmasının sonuçları Cp (crossing-point) değeri olarak elde edildi. Elde edilen Cp değerlerinin analizi için “<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>” adresinden ulaşılabilen miScript miRNA PCR Array veri analizi programı kullanıldı. Elde edilen Cp değerleri  $\Delta\Delta C_t$  metodu ile analiz edildi.

Her plaka (array) içinde çeşitli miktarda, RNA’nın kalitesini ve eş-zamanlı PZR dizin çalışmasının başarılı olup olmadığını kontrol eden primerler bulunmaktadır. Her çalışma sonunda bu primerlerin  $C_t^{PPC}$  değerlerinin kontrolü yapıldı. Kit protokolüne göre bu değerlerin 19-21 arasında olması gerekmektedir. Bununla beraber çalışmada herhangi bir inhibitör etkisi olup olmadığını kontrol etmek için reverse transcription kontrolü gerçekleştirildi. Burada da  $\Delta C_t$  değerlerinin 7’den küçük olması gerekmektedir.

Kontrol işlemi yapıldıktan sonra her miRNA için  $\Delta C_t$  değeri hesaplandı. Daha sonra  $\Delta\Delta C_t$  değeri hesaplanmak suretiyle  $2^{\Delta\Delta C_t}$  ile kat değişim hesabı gerçekleştirildi.

MikroRNA’ların ifade seviyelerini karşılaştırabilmek amacıyla “Student t-test” istatistiksel metodu kullanıldı.

#### 4.2.4.2 MikroRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Yolak Analizi

Eş-zamanlı PZR dizin çalışması sonucunda elde edilen verilerden en çok kat değişimini gösteren miRNA'lar p değerine ve kat değişimine göre seçildi. Seçilen miRNA'lar için hedef genlerin belirlenmesi "mirWalk" biyoinformatik veritabanı (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) ile gerçekleştirildi. Öncelikli olarak bu veri tabanında bulunan deneyler ile validasyonu yapılmış hedef genler alındı. Valide olmuş hedef geni olmayan mikroRNA'lar için veritabanının tahmini hedef genleri kullanıldı. Belirlenen gen listeleri "Diana" veritabanına (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) yüklenerek yolak zenginleştirme analizi yapıldı.

#### 4.3. KKKA Viral Yük Tayini

Bu amaçla doğrulanmış KKKA hastalarından (n=8) alınan kan örneklerindeki lenfositlerde miRNA analizi yapıldığı andaki viral yük tespit edildi. İşlem KKKAV S segmenti (N protein kodlayan) düzeyinde ve mutlak kantitasyon yöntemine uygun olarak Real Time RT-PCR işlemi ile yapıldı. Araştırma kapsamında kullanılan kantitasyon sistemi Veteriner Fakültesi Viroloji anabilim dalında geliştirilmiş olup, her teste kopya sayısı bilinen 3 DNA standartının dahil edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu kapsamda KKKA hastalarına ait lenfosit örneklerindeki viral yükün tespiti amacıyla testlere dahil edilen standart yoğunlukları 10 , 100 ve 1000 kopya/mL olarak kararlaştırıldı.

Viral RNA ticari olarak elde edilen Cador Viral nükleik asit izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) ile hasta kanlarına ait plazmadan gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerindeki RNA konsantrasyonu NanoDrop ile ölçüldü ve her örnekten toplam 50 ng RNA reaksiyona dahil edildi. Tek basamaklı RT-PZR ticari olarak sağlanan bir kit yardımıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla hidroliz problemleriyle kullanılmak üzere tasarlanan ticari kit (Rotor Gene Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Kat. No:204574, Almanya) ile önerilen protokolde bazı değişiklikler yapılarak Çizelge 4.3 'de tarif edilen karışım toplam 25 µL olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon Çizelge 4.4'de gösterilen ısı değerleri, zaman ve döngüleri ile Real Time PCR cihazında (Rotor Gene Q, Qiagen, Almanya) gerçekleştirildi.

Çizelge 4.3 Real Time PCR için reaksiyon karışımı bileşenleri.

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix	12,5µL	1X
Primer –Forward	0,8µL	0,3 µM
Primer –Reverse	0,8µL	0,3 µM
Probe	0,4µL	0,15µM
Rotor-Gene RT Mix	0,25µL	
RNaze içermeyen su	Değişken	
Kalıp RNA/Standart DNA	Değişken	50ng
Toplam	25µL	

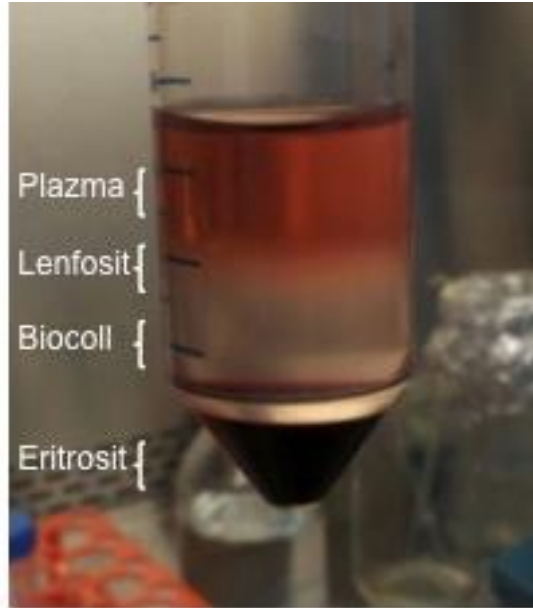
Çizelge 4.4 Real Time RT-PCR işleminde kullanılan ısı değerleri, zaman ve döngüleri.

<b>İşlem</b>	<b>Zaman</b>	<b>Isı Değeri</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Revers Transkripsiyon	10 dk	50 °C	1
PCR başlangıç aktivasyonu	5 dk	95 °C	1
Denaturasyon	5sn	95 °C	40
Bağlanma/Uzama/Okuma	10sn	57 °C	

## 5. BULGULAR

### 5.1 KKKA Hastalarından ve Kontrol Grubu Kanlarından Periferik Lenfositlerin Elde Edilmesi

KKKA hastalarından ve sağlıklı kişilerden kontrol grubu olarak alınan kanlardan Biocoll (Biochrom, Almanya) ile lenfosit hücreleri elde edildi. Örnek kanları Biocoll ayrıştırma solüsyonu ile muamele edildikten sonra fazlara ayrıldı. Bunlardan bulanık gözüken faz lenfositleri içeren fazdır. Kan örneklerinin bu işlem sonrasında fazlara ayrılmış örnek görüntüsü Şekil 5.1.1’de sunuldu.



Şekil 5.1.1 Araştırmada kullanılan kan örneklerinden lenfosit fraksiyonunun Biocoll ile ayrılması.

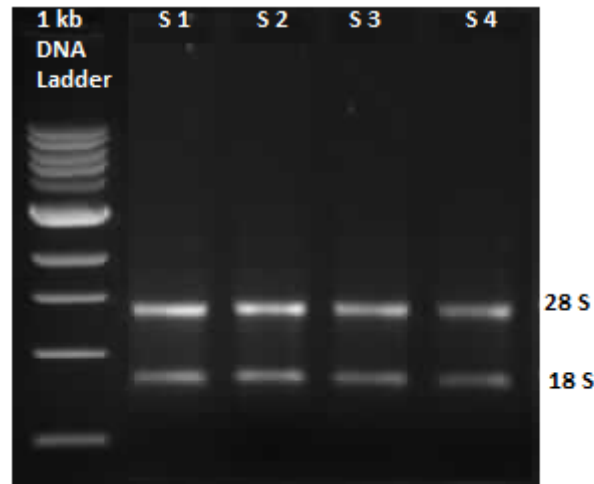
### 5.2 RNA Kalitesi

Hasta kanları örneklerinden elde edilen RNA’lar öncelikli olarak konsantrasyonlarını, saflıklarını ve miktarlarını belirlemek amacıyla spektrofotometre ile ölçülmüştür. Konsantrasyon sonuçları Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometre ölçüm değerleri.

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>230/260</sub>
<b>BY</b>	78,9	1,88	1,75
<b>EK</b>	45,3	1,96	1,83
<b>ND</b>	52,4	2,01	2,12
<b>ÖE</b>	64,2	2,04	2,08
<b>LK</b>	32,6	1,73	1,89
<b>HL</b>	35,4	1,84	1,95
<b>AC</b>	44,8	1,82	1,94
<b>MY</b>	55,9	1,78	1,97
Kontrol 1	39,2	1,72	1,82
Kontrol 2	72,1	1,89	1,87
Kontrol 3	35,4	1,99	1,85
Kontrol 4	45,6	1,81	1,89
Kontrol 5	52,7	1,72	1,99

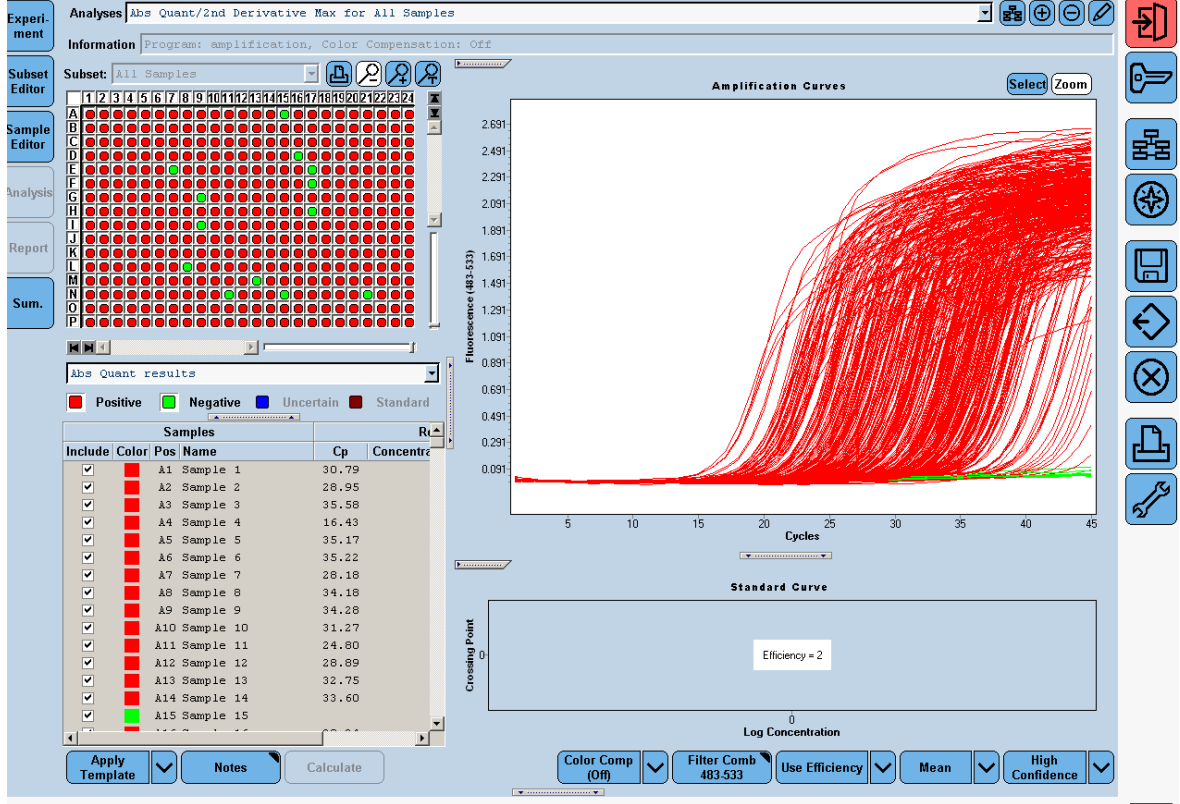
Konsantrasyonları ölçülen RNA'ların bütünlüğünü, DNA kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla, RNA'lar %2'lik agaroz jelde 30 dk yürütülmüştür. RNA'larda herhangi bir genomik DNA kontaminasyonuna ya da RNA degradesiyonuna rastlanmamıştır. Elde edilen jellerin temsili görüntüsü Şekil 5.2.1'deki gibidir.



Şekil 5.2.1 Lenfositlerden izole edilen RNA'ların % 2 Agaroz jel'deki görüntüsü

### 5.3 Eş Zamanlı PZR Dizin Sonuçları

Elde edilen her bir RNA örneğinden 240 ng olacak şekilde cDNA sentezi miScript II RT (Qiagen) kiti kullanılarak yapıldı. cDNA'lar ile Light Cyler 480 (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilen eş-zamanlı PZR dizin çalışması sonunda elde edilen sonuçlardan bir tanesi örnek olarak Şekil 5.3.1'de verildi.



Şekil 5.3.1 Eş zamanlı PZR dizin çalışması sonucunun bir örneği.

### 5.4 KKKAV Viral Yük Tespiti Sonuçları

Çalışma kapsamına alınan 8 adet KKKK hastasına ait kan örneklerinde tespit edilen viral gRNA yüklerinin  $8,59 \times 10^2$  ile  $7,95 \times 10^6$  arasında dağılım gösterdiği saptandı. Çalışmada kan örnekleri kullanılan hastaların hepsinin hastalık tabosunu atlattığı bilgisi edinildi. Lenfosit örneklerine ait real time RT-PCR Ct değerleri ile RNA yükü ( $\text{Yük} = 10^{(0.425 \times \text{Ct} + 15.726)}$ ) Çizelge 5.2'de sunuldu

Çizelge 4.6 Araştırma kapsamına alınan KKKAV hastalığı tanısı konan 8 kişiye ait viral gRNA yükleri.

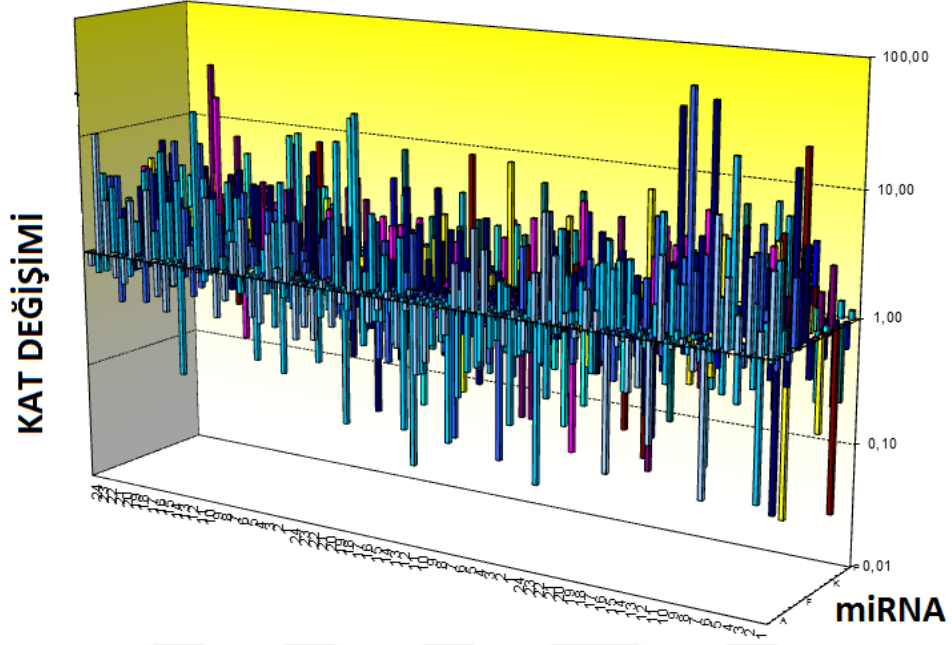
Hasta Adı (Cinsiyet)	Ct	KKKAV gRNA Yük (kopya/mL)
BY (♂)	30,15	$1,21 \times 10^3$
EK (♀)	22,07	$7,95 \times 10^6$
ND (♀)	27,82	$8,69 \times 10^5$
ÖE (♂)	32,41	$0,9 \times 10^2$
LK (♂)	23,66	$5,4 \times 10^6$
HL (♂)	24,21	$4,05 \times 10^6$
AC (♀)	26,44	$1,01 \times 10^6$
MY (♂)	31,37	$8,59 \times 10^2$
Std1	34,42	$1 \times 10^1$
Std2	32,26	$1 \times 10^2$
Std3	30,30	$1 \times 10^3$

### 5.5 KKKAV ile Anlamli Kat Değişimi Gösteren MikroRNA'ların Belirlenmesi

Eş zamanlı PZR dizini gerçekleştirildikten sonra elde edilen sonuçlarla  $\Delta\Delta Ct$  yöntemi kullanılarak kat değişimleri hesaplandı. mikroRNA'lara ait 384 kuyulu plakayı ve her

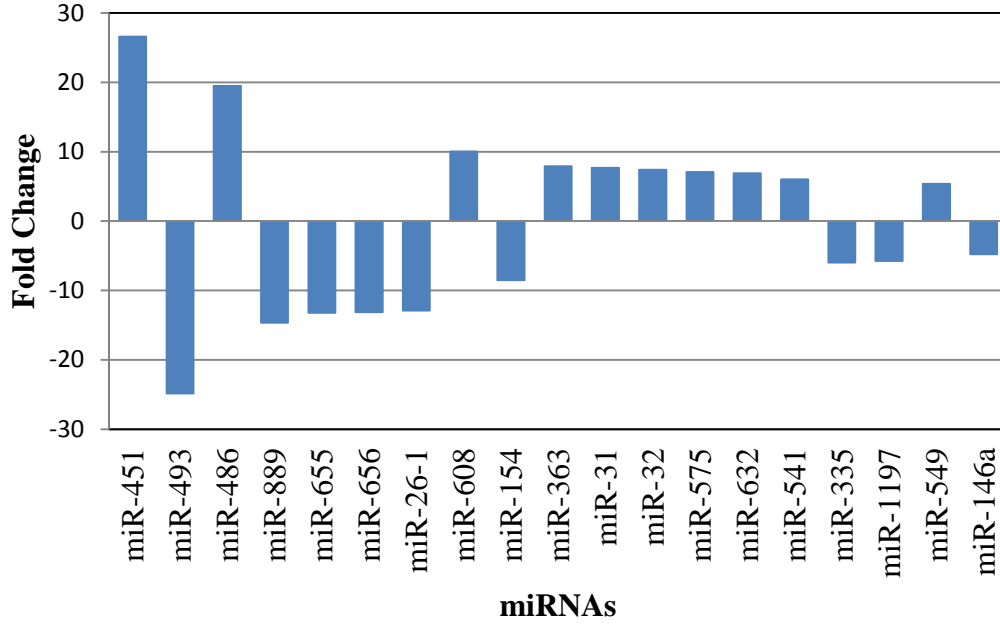


kuyuda bulunan miRNA'ların kat değişimlerini 3 boyutlu olarak gösteren grafik Şekil 5.5.1'de verildi.



Őekil 5.5.1 KKKK hastalarındaki mikroRNA'ların ifade analizini 3 boyutlu plaka dűzeninde gűstermektedir.

Çizelge 4.7 Anlamlı olarak ifadesinde azalma ve artış görülen mikroRNA'ların kat değişimini göstermektedir.



Eş zamanlı PZR dizini sonucunda anlamlı değişim gösteren mikroRNA'ların örnek listesi Çizelge 5.5'te gösterildi. Bu noktada, araştırma geneli itibarıyla yapılan değerlendirmeler sonrasında p değeri ve kat değişimi göz önüne alınarak, kat değişimi 5'in üzerinde olan ve p değeri 0,05'ten küçük olan miRNA'lar dikkate alındı.

Çizelge 4.8 PZR dizini sonucunda kontrol örneklerine kıyasla anlamlı pozitif kat değişimi gösteren ilk 10 miRNA'nın örnek listesi.

<b>miRNA</b>	<b>Kat Değişimi</b>	<b>p Değeri</b>
hsa-miR-144	26,59	0,011098
hsa-miR-451	19,47	0,031344
hsa-miR-486-5p	14,67	0,039374
hsa-miR-608	10,03	0,016851
hsa-miR-363	7,89	0,013248
hsa-miR-31	7,7	0,022737
hsa-miR-32	7,42	0,003247
hsa-miR-575	7,08	0,03057
hsa-miR-632	6,88	0,009908
hsa-miR-541	6,02	0,000099

Çizelge 4.9 PZR dizini sonucunda kontrol örneklerine kıyasla anlamlı negatif kat değişimi gösteren miRNA'ların örnek listesi

<b>miRNA</b>	<b>Kat Değişimi</b>	<b>p Değeri</b>
miR-493	-24,83	0,017173
miR-889	-14,67	0,034318
miR-655	-13,21	0,045184
miR-656	-13,13	0,041351
miR-26a-1	-12,59	0,017993
miR-154	-8,51	0,001482
miR-335	-6,01	0,01501
miR-1197	-5,73	0,042193
miR-146a	-4,8	0,0001

### 5.5.1 Hedef Genlerin Belirlenmesi ve Yolak Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

P değeri ve kat değişim oranları göz önüne alınarak seçilen miRNA'ların hedeflediği genlerin tespit edilmesinde miRWalk veri tabanı kullanıldı. Burada öncelikli olarak seçilen miRNA'ya ait deneyler ile doğrulanmış hedef genler belirlendi. Doğrulanmış geni bulunmayan miRNA'lar için ise yine miRWalk veri tabanının tahmini hedef gen belirleme programı kullanılarak olası aday genler seçilmeye çalışıldı. Tahmini hedef genler, her gen için miRWalk veritabanı tarafından belirlenen p değerlerinin 0.01 den küçük olanları arasından secildi. Elde edilen miRNA'lardan artış gösteren miR-451, miR-486, miR-608, miR-363, miR-31, miR-32, miR-575, miR-632, miR-541 ve miR-549'un orta hedef genlerinin örnek listesi çizelge 5.6'da sunuldu.

Bundan sonra, elde edilen gen listeleri ile Diana veri tabanında KEGG yolak analizi aracı kullanılarak yolak zenginleştirme analizi gerçekleştirildi. İfadesinde artış gösteren miRNA'lar ile azalma gösteren miRNA'ların her iki grup için ortak genleri kullanılarak yolak zenginleştirme analizi yapılmıştır. Yapılan analizin örnek sonuç tablosu çizelge 5.7'de gösterildi.

Çizelge 4.10.İfadesinde artış gösteren miR-451, miR-486, miR-608, miR-363, miR31, miR-32, miR-575'in miRWalk veritabanından elde edilen örnek ortak hedef gen listesi

Gen Sembolü	Gen Sembolü2	Gen Sembolü3
HAT1	C16orf90	MED19
NUMB	RASGEF1A	NSFL1C
TTC21B	MMP9	GOLGA8A
LPHN3	GPR108	SPSB2
UBE2H	DDX39B	ILF2
MYOG	SAMD4B	ADCY4
ACADL	CDSN	SATB2
CREB5	FAM118A	HHAT
SMEK2	HAO2	ADIPOQ
PTTG1IP	WHSC1	MCM2

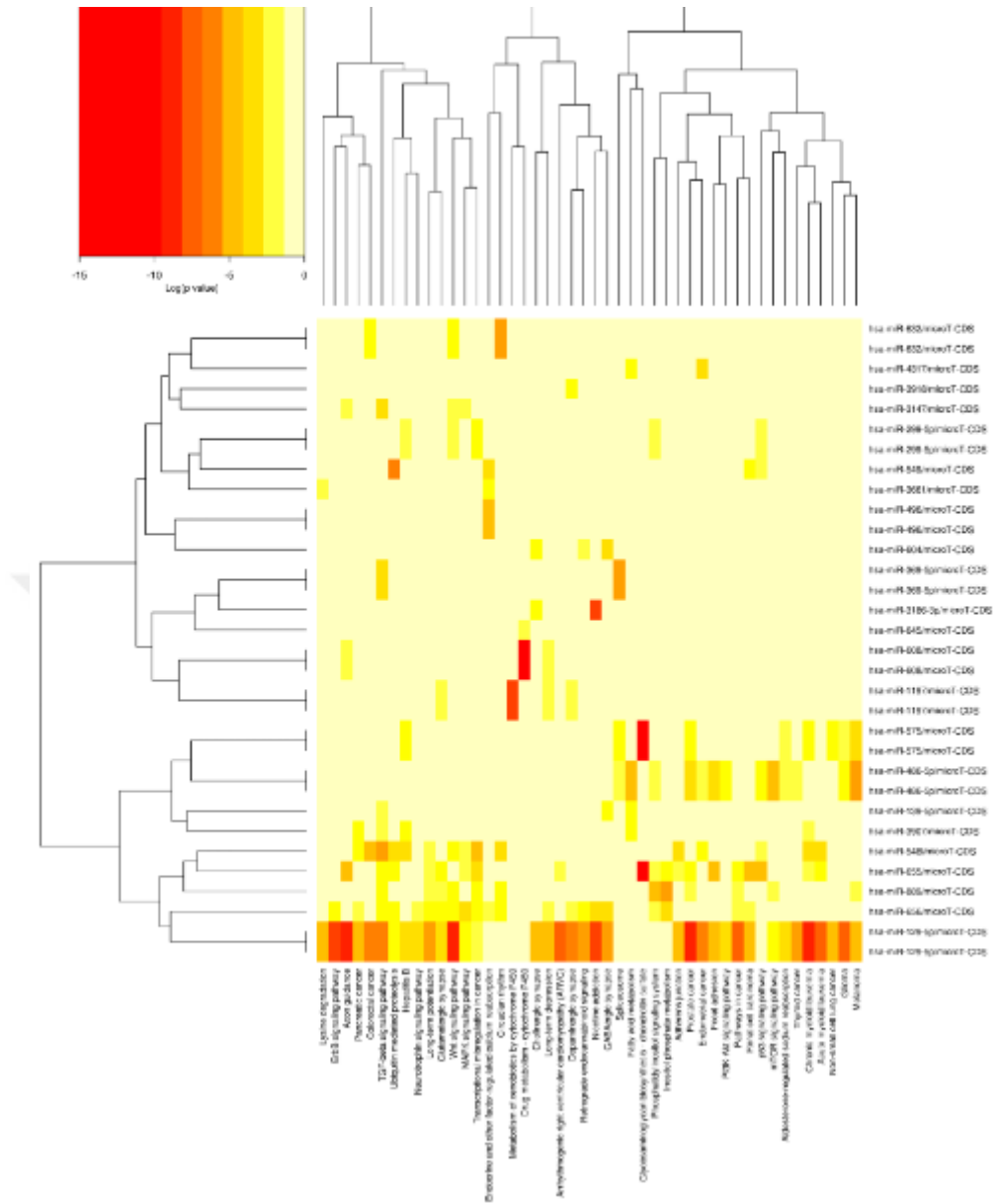
Çizelge 4.11 İfadesinde azalma görülen miRNA'ların hedef gen listelerinden yapılan yolak zenginleştirme analizi sonuçları

<b>KEGG Yolakları</b>	<b>Gen #</b>	<b>MiRNA #</b>
TGF-beta sinyal yolağı	38	9
Hepatit B	55	21
HTLV-I enfeksiyonu	86	21
Fokal Adhezyon	78	20
Aktin sitoskeleton regülasyonu	73	18
Tight junction	51	18
PI3K-Akt sinyal yolağı	113	20
ER'da protein işlenmesi	61	15
Kanser yolakları	131	21

Çizelge 4.12 İfadesinde artış görülen miRNA'ların ortak hedef gen listelerinden yapılan yolak zenginleştirme analizi sonuçları

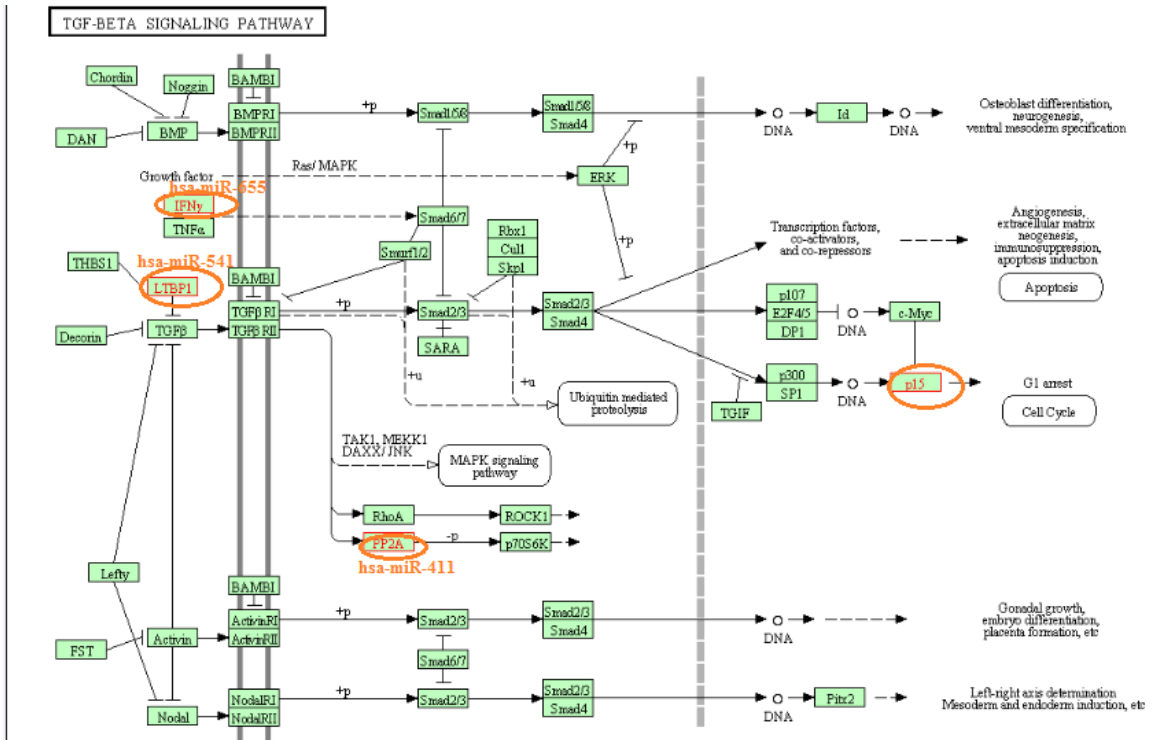
<b>KEGG Yolakları</b>	<b>Gen #</b>	<b>MiRNA #</b>
Wnt sinyal yolağı	57	7
MAPK sinyal yolağı	91	20
İnsülin sinyal yolağı	48	17
JAK-STAT sinyal yolağı	51	19
Kemokin sinyal yolağı	59	18
Endositoz	73	20
Kanser yolakları	131	21

Belirlenen miRNA'lar ile bu miRNA'ların en çok hangi yolaklar üzerinde yoğunlaştıklarını tespit etmek için yapılan şekil 5.5.2'deki dendrogram'da gösterildi.



Şekil 5.5.2 miRNA'lar ve rol aldıkları yolları gösteren dendrogram.

Yapılan yolak zenginleştirme analizi sonucunda seçilen miRNA'ların en çok TGF-β sinyal yolağını hedeflediği tespit edildi. TGF-β'nın KEGG yolağı ve bu yolakta görev alan genler Şekil 5.5.3'te gösterildi.



Şekil 5.5.3 TGF-β Sinyal yolağı KEGG yolak analizi.

## 6. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalarındaki mikroRNA ifade profillerinin analizi yapıldı. Bu analizin yapılabilmesi için PZR Dizin metodu eş-zamanlı PZR ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlardan biyoinformatik analizler aracılığı ile anlamlı veriler elde edilmeye çalışıldı

mikroRNA'ların gen regülasyonunda kritik rol oynadığı, diğer RNA virüsleri ile yapılan çalışmalarda da mikroRNA'ların virüs enfeksiyonlarında önemli rollere sahip olduğu ve Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalığında daha önce böyle bir çalışmanın yapılmamış olduğu bilgisinden yola çıkılarak KKKA'de mikroRNA ifade düzeyleri araştırılmaya başlandı. İfade düzeylerini tespit etmek için ise altın standart olan eş-zamanlı PZR yöntemi kullanıldı.

Bugüne kadar KKKA'de herhangi bir mikroRNA çalışması yapılmamıştır. Ancak KKKAV gibi birer RNA virüsü olan ve aynı familyaya ait olan hantavirüslere baktığımızda, mikroRNA ile yapılan çalışmalar görmekteyiz (55) . Bununla beraber yine bir RNA virüsü olan HCV, HIV gibi virüslerde yapılan bir çok çalışmada mikroRNA'ların virüs enfeksiyonunda ve hastalık patogenezinde önemli rol oynadığı ortaya kondu. Buradan yola çıkarak da KKKA'da da mikroRNA'ların rolü araştırılmaya başlandı.

Araştırmanın deney aşamasında PCR Array için kitin önerdiği başlangıç RNA miktarı 250 -500 ng idi. Ancak çalışmada 240 ng kullanıldı. Bu genel olarak sonuçlar üzerinde çok büyük etkide bulunmamakla beraber bazı mikroRNA'ların ifade analizinde yetersiz kaldı.

Araştırma sonucunda elde edilen veriler öncelikle  $\Delta\Delta C_t$  metodu kullanılarak anlamlı bir şekilde artış ve azalış gösteren mikroRNA'lar tespit edilip ardından her biri için hedef genler belirlendi. Elde edilen gen listeleri ile yolak zenginleştirme analizleri yapıldı ve KKKA hastalığının patogenezinde rol oynayabilecek birtakım yolaklar belirlendi.

Öncelikli olarak eş-zamanlı PZR dizin sonuçlarından anlamlı değişiklik gösteren mikroRNA'lar belirlendi. Bu aşamada p değeri ve kat değişimleri göz önüne alınarak anlamlı olarak ifadesinde artış ve azalan gösteren miRNA'lar seçildi. Kat değişimi 2 ve



üzerinde olan çok fazla sayıda mikroRNA olduğu için bu değer 5 olarak seçildi. mikroRNA'lar p değeri 0,05'ten küçük olup kat değişimi 5'ten yüksek olanlar şeklinde sıralı bir liste haline getirildi. Buradan hem kat değişimi yüksek olup hem p değeri 0,05'in altında olanlar seçildi. Bu filtreleme sonucunda toplamda 106 mikroRNA'nın anlamlı olarak azalış veya artış gösterdiği belirlendi.

KKKAV'nün konakçı hücreye girmesiyle beraber gözlenen ilk patofizyolojik olay eritrositlerin ve plazmanın dokulara doğru sızmaya başlamasıdır. Bu sızıntının sebebi hala tam olarak bilinmemekle beraber iki muhtemel açıklamanın üzerinde durulmaktadır. İlk olarak proinflamatuvar sitokinlerin rolü üzerinde durulmaktadır. Buna bağlı olarak Dengue virüsü ile yapılan bir çalışmada, TNF- $\alpha$ 'nın endotel hücrelerin yıkımında rol oynadığı gösterilmiştir (56). Başka bir çalışmada ise bu sitokinlerin KKA ile ilişkili olup hastalığın potansiyel biyomarkeri olabileceği gösterilmiştir (57). Yaptığımız miRNA hedef belirleme analizleri sonucunda, birer sitokin olan IL-8, IRAK1 ve NF $\kappa$ B'nin hsa-miR-146a tarafından hedeflendiği görüldü. Bununla beraber PCR dizin sonucunda da hsa-miR-146a'nın ifadesinde önemli oranda azalma gözlemlendi. Analiz sonuçlarından yola çıkarak, miR-146a'nın ifadesindeki azalış bu sitokinlerin daha etkin rol oynamasıyla beraber endotel hücre yıkımına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda miR-493 ifadesinin kolon kanserinde azalma gösterdiği ve temel hedef genlerinden olan MKK7'nin ve gene hedef genlerinden biri olan E2F1'in tümör hücrelerinin metastazını engellediği ortaya çıktı (58,59). Bunun yanında KKKAV gibi bir RNA virüsü olan HCV enfeksiyonu ile yapılan çalışmada hsa-miR-493 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (60).

miR-493'ün hedeflediği genlerin ve rol aldığı yolların analizi yapıldığında, yer aldığı yollardan bir tanesinin musin, O-glikan biyosentezi olduğu görüldü. Musin, O- glikanlar genel olarak hücre yüzeyini koruyan yapılardır. Bununla beraber KKKAV glikoproteinleri ile yapılan çalışmalarda da görülmüştür ki, M segmentinde bulunan amino terminaldeki glikoproteinlerde glikolizlenmiş müsin alanları bulunmakta ve bu da virüse çeşitli yüzeye sahip hücrelere temas edebilmesini sağlamaktadır (51). Yapılan çalışmada hsa-miR-493'ün ifadesinde 24,83 kat oranında azalma olduğu ve 0,017 p değerine sahip olduğu görüldü.. Bu da virüs enfeksiyonu ile beraber konakçı hücre yüzeyi üzerinde bulunan musin, O-

glikan biyosenteziyle alakalı aksaklıklar olabileceği ve bu yolak üzerinden hsa-miR-493 ifadesinde azalma olduğu ya da olabileceği düşünülmektedir.

Akciğer adenokarsinomları ile yapılan bir çalışmada hsa-miR-655'in ifadesine bakılmıştır. Buna göre bu mikroRNA'nın ifadesinin artması PTEN aktivitesini düşürerek TGFβ yolağının düzenlenmesine etki etmektedir (61). KKKAV taşıyan hastalar üzerinde yapılan ifade analizinde ise miR-655'in ifadesinde anlamlı ve önemli bir oranda azalış görüldü. Bu miRNA ile yapılan yolak analizlerine ve hedef genlerine bakıldığı zaman özellikle TGFβ sinyal yolağı ve primer bağışıklık yetersizliğinde rol aldığı görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar da göz önüne alındığında; hsa-miR-655'in KKKAV'da virüs enfeksiyonu ile beraber ifadesinde azalma olup bağışıklık sisteminin zayıflamasına yol açacak regülasyonlar gerçekleştirdiği ve bu sebep ile hastalığın ilerlediği tahminini yapabiliriz.

Hsa-miR-451 KKKAV enfeksiyonunda en çok ifadesi artan mikroRNA olarak saptandı. Influenza A virüsü ile enfekte olmuş hücrelerde miR-451 ifadesinin arttığı ve bu artışın dendritik hücrelerin sitokin cevabında etkili olduğu görüldü. (62). Bununla beraber yapılan başka bir çalışmada miR-451'in eritrositleri oksidanlardan koruyan yollarda görev aldığı gösterildi (63). Bu verilerden yola çıkarak KKKAV enfeksiyonunda miR-451'in ifadesinin artış göstermesi, hastalığın dendritik hücreler üzerinde etki gösterdiğine işaret etmektedir. Mir-410 KKKAV ile aynı aileden gene bir Hantavirüs olan Andes virüsü ile yapılan çalışmada, enfeksiyon ile birlikte ifadesinde değişikliğe uğradığı görüldü (55). Mir-410'un hedeflediği genler ve hücre içindeki rolü ile yapılan çalışmada ise bu mikroRNA'nın daha çok sekresyonun düzenlenmesinde görev aldığı ortaya kondu (64). KKKAV ile yaptığımız ifade analizi çalışmasında da bu miRNA'nın ifadesinde azalma olduğu gözlemlendi. Bütün bu bilgilerden yola çıkarak bu azalmanın KKKAV enfeksiyonunu takiben hücrede ekstraselüler matriks salgılarının sekresyonunda çeşitli değişikliklere neden olabileceğini düşünmekteyiz.

KKKAV'nün L segmentinde bulunan OTU (ovarian tumor domain) proteaz bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge deubikitasyona neden olan sistein proteazları barındırmaktadır. Bu proteazlar, proteinlerin üzerinde bulunan ubiquitinlerin hidrolize olmasına neden olarak proteinlerin proteazamol olarak yıkımlarına yol açmaktadırlar. Bununla beraber protein ubiquitasyonunun bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı cevabı için gerekli öğeler

olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu bölgede kodlanan proteazların, ubikitasyon hidrolizi ile antiviral yolları engelleyip virüsün bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (45). MiR-146a'nın sitokin reseptör genlerini hedeflenmesiyle beraber, virüsün bağışıklık sisteminden kaçışında görev alabileceği sonucu çıkmaktadır.

### **6.1 MAPK Sinyal Yolağı**

MAPK sinyal yolağı, hücre yüzeyindeki reseptörler ile başlayan ve çekirdekteki DNA ile son bulan bir sinyal iletim ağıdır. Reseptörlerin hücre yüzeyine bağlanması ile başlar ve en sonunda sinyal hücredeki DNA'ya iletilir. Burada iletilen sinyal ile sonuç olarak protein ifadelerinde değişiklik meydana gelerek hücrede değişiklik meydana gelir.

MAPK sinyal yolağının KKKK'de etkili olduğunu daha önce herhangi bir çalışma göstermemiştir. Ancak HIV gibi birçok RNA virüsünün viral enfeksiyon ve replikasyonunu kontrol etmek amacıyla MAPK yolağını hedef aldığı, MAPK sinyal yolağının engellenmesi ile HIV-1 enfeksiyonunun down-regülasyonuna sebep olduğu yapılan çalışmalarda gösterildi (65). MAPK sinyal yolağının yapılan yolak zenginleştirme analizleri ile hastalıkta etkin rol aldığı muhtemel yollardan biri olduğu bilgisinden yola çıkarak KKKAV'nün de bu yolağı virüs replikasyonunu kontrol etmek için kullanabileceğini söyleyebiliriz.

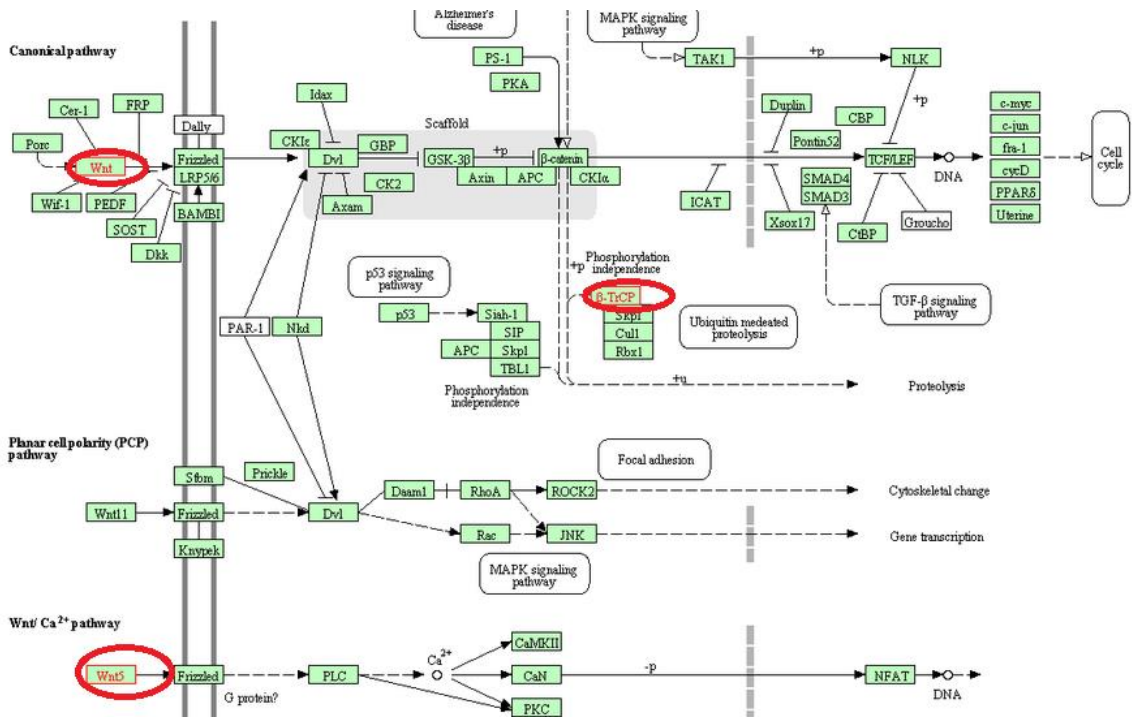
### **6.2 TGF- $\beta$ Sinyal Yolağı**

TGF- $\beta$  sinyal yolağında temel olarak PP2A, P15, LTBP1 ve IFN $\lambda$  genleri hedeflenmiştir. Bu yolak içerisinde P15'in hücrenin G1 evresinde duraksamasında görev almaktadır. Diğer genlerde hücrede büyüme, apoptozis gibi olaylarda etkindir. Buradan yola çıkarak, bu yolaktaki bu genlerin KKKK'da hedeflenmesinin virüs replikasyonunun aktivasyonunda görev alabileceği düşünülmektedir.

### **6.3 Wnt Sinyal Yolağı**

Wnt sinyal yolağı genel olarak proteinlerin hücre dışından hücre içine doğru geçişini içeren yolaktır. Yapılan çalışmalar bu yolağın kanser, diyabet, proliferasyon ve hücre göçü gibi olaylarda rol aldığını gösterdi. Bu yolak daha önce KKKK'da tanımlanmamıştır. Ancak

WNT/CNNT1 ile yapılan çalışmalar bu yolağın aynı zamanda antiviral bağışıklık cevabını negatif yönde düzenlediğini göstermiştir (66). Buradan yola çıkarak, KKKAV enfeksiyonu ile birlikte bu yolağın aktif hale getirerek hücrenin virüse karşı cevabını zayıflattığını söyleyebiliriz.



Şekil 6.3.1 Wnt Sinyal Yolak Analizi.

#### 6.4 Endositoz Sinyal Yolağı

KKKA virüsü hücreye kaladrin ve dinamin-2 aracılı endositosis ile girmektedir. Hücre yüzeyindeki nükleolin reseptörüne bağlandıktan sonra endositik vesikül içinde hücre sitoplazmasına alınmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda sitoplazmada şekillenen fonksiyonel mikrotübüllerin de hücrede enfeksiyonun gelişmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (67–69). Diğer taraftan hücresel miR-146a'nın dendritic microtubule-associated protein 1B (MAP1B) translasyonu inhibe ettiği ve endositozisi baskıladığı ortaya konulmuştur (67). Bu noktadan hareketle, çalışmamızda miR-146a ifadesinin

azaldığının tespiti, duyarlı hücreler tarafından virüs alımının artmasına neden olabileceği şeklinde yorumlandı.



## 7. SONUÇ

Yapılan çalışma sonucunda Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalığının patogenezi aydınlatmada bir adım atılmıştır. Çalışma sonucunda miR-493, miR-451, miR-655 miR-146a ve miR-410 en başta olmak üzere Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalığı gelişiminde ve prognozunda yaklaşık 20 mikroRNA'nın rol oynayabileceği ortaya konuldu.

Bu mikroRNA'ların hedefledikleri aday genler ile yapılan analiz sonuçlarında ise TGF- $\beta$  sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, endositozis gibi virüs konakçı ilişkisine dair önemli ipuçları verecek yolların öne çıktığı gösterildi.



## KAYNAKLAR

1. Gentner B, Naldini L. Exploiting microRNA regulation for genetic engineering. *Tissue Antigens*. 01 Kasım 2012;80(5):393–403.
2. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 20 Şubat 2009;136(4):642–55.
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 23 Ocak 2009;136(2):215–33.
4. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, vd. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 24 Şubat 2000;403(6772):901–6.
5. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 26 Ekim 2001;294(5543):858–62.
6. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N Y N*. Aralık 2004;10(12):1957–66.
7. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, vd. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 13 Ekim 2004;23(20):4051–60.
8. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Şubat 2009;10(2):126–39.
9. Maniatakis E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*. 15 Aralık 2005;19(24):2979–90.
10. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Mol Cell*. 01 Eylül 2002;10(3):537–48.
11. Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:123–41.
12. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 23 Ocak 2009;136(2):215–33.

13. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* ubat 2005;3(3):e85.
14. Schnall-Levin M, Zhao Y, Perrimon N, Berger B. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 07 Eylül 2010;107(36):15751–6.
15. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* ubat 2010;11(2):113–27.
16. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:351–79.
17. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, vd. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 17 Şubat 2005;433(7027):769–73.
18. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, vd. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 29 Haziran 2007;129(7):1401–14.
19. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Ağustos 2014;15(8):509–24.
20. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell.* 24 Ekim 2008;32(2):276–84.
21. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S, Baba T, vd. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* 15 Şubat 2009;23(4):433–8.
22. Roberts APE, Lewis AP, Jopling CL. The role of microRNAs in viral infection. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011;102:101–39.
23. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell.* 24 Şubat 2006;124(4):729–40.
24. Greber UF, Puntener D. DNA-tumor virus entry--from plasma membrane to the nucleus. *Semin Cell Dev Biol.* Temmuz 2009;20(5):631–42.
25. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* Aralık 2009;276(24):7228–36.
26. Boehmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:347–84.



27. Engelhardt OG, Fodor E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev Med Virol.* Ekim 2006;16(5):329–45.
28. Fields Virology (Knipe, Fields Virology)-2 Volume Set. Sixth, 2-volume set edition. Philadelphia, PA: LWW; 2013. 2664 s.
29. Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, vd. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol.* Şubat 2008;82(4):1946–58.
30. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell.* 09 Ocak 2009;136(1):26–36.
31. Wang X, Wang H-K, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, vd. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA N Y N.* Nisan 2009;15(4):637–47.
32. Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene.* 17 Nisan 2008;27(18):2575–82.
33. Wang F-Z, Weber F, Croce C, Liu C-G, Liao X, Pellett PE. Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication. *J Virol.* Eylül 2008;82(18):9065–74.
34. Ingle H, Kumar S, Raut AA, Mishra A, Kulkarni DD, Kameyama T, vd. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. *Sci Signal.* 08 Aralık 2015;8(406):ra126–ra126.
35. Huang L, Ma J, Sun Y, Lv Y, Lin W, Liu M, vd. Altered splenic miRNA expression profile in H1N1 swine influenza. *Arch Virol.* Nisan 2015;160(4):979–85.
36. Zhao F-R, Su S, Zhou D-H, Zhou P, Xu T-C, Zhang L-Q, vd. Comparative analysis of microRNAs from the lungs and trachea of dogs (*Canis familiaris*) infected with canine influenza virus. *Infect Genet Evol.* Ocak 2014;21:367–74.
37. Li Z, Zhang J, Su J, Liu Y, Guo J, Zhang Y, vd. MicroRNAs in the immune organs of chickens and ducks indicate divergence of immunity against H5N1 avian influenza. *FEBS Lett.* 13 Şubat 2015;589(4):419–25.

38. Triboulet R, Mari B, Lin Y-L, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, vd. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*. 16 Mart 2007;315(5818):1579–82.
39. Andersson MG, Haasnoot PCJ, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjärvi G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol*. Ağustos 2005;79(15):9556–65.
40. Xu N, Segerman B, Zhou X, Akusjärvi G. Adenovirus virus-associated RNAI-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes. *J Virol*. Ekim 2007;81(19):10540–9.
41. Umbach JL, Cullen BR. In-depth analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA expression provides insights into the mammalian microRNA-processing machinery. *J Virol*. Ocak 2010;84(2):695–703.
42. Buck AH, Perot J, Chisholm MA, Kumar DS, Tuddenham L, Cognat V, vd. Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA N Y N*. Şubat 2010;16(2):307–15.
43. 2004-Crimean-Congo\_hemorrhagic\_fever..pdf.
44. Ergonul O. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol*. Nisan 2012;2(2):215–20.
45. Kraus AA, Mirazimi A. Molecular biology and pathogenesis of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *Future Virol*. 01 Temmuz 2010;5(4):469–79.
46. Carter SD, Surtees R, Walter CT, Ariza A, Bergeron É, Nichol ST, vd. Structure, Function, and Evolution of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleocapsid Protein. *J Virol*. 15 Ekim 2012;86(20):10914–23.
47. Altamura LA, Bertolotti-Ciarlet A, Teigler J, Paragas J, Schmaljohn CS, Doms RW. Identification of a Novel C-Terminal Cleavage of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus PreGN That Leads to Generation of an NSM Protein. *J Virol*. Haziran 2007;81(12):6632–42.
48. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology*. 30 Mart 2004;321(1):29–35.
49. Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Kikkert M, Taylor SL, Bridgen A, Paragas J, vd. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe*. 13 Aralık 2007;2(6):404–16.

50. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, Nichol ST. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Precursor Is Cleaved by Furin-Like and SKI-1 Proteases To Generate a Novel 38-Kilodalton Glycoprotein. *J Virol.* 01 Ocak 2006;80(1):514–25.
51. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Virol.* 15 Temmuz 2002;76(14):7263–75.
52. Simon M, Johansson C, Mirazimi A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *J Gen Virol.* 01 Ocak 2009;90(1):210–5.
53. Simon M, Johansson C, Lundkvist Å, Mirazimi A. Microtubule-dependent and microtubule-independent steps in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication cycle. *Virology.* 15 Mart 2009;385(2):313–22.
54. Garcin D, Lezzi M, Dobbs M, Elliott RM, Schmaljohn C, Kang CY, vd. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J Virol.* Eylül 1995;69(9):5754–62.
55. Chen H-C, Hofman FM, Kung JT, Lin Y-D, Wu-Hsieh BA. Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue Virus-Induced Hemorrhage. *J Virol.* Haziran 2007;81(11):5518–26.
56. Papa A, Tsergouli K, Çağlayık DY, Bino S, Como N, Uyar Y, vd. Cytokines as biomarkers of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 01 Ocak 2016;88(1):21–7.
57. Gu Y, Cheng Y, Song Y, Zhang Z, Deng M, Wang C, vd. MicroRNA-493 Suppresses Tumor Growth, Invasion and Metastasis of Lung Cancer by Regulating E2F1. *PLoS ONE* [Internet]. 08 Ağustos 2014 [kaynak 01 Ekim 2015];9(8). Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126682/>
58. Sakai H, Sato A, Aihara Y, Ikarashi Y, Midorikawa Y, Kracht M, vd. MKK7 mediates miR-493-dependent suppression of liver metastasis of colon cancer cells. *Cancer Sci.* 01 Nisan 2014;105(4):425–30.
59. Effect of Differentially Expressed MicroRNAs 602 and 323-5p on Hepatitis C Virus Genotype 1b Viral Load in Infected Liver Cells - effect-of-differentially-expressed-micromnas-and-p-on-hepatitis-c-virus-genotype-b-viral-load-in-infected-liver-cells-

- 2332-0877.1000138.pdf [Internet]. [kaynak 04 Ekim 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.esciencecentral.org/journals/effect-of-differentially-expressed-micrnas-and-p-on-hepatitis-c-virus-genotype-b-viral-load-in-infected-liver-cells-2332-0877.1000138.pdf>
60. Kitamura K, Seike M, Okano T, Matsuda K, Miyanaga A, Mizutani H, vd. MiR-134/487b/655 Cluster Regulates TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Drug Resistance to Gefitinib by Targeting MAGI2 in Lung Adenocarcinoma Cells. *Mol Cancer Ther.* 02 Ocak 2014;13(2):444–53.
  61. Rosenberger CM, Podyminogin RL, Navarro G, Zhao G-W, Askovich PS, Weiss MJ, vd. miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 Aralık 2012;189(12):5965–75.
  62. Yu D, Santos CO dos, Zhao G, Jiang J, Amigo JD, Khandros E, vd. miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3 $\zeta$ . *Genes Dev.* 08 Ocak 2010;24(15):1620–33.
  63. Pepini T, Gorbunova EE, Gavrillovskaia IN, Mackow JE, Mackow ER. Andes Virus Regulation of Cellular MicroRNAs Contributes to Hantavirus-Induced Endothelial Cell Permeability. *J Virol.* 15 Kasım 2010;84(22):11929–36.
  64. Hennessy E, Clynes M, Jeppesen PB, O'Driscoll L. Identification of microRNAs with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 28 Mayıs 2010;396(2):457–62.
  65. Gong J, Shen X, Chen C, Qiu H, Yang R. Down-regulation of HIV-1 infection by inhibition of the MAPK signaling pathway. *Virol Sin.* 07 Nisan 2011;26(2):114–22.
  66. Baril M, Es-Saad S, Chatel-Chaix L, Fink K, Pham T, Raymond V-A, vd. Genome-wide RNAi screen reveals a new role of a WNT/CTNNB1 signaling pathway as negative regulator of virus-induced innate immune responses. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003416.
  67. Chen Y-L, Shen C-KJ. Modulation of mGluR-Dependent MAP1B Translation and AMPA Receptor Endocytosis by MicroRNA miR-146a-5p. *J Neurosci.* 22 Mayıs 2013;33(21):9013–20.
  68. Shtanko O, Nikitina RA, Altuntas CZ, Chepurnov AA, Davey RA. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Entry into Host Cells Occurs through the Multivesicular Body and Requires ESCRT Regulators. *PLoS Pathog.* 18 Eylül 2014;10(9):e1004390.

69. Garrison AR, Radoshitzky SR, Kota KP, Pegoraro G, Ruthel G, Kuhn JH, vd. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin- and early endosome-dependent entry pathway. *Virology*. Eylül 2013;444(1-2):45–54.



## 8. EKLER



## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Zekiye Cemre DEMİR

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 06.03.1988

**Medeni Hali:** Bekar

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** Mardin Anadolu Lisesi(2002-2006)

**Lisans:** İ.D. Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (2006-2011)

### **İş Tecrübesi**

**Kurumu:** Acıbadem Sağlık Grubu

'TÜRKÖK Projesi/Ulusal Kemik İliği Bankası Oluşturulması'

**Görevi:** Moleküler Biyolog

**Yılları:** 20014-Halen

## 10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

### XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi

#### Akut Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalarında mikroRNA ifadelerinin analizi

Zekiye Cemre Demir<sup>1</sup>, Hürrem Bodur<sup>2</sup>, Aliye Baştuğ<sup>3</sup>, Aykut Özkul<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

<sup>2</sup>Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara;  
Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Kars

<sup>3</sup>Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Ana Bilim Dalı, Ankara

<b>Statü</b>	: Kabul:Sözlü
<b>Tercih Edilen Sunuş Şekli</b>	: Sözlü Sunum
<b>Bildiri Grubu</b>	: Hücre Biyolojisi
<b>Dili</b>	: Türkçe-İngilizce
<b>Saved:</b>	: 06.09.2015 22:27:54
<b>Submit:</b>	: 07.09.2015 22:25:24

#### Yazar ve Editöre Özel Bilgiler

**Sunan Yazar** : Zekiye Cemre Demir (cemre.demir18@gmail.com)