

BURCU BAYYURT

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŐI HASTALARINDA HULC VE 7SL
RNA İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

CÜSBE

SİVAS

2017



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALARINDA HULC VE 7SL RNA
İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BURCU BAYYURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS-2017

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALARINDA HULC VE 7SL RNA
İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BURCU BAYYURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SERDAL ARSLAN

SİVAS-2017

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

ÖZET

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALARINDA HULC VE 7SL RNA İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Burcu BAYYURT

Yüksek Lisans Tezi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serdal ARSLAN

2017, 54 sayfa

Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA), Kırım Kongo kanamalı ateş virüsünün (KKKAV) neden olduğu kene kaynaklı bir hastalıktır. Uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA'lar) genellikle 200 nükleotitten daha uzun transkriptler olarak sınıflandırılırlar. Viral enfeksiyonlar lncRNA'lar da dahil olmak üzere hücre transkriptomunda güçlü değişiklikler meydana getirmektedirler. Enfekte olmuş hücrelerde ifade olan çeşitli lncRNA'lar viral ve konak genlerinin ekspresyonunu düzenlemede görev almaktadırlar. Son yıllarda, bazı lncRNA'ların terapötik hedefler ve hastalığın ilerlemesinde prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma KKKA hastalarında HULC ve 7SL RNA ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu amaçla, 100 bireyin (60 hasta ve 40 kontrol) kan örnekleri alındı ve total RNA izolasyonu yapıldı. Çalışma popülasyonunda HULC ve 7SL RNA ekspresyon düzeylerini belirlemek için SYBR Green yöntemi kullanılarak kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) gerçekleştirildi.

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, hastalarda HULC ekspresyon seviyesinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.04$). 7SL RNA ifadesinin hastalarda 1.88 kat azaldığı ($p=0.93$) gözlemlendi. Ayrıca hastalarla karşılaştırıldığında ölenlerde HULC'un ifadesinin 100 kat arttığı ($p<0.01$) ve 7SL RNA'nın ifadesinin ise azaldığı (1.04 kat, $p=0.03$) tespit edildi. Bunlara ek olarak uluslararası normalize edilmiş oran (INR) ve protrombin zamanı (PT) normal değerlerin üzerinde olan hastalarla normal değerler arasında olanlar karşılaştırıldığında INR ve PT'si normal değerlerin üzerinde olanlarda HULC ifadesinin 3 kat artması istatistiksel olarak önemli bulundu ($p=0.01$ ve $p=0.02$, sırasıyla). Klinik parametreleri normalin üzerinde olan ölmüş ve hayatta kalan hastalar karşılaştırıldığında ölmüş bireylerde HULC ifadesi artmıştır. HULC; aspartat aminotransferazı (AST) yüksek olanlarda 90 kat ($p<0.01$), alanin aminotransferazı (ALT) yüksek olanlarda 80 kat ($p<0.01$), PT'si yüksek olanlarda 165 kat ($p=0.01$), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) yüksek olanlarda 131 kat ($p<0.01$) ve laktat dehidrogenazı (LDH) yüksek olanlarla da 97 kat ($p<0.01$) artmıştır. Bulgularımız HULC ve 7SL RNA'nın KKKA hastalığının patogenezinde önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kırım Kongo kanamalı ateşi, uzun kodlamayan RNA'lar, gen ifadesi

ABSTRACT

EVALUATION OF HULC AND 7SL RNA EXPRESSION LEVELS IN PATIENTS WITH CRIMEAN CONGO HEMORRHAGIC FEVER

Burcu BAYYURT

MSc Thesis

Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Serdal ARSLAN

2017, 54 pages

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne disease caused by the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV). Long non-coding (lncRNAs) are generally classified as transcripts longer than 200 nucleotides. Viral infections cause strong changes in cell transcriptomics, including lncRNAs. The various lncRNAs expressed in infected cells are responsible for regulating the expression of viral and host genes. In recent years, it has been thought that some lncRNAs may be used as therapeutic targets and prognostic markers in the progress of disease. This is the first study to investigate HULC and 7SL RNA expression levels in CCHF patients. For this purpose, blood samples were taken from 100 individuals (60 patients and 40 controls) and total RNA isolation was performed. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using the SYBR Green method to determine HULC and 7SL RNA expression levels in the study population.

When the patient and control groups were compared, the increase in HULC expression level in the patients was statistically significant ($p=0.04$). 7SL RNA expression was decreased 1.88 times ($p=0.93$) in patients. It was also found that the expression of HULC was increased 100 fold ($p<0.01$) and 7SL RNA was decreased (1.04 fold, $p=0.03$) in fatal cases when compared to patients. In addition, HULC was increased 3 fold in patients who have higher international normalized ratio (INR) and prothrombin time (PT) values compared with patients with normal values and these were found statistically significant ($p=0.01$ and $p=0.02$, respectively). HULC was increased in the fatal cases with higher clinical parameters compared with patients with higher values. HULC expression in fatal cases with higher aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), PT, active partial thromboplastin time (aPTT), and lactate dehydrogenase (LDH) increased 90 ($p<0.01$), 80 ($p<0.01$), 165 ($p=0.01$), 131 ($p<0.01$) and 97 fold ($p<0.01$), respectively. Our findings show that HULC and 7SL RNA are important in the pathogenesis of CCHF disease.

Keywords: Crimean Congo hemorrhagic fever, long non-coding RNAs, gene expression

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen ve beni teşvik eden, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Serdal ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince desteğini aldığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı kıymetli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI'na, Sayın Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÇETİN'e ve Sayın Arş. Gör. Dr. Gonca DÖNMEZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında kullandığım kan örneklerinin temin edilmesinde emeği geçen Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mehmet BAKIR'a, Sayın Doç. Dr. Aynur ENGİN'e ve asistanlarına,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen ve görüşlerinden yararlandığım Sayın Arş. Gör. Nil ÖZBİLÜM ŞAHİN'e, laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım; Sayın Aslıhan Esra BİLDİRİCİ, Arzu ÖZCAN ve Nazım ESERYEL'e ve ismini burada saymadığım birçok öğretim üyesine ve arkadaşşıma teşekkürlerimi sunarım.

Sadece bu süreçte değil, hayatım boyunca her zaman her koşulda yanımda olan ve benim için her şeyden kıymetli olan aileme çok teşekkür ederim.

Burcu BAYYURT

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-683

İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
TEŞEKKÜR	VI
TABLolar DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi	2
2.1.1. KKKA'nın Tarihsel Gelişimi	2
2.1.2. KKKA'nın Epidemiyolojisi	4
2.1.3. KKKA'nın Patogenezi	5
2.1.4. KKKA'da Klinik ve Tedavi	7
2.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü	9
2.3. Kodlama Yapmayan RNA'lar	11
2.3.1. Uzun Kodlama Yapmayan RNA'lar	12
2.4. Viral Enfeksiyonlarda Uzun Kodlama Yapmayan RNA'lar	14
2.4.1. Hücresel Uzun Kodlama Yapmayan RNA'ların Virüsle Enfekte Olmuş Hücrelerde Çalışma Mekanizmaları	15
2.4.2. Virüsle Enfekte Olmuş Hücrelerde Viral Uzun Kodlama Yapmayan RNA'lar	16
2.4.3. Antiviral Cevabın Düzenlenmesinde lncRNA'lar	17
2.4.4. Hücresel ve Viral lncRNA'larla Gen İfadesinin Düzenlenmesi	19
2.4.5. HULC	20
2.4.6. 7SL RNA	22
3. MATERYAL-METOT	24
3.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	24
3.2. RNA İzolasyonu	24
3.3. RNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Belirlenmesi	25
3.4. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi	25

3.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	27
3.6. İstatistiksel Analiz	28
4.BULGULAR	29
5.TARTIŞMA-SONUÇ	35
6.KAYNAKLAR	39
İZİNLER	48
ÖZGEÇMİŞ	54



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu.....	26
Tablo 2. Ters transkripsiyon reaksiyonu	26
Tablo 3. qPCR bileşenleri	28
Tablo 4. qPCR reaksiyon koşulları	28
Tablo 5. Hasta grubuna ait demografik ve klinik veriler	29
Tablo 6. Hasta-kontrol, ölen-hayatta kalan ve ölen-kontrol gruplarında HULC ve 7SL RNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 7. KKKA hastalarında klinik parametreleri yüksek olan bireyler ile normal olan bireylerde HULC ve 7SL RNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	33
Tablo 8. Klinik parametreleri normal değer üzerindeki ölmüş bireylerle enfekte olmuş hayatta kalan bireylerde HULC ve 7SL RNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2002-2013 KKKA hastalarının mortalite hızları	3
Şekil 2: KKKA'nın dünyadaki dağılımı.....	4
Şekil 3: KKKA hastalığının Türkiye'deki dağılımı	5
Şekil 4: KKKA'nın klinik seyri.....	8
Şekil 5: KKKA virionunun şematik gösterimi	9
Şekil 6: KKKA'nın hücre içi replikasyon döngüsü.....	11
Şekil 7: ncRNA'ların sınıflandırılması.....	12
Şekil 8: lncRNA'ların sınıflandırılması	14
Şekil 9: Antiviral yolağı düzenleyen bazı lncRNA'lar	19
Şekil 10: HULC'un genomik yerleşimi.....	21
Şekil 11: HULC'un upregülasyon mekanizması.....	22
Şekil 12: 7SL RNA dizisi	22
Şekil 13: 7SL RNA ve A3G'nin antiviral mekanizması	23
Şekil 14: HULC'a ait amplifikasyon ve tm eğrisi	30
Şekil 15: 7SL RNA'ya ait amplifikasyon ve tm eğrisi.....	30
Şekil 16: HULC, 7SL RNA ve SF3A1'e ait amplifikasyon ve tm eğrileri	31
Şekil 17: HULC ve 7SL RNA genlerinin hasta grubundaki kat değişimleri	31
Şekil 18: KKKA'dan dolayı ölen ve hayatta kalan hasta bireylere ait clustergram.....	32

KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	Alanin aminotransferaz
aPTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
AST	Aspartat aminotransferaz
BSPR	İnterferon ile uyarılan pozitif regülatör
BST2	Kemik iliği hücre antijeni 2
CMP	Sitidin monofosfat
CMPK	Sitidin monofosfat kinaz
CPK	Kreatin fosfokinaz
CREB	Siklik adenozin monofosfat cevap elementine bağlanan protein
cRNA	Tamamlayıcı RNA
DIC	Yaygın damar içi pıhtılaşma
EBER	<i>Epstein-Barr</i> virüsünün kodladığı küçük RNA
EBV	<i>Epstein-Barr</i> virüsü
ECDC	Avrupa Hastalıktan Korunma ve Kontrol Merkezi
eIF2a	Ökaryotik translasyon başlama faktörü 2a
ER	Endoplazmik retikulum
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
HIV	İnsan bağışıklık yetersizliği virüsü
HSV-1	Herpes simplex virüs tip 1
ICAM-1	Hücrelerarası adezyon molekülü-1
IFITM3	İnterferon indüklü transmembran protein 3
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin

IL7R	İnterlökin 7 reseptörü
INR	Uluslararası normalize edilmiş oran
IRF	İnterferon (IFN) düzenleme faktörü
ISG	IFN vasıtasıyla düzenlenen gen
KKA	Kırım kanamalı ateşi
KKKA	Kırım Kongo kanamalı ateşi
KKKAV	Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü
KSHV	Kaposi sarkomu ile ilişkili <i>Herpesvirus</i>
LAT	Latensi ile ilişkili transkript
LDH	Laktat dehidrogenaz
lincRNA-COX2	Genler arası uzun kodlama yapmayan RNA-siklooksijenaz 2
lncRNA	Uzun kodlama yapmayan RNA
MAVS	Mitokondriyal antiviral sinyal proteini
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
MxA	Tip I interferonlarla muamele edilen hücrelerde aktive edilen hücre protein
NEAT1	Çekirdekte bol bulunan zenginleştirilmiş transkript1
Nef	Negatif düzenleyici faktör
NFAT	Aktive edilmiş T hücreleri nükleer faktörü
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NRAV	Antiviral cevabın negatif düzenleyicisi
NRIR	İnterferon cevabının negatif düzenleyicisi
NRON	Aktive edilmiş T hücreleri nükleer faktörünün kodlama yapmayan baskılayıcısı
Nt	Nükleotid

PAMP	Patojenle ilişkili moleküler modeller
PAN RNA	Poliadenillenmiş nükleer RNA
PKR	Protein kinaz R
PT	Protrombin zamanı
RbRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RIG-I	Retinoik asitle indüklenebilir gen I
RNA	Ribonükleik asit
sfRNA	Subgenomik <i>Flavivirus</i> RNA
sICAM-1	Hücrelerarası çözünür adezyon molekülü-1
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
sVCAM-1	Vasküler hücre çözünür adezyon molekülü-1
TES	Tris EDTA borik asit
TLR	Toll benzeri reseptör
TNFα	Tümör nekroz faktör α
TRIM25	E3 ubikülin ligaz
UTR	Translasyonu olmayan bölge
VA RNA	Virüsle-ilişkili RNA
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VKA	Viral kanamalı ateş
Vpu	Benzersiz viral protein
vRNA	Viral RNA
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), özellikle Türkiye başta olmak üzere dünyada en yaygın görülen ve ölüme sebep olabilen arboviral hastalıklardan biridir (Messina ve ark., 2015). Ülkemizde bugüne kadar saptanan ilk viral kanamalı ateş olan KKKA zoonotik bir enfeksiyondur (Hoogstraal, 1979).

KKKA'nın etkeni Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü (KKKAV)'dür. Bu virüsün replikasyonu ile immün ve vasküler sistem oldukça zarar görmektedir. Kanama ve ateş bulguları ile seyreden KKKA, ülkemizde 2002 yılından itibaren önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir.

KKKA hastalığının klinik seyri bireylere bağlı olarak değişmektedir. Bu durum birçok viral enfeksiyonun patogeneğinde rol oynayan epigenetiksel farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Nitekim epigenetik mekanizmalardan uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA)'ların virüs konak ilişkisinde ve virüs patogeneğinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna dayanarak KKKA ile lncRNA'lar arasındaki herhangi bir ilişkinin bulunması halinde bu durumun hastalığın seyrine ve hatta tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar getireceği ümit edilmektedir. KKKA hastalığı son yıllarda özellikle sonbahar ve yaz aylarında Orta Anadolu bölgesinde önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Tedaviye yönelik stratejiler geliştirmek hem bölge halkının hastalıktan korunabilmesi açısından hem de ülkemiz için ekonomik bakımdan önemli katkılar sağlayacaktır.

1.2. Araştırmanın Amacı

KKKA için bazı tedavi yöntemleri olsa da ileri düzeyde bir gelişme sağlanamamıştır. Son yıllarda elde edilen verilerle lncRNA'ların virüs replikasyonunda ve antiviral cevapta önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. LncRNA'ların hastalık ilerlemesinde prognostik belirteçler olarak kullanılabilecekleri ve tedaviye yönelik hedefler olabilecekleri düşünülmektedir. Bu çalışmada KKKA tanısı konmuş hastalar ile bu hastalığı taşımayan ve herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayan sağlıklı bireylerde HULC ve 7SL RNA seviyesine bakılacaktır. KKKA hastalığı ile HULC ve 7SL RNA ilişkisinin incelendiği ilk çalışma olması yönünden de önemlidir. Ayrıca KKKA'dan ölenler ve hayatta kalanlar, ölenler ve sağlıklı bireylerde, klinik parametreleri normal ve

normalin üzerinde olan hastalar ile klinik parametreleri normalin üzerinde olan ölmüş ve yaşayan hastalarda HULC ve 7SL RNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması amaçlarımız arasındadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

Dünyada farklı bölgelerde ve yeni görülen enfeksiyonlar olarak değerlendirilen viral kanamalı ateş (VKA) enfeksiyonları insanlarda farklı virüsler tarafından oluşturulan, ateş ve kanama ile seyreden klinik sendromlardır. VKA'lar içinde dünyada en yaygın olarak görüleni ise KKKA'dır (Akın, 2008). KKKA, geniş coğrafi alanlar boyunca insanlarda ağır salgınlara sebep olan kene kaynaklı viral bir hastalıktır (Bente ve ark., 2013). Hastalığın yayılım alanı Batı Çin'den başlayıp Orta Doğu ve Güneydoğu Avrupa ile Afrika boyunca devam etmektedir. Türkiye'deki görülme sıklığı ise özellikle son on yılda artmış olmakla beraber, KKKA ülkemizde ilk kez 2002 yılında tespit edilmiştir (Leblebicioğlu ve ark., 2016).

KKKA'nın etkeni KKKAV'dir ve bu virüs özellikle sert keneler vasıtasıyla hayvanlara yayılır ve hastalık belirtisi vermeden viremiye sebep olmaktadır. İnsanlara ise kene ısırması ya da enfekte hayvan ve insanların kan, doku ve vücut sıvıları ile temas sonucu bulaşmaktadır (Buttigieg ve ark., 2014).

Başlangıç bulguları grip benzeri olan hastalığın ileri dereceli olgularında vücudun çeşitli bölgelerinde kanama meydana gelmektedir. Günümüzde ileri düzeyde tıbbi bakım ve tedavi uygulamaları olmasına rağmen bu enfeksiyon önemli oranda ölümlerle sonuçlanmaktadır (Akın, 2008). Dünya'da değişik ülkelerde ortalama ölüm hızı %5 ile %50 arasında değişen hastalığın tedavisinde ise genel destekleyici önlemler ilk sırada yer almak üzere ribavirin ve interferon kullanılmaktadır (Ergönül, 2008).

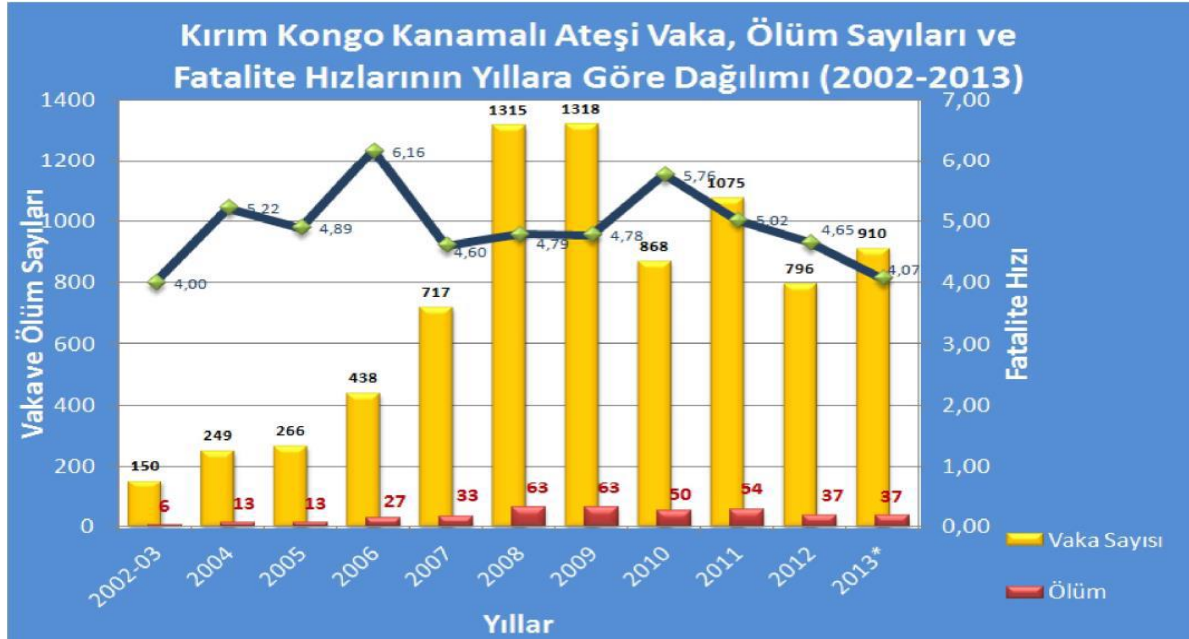
2.1.1. KKKA'nın Tarihsel Gelişimi

İlk kez 12. yy'da Orta Asya'da (şimdiki Tacikistan) tanımlanan KKKA, idrar, dışkı, dişetleri, balgam, kusuk ve karın boşluğunda kanama ile karakterize edilen bir sendromdur (Hoogstraal, 1979). Hastalığa neden olan artropodun küçük, sert olduğu ve bite benzediği bildirilmiştir. Modern dönemde ise KKKA klinik olarak ilk kez 1944-

1945 yıllarında Kırım'da Nazi işgalinden yeni kurtulan köylülere yardım eden 200 Sovyet askerinde görülmüştür (Watts ve ark., 1988).

Hastalığa sebep olan virüs, enfekte hastalardan alınan kanın farelere intraserebral inokülasyonu sonucu izole edilmiştir (Ergönül ve Whitehouse, 2007). Hastalık ilk kez Kırım'da ortaya çıkıp kanama ve ateşle seyrettiği için Kırım kanamalı ateşi (KKA) olarak tanımlanmıştır. KKA virüsü 1956'da Belçika Kongosu'nda (Zaire) ateşli bir hastadan izole edilen Kongo virüsünden antijenik olarak ayırt edilememiştir (Simpson ve ark., 1967). Böylece Avrasya (Casals, 1969), Asya ve Afrika (Woodall ve ark., 1967) suşlarının ortak antijenik yapısından dolayı virüs KKA-Kongo, daha sonra ise KKKA adını almıştır (Hoogstraal, 1979).

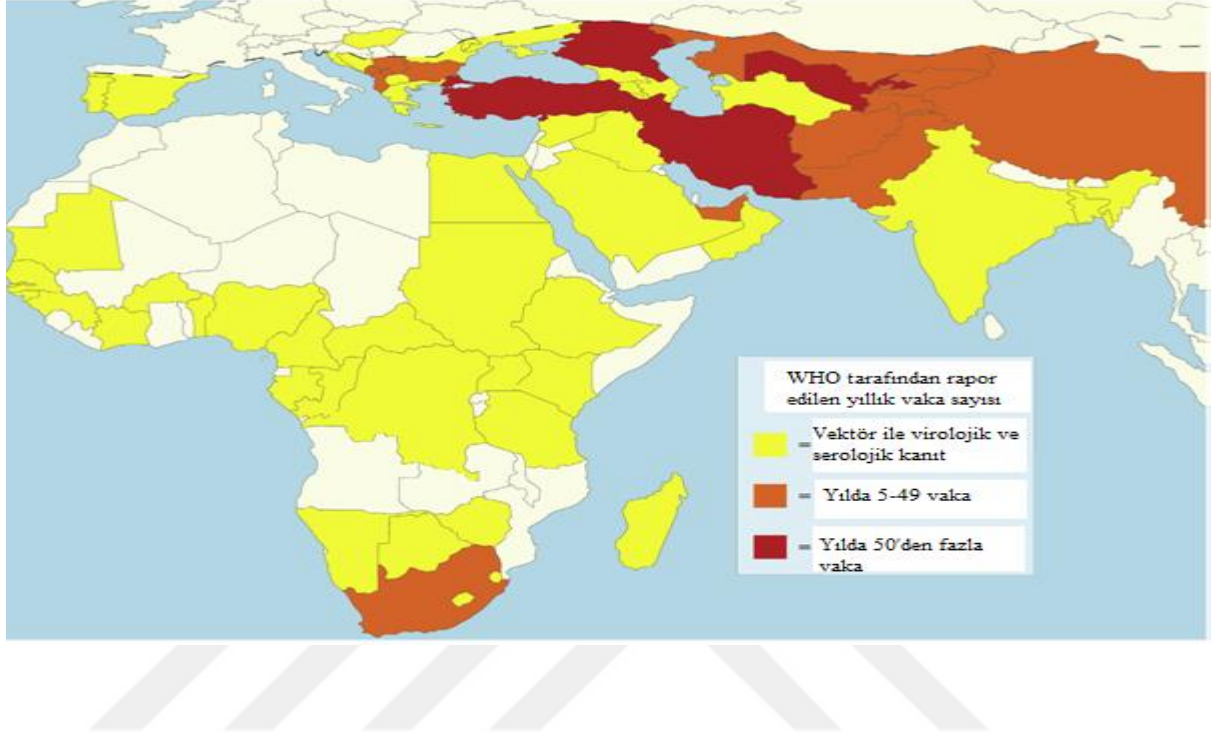
1970'lerden önce çok sayıda olgu Sovyetler Birliği, Bulgaristan ve Zaire'den bildirilmiştir. 1970 ve 2000 yılları arasında Güney Afrika Cumhuriyeti, Burkina Faso, Kongo, Moritanya, Tanzanya, Senegal, Çin ve Orta Doğu ülkelerinde önemli sayıda olgu bildirilmiştir. 2000 yılından itibaren Arnavutluk, Bulgaristan, Senegal, İran, Pakistan, Yugoslavya, Yunanistan ve Türkiye'de yeni salgınlar ve sporadik olgular ortaya çıkmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarda KKKAV'nin Romanya ve Yunanistan dışında Balkan Yarımadası'nda endemik olduğu vurgulanmıştır (Ergönül ve Whitehouse 2007).



Şekil 1: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2002-2013 KKA hastalarının mortalite hızları (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. 2013 raporları)

2.1.2. KKKA'nın Epidemiyolojisi

KKKA, 30'un üzerinde ülkede görülen ve keneye bulaşan hastalıklar içinde en yaygın coğrafi dağılımı gösteren öldürücü bir hastalıktır (Ergönül, 2009). Hastalığın Asya-Avrupa-Afrika ile sınırlı olan dağılımı Şekil 2'de gösterilmiştir.

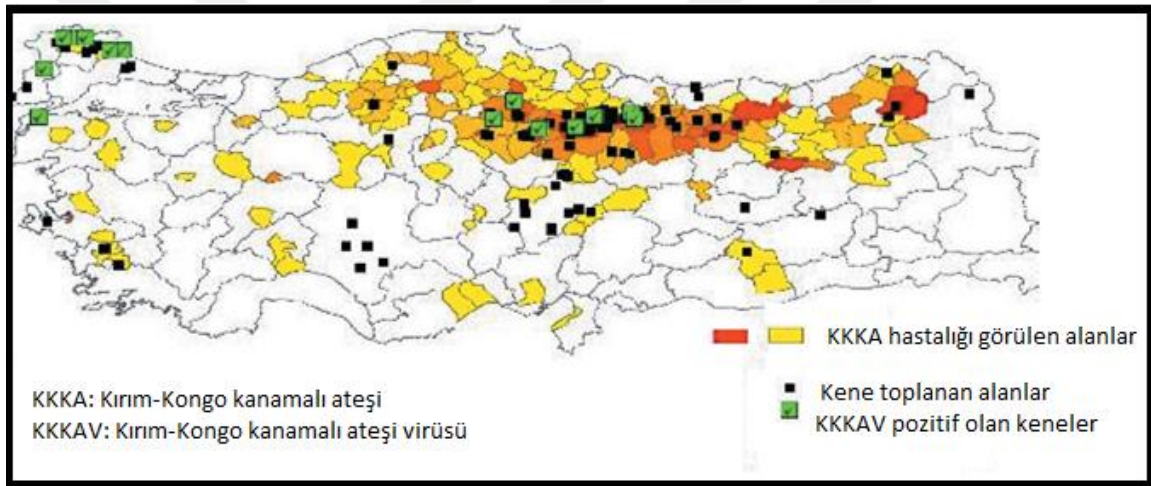


Şekil 2: KKKA'nın dünyadaki dağılımı (Bente ve ark., 2013)

Türkiye'de ise 2002 yılına kadar herhangi bir KKKA olgusu bildirilmemiştir. 2003'teki bölgesel salgının ardından, laboratuvarda doğrulanması sonucu hastalığın KKKA olduğu tespit edilmiştir (Karti ve ark., 2004). 2003 yılından sonra ise ülkemizde birçok KKKA salgını bildirilmiştir. Klinik ve laboratuvar bulguları olan ilk olgular Orta Anadolu-Karadeniz Bölgesi'nden bildirilmiştir. Hastalığın belirli bir bölgeyle sınırlı olması iklim, coğrafi koşullar, hayvancılık sektörü ve kenelerle temas eden insan sayısı gibi çeşitli faktörlerle ilişkilendirilmiştir (Papa ve ark., 2015). Hastalığın Türkiye'deki dağılımı Şekil 3'te detaylı bir şekilde gösterilmiştir. KKKAV, enfekte kenelerin ısırması, viremik hayvan ya da insanlara ait kan, doku ya da vücut sıvıları ile temas sonucu bulaşmaktadır (Capua, 1998).

Yapılan çalışmalarda hastalığın kene ısırığı öyküsünün diğer bulaşma yollarına oranla daha fazla olduğu belirtilmiştir (Van de Wal ve ark., 1985). Keneler hastalığın doğadaki rezervuarı olmakla birlikte; KKKAV, kenelerde nesiller boyu kalmakta ve

çoğalabilmektedir (Akın, 2008). Yukarıda adı geçen kenelerin *Hyalomma* cinsine ait olduğu ifade edilerek (Bente ve ark. 2013) Türkiye’deki salgınların ise hastalığın yaygın olduğu bölgelerdeki en baskın tür olan *Hyalomma marginatum* ile bulaştığı belirlenmiştir (Akın, 2008). Evcil hayvanlardan toplanan kenelerin yaklaşık %47’sinin *Rhipicephalus bursa*; %46’sının ise *H. marginatum* olduğu tespit edilerek KKKAV’nin %9.09 oranında *R. bursa*; %3.22 oranında ise *H. marginatum* türlerinden izole edildiği ve hastalığın bulaşmasında bu iki türün önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. KKKAV’nin özellikle kırsal alanda yaşayan ve tarım ile hayvancılık sektöründe aktif olarak çalışan grupta yaygın olduğu vurgulanmıştır. Hastalığın mart ve ekim ayları arasında meydana geldiği, vakaların yaklaşık %60’ının haziran ve temmuz aylarında rapor edildiği belirtilmiştir (Papa ve ark., 2015).



Şekil 3: KKKA hastalığının Türkiye’deki dağılımı (Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü)

2.1.3. KKKA’nın Patogenezi

Son yıllarda VKA’lar üzerine yapılan araştırma sayısı artmasına rağmen bireyler arasında patogenezdaki farklılık mekanizması açıklanamamaktadır (Bayar, 2015) VKA’ların ortak özelliği ise antiviral yanıtı başlatan hücrelere saldırılması ve konağın bağışıklık yanıtının bozulmasıdır (Geisbert ve Jahrling, 2004). Nairoviruslar içinde en patojen olan virüsün KKKAV olduğu belirtilmiştir (Kırım Kongo Kanamalı Ateşte

Tedavi ve Korunma. Erişim: 17.01.2017. www.dicle.edu.tr/Contents/67ed41bc-9585-454e-8a38-1a582cb769a7.pdf). Virüs vücuda girdikten sonra lenf bezlerinde çoğalmakta ve lenf yoluyla başta endotel ve karaciğer olmak üzere vücuda yayılmaktadır (Türk Tabipleri Birliği Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, 2010. Erişim: 17.01.2017. https://www.ttb.org.tr/kutuphane/kirim_kongo_rpr.pdf). İnflamasyona sebep olan hücreler genelde mononükleer hücreler ve nötrofillerdir (Doğancı, 2007). Makrofajların ve endotel hücrelerin etkileşimi sonucu inflamatuvar süreç başlamakta ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) tablosu ortaya çıkmaktadır (Geisbert ve Jahrling, 2004). Hasar, virüs replikasyonu sonucu immün ve vasküler sistemin zarar görmesi ile gerçekleşmektedir (Schnittler ve Feldman, 2003).

KKKA'nın başlıca patolojik anormallikleri vasküler bozukluklarla ilgili olduğu için bu durum hemorajik belirtilere neden olmaktadır (Ergönül, 2006). Vasküler fonksiyon bozukluğunun virüsün endotel hücreleri üzerindeki doğrudan etkisinden mi yoksa dolaşımdaki inflamatuvar etkenlerden mi kaynaklandığı hala bilinmemektedir (Papa ve ark., 2015). Ayrıca Peters ve Zaki (2002), patogeneizde endotel enfeksiyonunun en önemli basamak olduğunu vurgulamıştır. Aynı çalışmada, endotelin iki türlü hedeflendiği, bunların da virüsün yönlendirdiği konak kökenli faktörlerin endotel işlev bozukluğuna yol açması ve/veya doğrudan virüsün endotel hücrelerinde çoğalması şeklinde olduğu bildirilmiştir. KKKA'nın önemli bulgularından birisinin de trombositopeni olduğu ve özellikle ölümcül seyreden hastalarda erken dönemde şiddetli trombositopeni gözlemlendiği belirtilmiştir (Bayar, 2015). Endotel hasarının trombosit agregasyonunu ve degranülasyonunu uyarmasıyla koagülasyon kaskadı aktive olmakta ve bu durum hemostatik yetmezliğe yol açmaktadır (Türk Tabipleri Birliği Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, 2010. Erişim: 18.01.2017. https://www.ttb.org.tr/kutuphane/kirim_kongo_rpr.pdf). Buna bağlı olarak hastalarda hemorajik bulgular ortaya çıkmaktadır. Koagülasyon bozukluğunun bir sonucu olarak KKKA'nın erken ve belirgin bulgularından olan yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC) meydana gelmektedir. Ölümle sonuçlanan olgularda hastalığın erken safhalarından başlayarak DIC'in gözlemlendiği bildirilmiştir (Ergönül ve ark., 2006). Aynı çalışmada inflamatuvar sitokinlerle DIC arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan araştırmalarda ölen hastalarda interlökin (IL)'lerden IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 ile TNF- α (Ergönül ve ark., 2006) ve IL-8 (Swanepoel ve ark., 1989) düzeylerinin hayatta kalan hastalara oranla daha fazla olduğu saptanmıştır. Monositlerden salınan bu

sitokinler pıhtılaşma yolağını aktive etmektedir. Sonuçta vasküler hasar ile damar içi pıhtılaşma şiddeti artmaktadır. KKKAV ile birçok yönden benzerlik gösteren Ebola virüsünün çalışıldığı deney hayvanları araştırmalarında, değişen endotel fonksiyonunun inflamatuvar sitokinler, platelet agregasyonu ve degranülasyonu, lökosit adhezyonu ve pıhtılaşma yolağı aktivasyonu gibi konak indüklü mekanizmalardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Mahanty ve Bray, 2004;).

Ayrıca son yıllarda Türkiye’de yapılan iki çalışmada hücrelerarası çözünür adezyon molekülü-1 (sICAM-1) ve vasküler hücre çözünür adezyon molekülü-1 (sVCAM-1) gibi vasküler aktivasyon serum biyobelirteçlerinin ölümcül hastalarda daha yüksek olmak üzere KKKAV hastalarında arttığı bulunmuştur (Öztürk ve ark., 2010; Bodur ve ark., 2010). Bir diğer çalışmada ise kültüre edilen insan endotel hücrelerinin KKKAV ile enfekte edilmesi sonucu bu hücrelerde ICAM-1 ve VCAM-1’in yüksek düzeyde ifade olduğu, IL-6 ve IL-8 salgısının arttığı gösterilmiştir (Connolly-Andersen ve ark., 2009). Ayrıca KKKAV, karaciğer fonksiyon bozukluğuna yol açtığı için (Taşdelen-Fışgın, 2014) hastalarda aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) artışı enfeksiyonun değişmez bulgularındandır (Swanepoel ve ark., 1989). Bunlara ek olarak yüksek laktat dehidrogenaz (LDH) (Akıncı ve ark., 2013), kreatin fosfokinaz (CPK), uluslararası normalize edilmiş oran (INR), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ve protrombin zamanı (PT) değerleri de ölümcül vakalar için risk faktörleri olarak değerlendirilmiştir.

2.1.4. KKKAV’da Klinik ve Tedavi

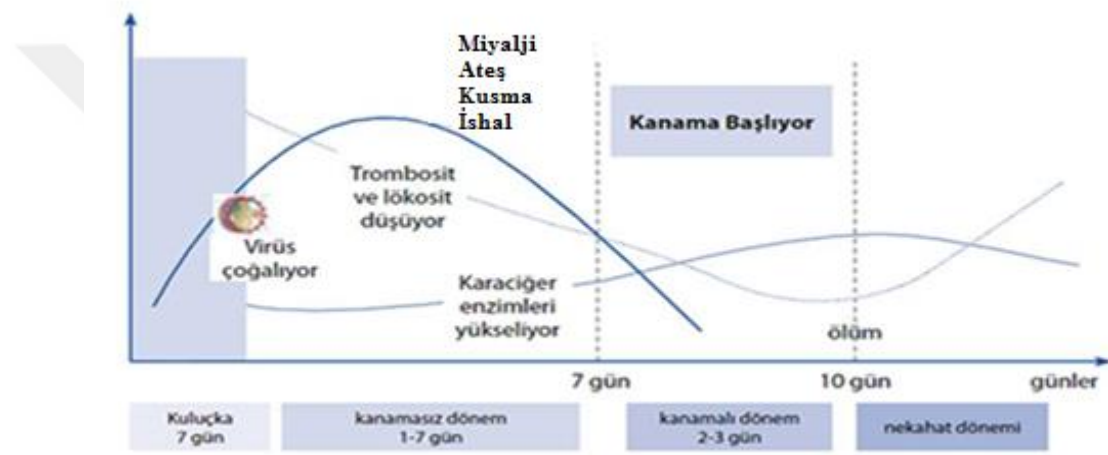
KKKAV’nın klinik semptomlarının belirlendiği tek konakçı insandır. Hastalığın seyri inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvalesan dönem olmak üzere dört bölümde tanımlanmaktadır (Hoogstraal, 1979).

İnkübasyon dönemi virüsün bulaşmasıyla hastalığın gelişmesi arasındaki süredir ve 3-7 gün olarak bildirilmiştir (Swanepoel, 1989). Bu süre viral yük ve enfeksiyonun edinilme yoluna bağlı olarak değişebilmektedir. Hastalarda genellikle kene ısırma öyküsü bulunmaktadır.

Prehemorajik dönemde grip benzeri bulgular görülmektedir. Ani ateş yükselmesi, baş ağrısı, kas ağrıları ve baş dönmesi ile karakterize bir evredir. Belirtilere ishal ve kusma da eşlik edebilir. Bu dönemin süresi 1-7 gündür (Bayar, 2015).

Hemorajik dönem hızlı gelişir ve kısadır (Ergönül, 2016). Kanama bulguları deri ve mukozalardaki peteşilerden ekimozlara kadar değişiklik göstermektedir. Burun, mide-bağırsak sistemi, ürogenital sistem ve solunum yolları kanamaları en çok görülen kanamalardır (Ergönül, 2006). Bazı vakalarda ise karaciğer ve dalak büyümesi bildirilmiştir.

Konvalesan dönemde, hafif ve orta dereceli klinik seyir gösteren hastalar iyileşme safhasına girmektedir. Tamamen iyileşme süreci ise birkaç haftayı almakta ve iyileşen olgularda bugüne kadar hastalık kalıntısı bildirilmemiştir. Ölümün ise çoğunlukla klinik bulguların 2. haftasında görüldüğü ve sebebinin ise çoklu organ yetmezliği olduğu ileri sürülmüştür (Çevik, 2004).



Şekil 4: KKKA'nın klinik seyri (Ergönül, 2006)

KKKA tedavisi ise genellikle destek tedavisi ve antiviral tedavi olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Destek tedavisinin hastalıkta esas tedavi olduğu belirtilmiştir. Bu tedavi trombosit, taze donmuş plazma ve eritrosit solüsyonlarının verilmesi ile gerçekleşir. Bununla beraber hastaların sıvı ve elektrolit dengeleri ile hematolojik parametreleri yakından takip edilmelidir (Taşyaran ve Özkurt, 2004).

Özgül bir antiviral tedavi olmamasına karşın VKA sendromlarında (Ergönül, 2012) geniş spektrumlu bir antiviral ajan olan ribavirinin, hücre kültürü çalışmalarında virüs replikasyonunu durdurduğu bildirilmiştir (Taşyaran ve Özkurt, 2004). Buna ek olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Viral Kanamalı Ateşler Grubu'nun ve Avrupa Hastalıktan Korunma ve Kontrol Merkezinin (ECDC) önerisine rağmen Gıda ve İlaç

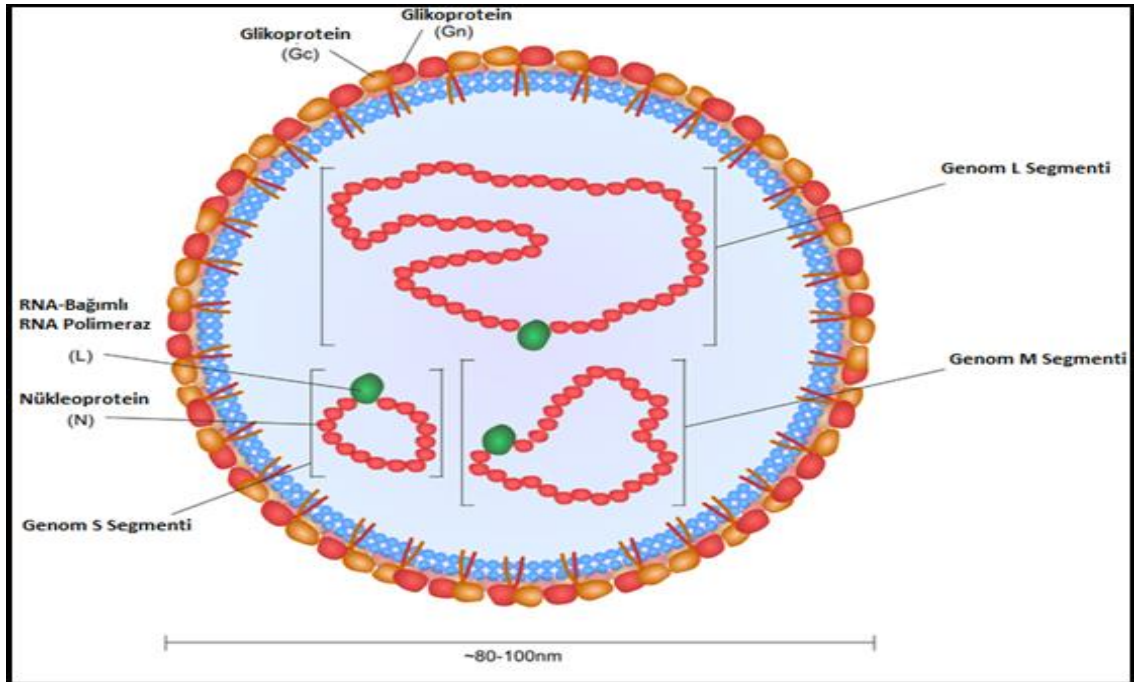
İdaresi (FDA), KKKA'nın tedavisinde ya da profilakside ribavirin kullanımını ve önerilen dozları onaylamamıştır (Goad ve Nuyen, 2003).

Tedavide yeni seçenekler için yapılan çalışmalar ise ilaçların taranması veya yeni moleküllerin geliştirilmesi şeklinde olmaktadır (Ergönül, 2016).

2.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü

KKKAV, *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* cinsine ait olan bir *Arbovirus*'tur. Bu virüsün çoğunlukla sert ya da yumuşak kenelerden geçtiği kabul edilmiştir (Burt ve ark., 1997). İnsanlarda KKKA hastalığına sebep olan virüs *Hyalomma marginatum* adlı kene türünden 1960 yılında izole edilmiştir (Seçmeer ve ark., 2010).

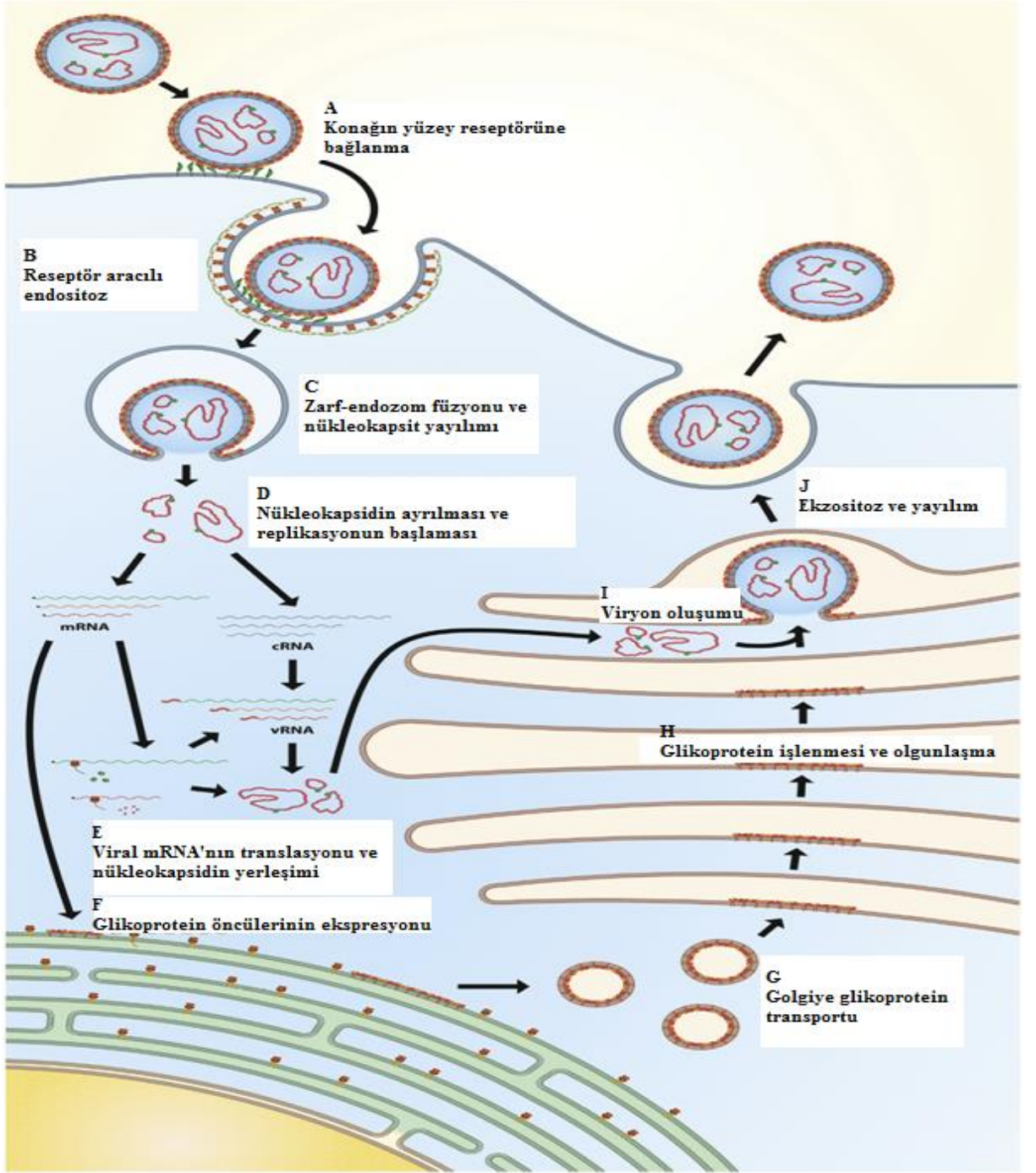
KKKAV; morfolojisi, morfogenezi, replikasyon siklusu ve fizikokimyasal özellikleri bakımından *Bunyaviridae* ailesinin tipik üyelerindedir (Donets ve ark., 1977). Tek sarmallı, zarflı, negatif polariteli ve çoğunlukla küresel yapıda bir RNA virüsüdür. Virüsün genomu 3 segmentlidir ve 4 yapısal protein kodlamaktadır. Her bir RNA segmenti ile birlikte virüse ait RNA bağımlı RNA polimeraz (RbRp) da paketlenmiştir (Bkz. Şekil 5.). Büyük (L) segment L proteinini (RbRp); orta (M) segment Gc ve Gn glikoproteinlerini ve küçük (S) segment de nükleoproteini-nükleokapsidi (N proteini) kodlamaktadır (Flick ve ark., 2003).



Şekil 5: KKKA virionunun şematik gösterimi (Bente ve ark., 2013)

Viral glikoproteinlerin işlevi duyarlı hücrelerdeki reseptörleri tanımaktır. Xiao ve ark. (2011), hedef hücreye bağlanmada Gc glikoproteininin önemli rol oynadığını ileri sürmüşler ve hücreye girişte gerekli olan konak nükleolin molekülünü tanımlamışlardır. Bu sayede virüs, duyarlı olduğu hücreye yapıştıktan sonra kltrin-bağımlı endositozla vezikül içerisinde hücre içine alınmaktadır. Virüsün hücre içine alınma süreci, virion oluşumu ve çıkışı konak hücre mikrotübüllerine bağlıdır (Simon ve ark., 2009). Vezikül içindeki ortamın asitleşmesiyle glikoproteinlerin üç boyutlu yapısında değişiklikler meydana gelmekte ve virüs ile vezikül membran birleşerek nükleokapsid sitoplazmaya geçmektedir. Virüsün replikasyonu sitoplazmada gerçekleşmektedir (Whitehouse, 2004). Yüzey glikoproteinlerin sentezi karmaşık bir süreçtir. Öncü Gc ve Gn'lerin sentezi endoplazmik retikulumda (ER) başlar, heterodimer olarak golgiye geçerler (Shi ve ark., 2012) ve olgun bir virüs partikülünün oluşumu ise golgide gerçekleşir (Bente ve ark., 2013).

KKKAV'nin hücre içi replikasyon döngüsü virionların hücre yüzey reseptörlerine bağlanmalarıyla başlamaktadır. Virionlar kltrin-bağımlı endositozla hücre içine alınmaktadır. Endozomdaki pH'nın düşmesiyle viral glikoproteinlerde konformasyonel değişiklik meydana gelmektedir. Virionun zarfı ile endozomal membran arasında füzyon gerçekleşmekte ve nükleokapsid sitozole geçmektedir. Nükleokapsid sitoplazmaya geçtikten sonra RbRp tarafından mesajcı RNA (mRNA) ve tamamlayıcı RNA (cRNA) üretilmektedir. cRNA viral RNA (vRNA) üretimi için kalıp olarak kullanılırken mRNA'nın viral proteinlere translasyonu gerçekleşmektedir. vRNA, RbRp ve kapsid proteinleri yeni nükleokapsidleri oluşturmak üzere birleşirler. Oluşan öncü proteinden Gc ve Gn formları oluşmaktadır. Sonrasında ise glikoproteinler golgi kompleksine geçmekte ve bunların olgunlaşma süreci golgide gerçekleşmektedir. Sonuç olarak yeni virionlar oluşmaktadır. Oluşan virionlar ekzositozla hücre dışına salınmaktadır (Bkz. Şekil 6.).

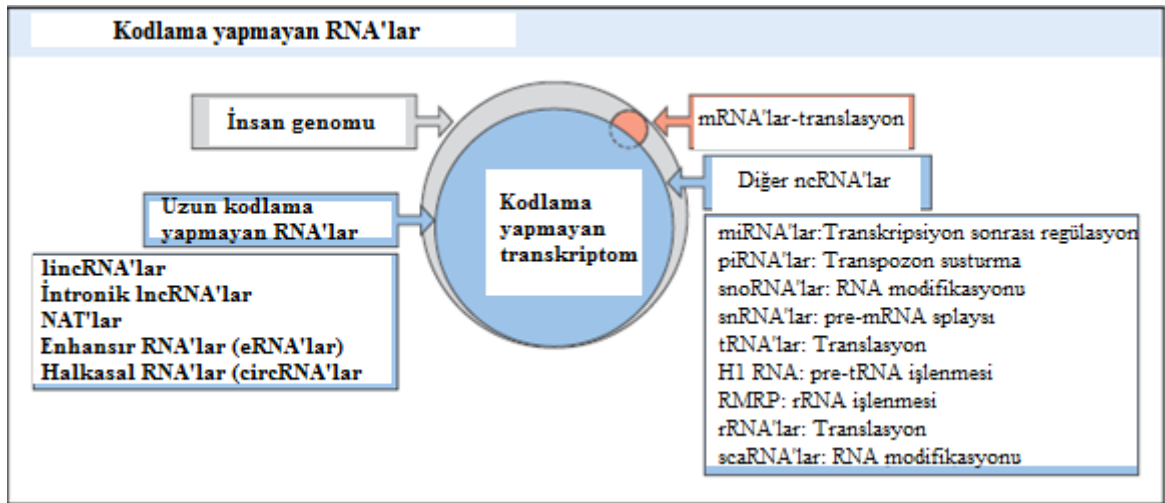


Şekil 6: KKKAV'nin hücre içi replikasyon döngüsü (Bente ve ark., 2013)

2.3. Kodlama Yapmayan RNA'lar

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, genomun sadece %2'lik kısmının protein kodlayan genlerden oluştuğunu göstermiştir. Sınırlı sayıda protein kodlayan genin gelişimsel ve fizyolojik karmaşıklığı açıklamada yetersiz kalabileceği belirtilmiştir (Lander ve ark., 2001)

Günümüzde ise kalıtsal materyalin büyük bir kısmının kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak transkribe olduğu gözlenmiştir (ENCODE Project Consortium, 2007). Protein kodlamayan bu RNA'ların farklı birçok biyolojik süreçte düzenleyici olarak rol aldığı vurgulanmıştır ve nükleotid (nt) sayılarına göre 1) kısa ncRNA (17-30 nt uzunluğunda), 2) orta boyuttaki ncRNA (30-200 nt uzunluğunda) ve 3) uzun ncRNA (200 nt'den daha uzun RNA'lar) şeklinde üç gruba ayrılmıştır (Katsarou ve ark., 2015). Kodlama yapmayan genom içinde özellikle lncRNA'lar zengin bir kategoridir.



Şekil 7: NcRNA'ların sınıflandırılması (Boon ve ark., 2016)

2.3.1. Uzun Kodlama Yapmayan RNA'lar

Bazı araştırmalar, insan genomunun 90.000'den fazla gen içerdiğini ve bunun yaklaşık 60.000'inin lncRNA'lardan oluştuğunu belirtirken; bazıları ise lncRNA genlerinin sayısının 200.000'e yaklaşabileceğini ileri sürmektedir (Iyer et al., 2015). LncRNA'lar protein kodlama kapasitesine sahip olmayan fonksiyonel RNA molekülleri olarak genellikle 200 nt'den daha uzun transkriptler şeklinde sınıflandırılmaktadırlar (Cech ve Steitz, 2014).

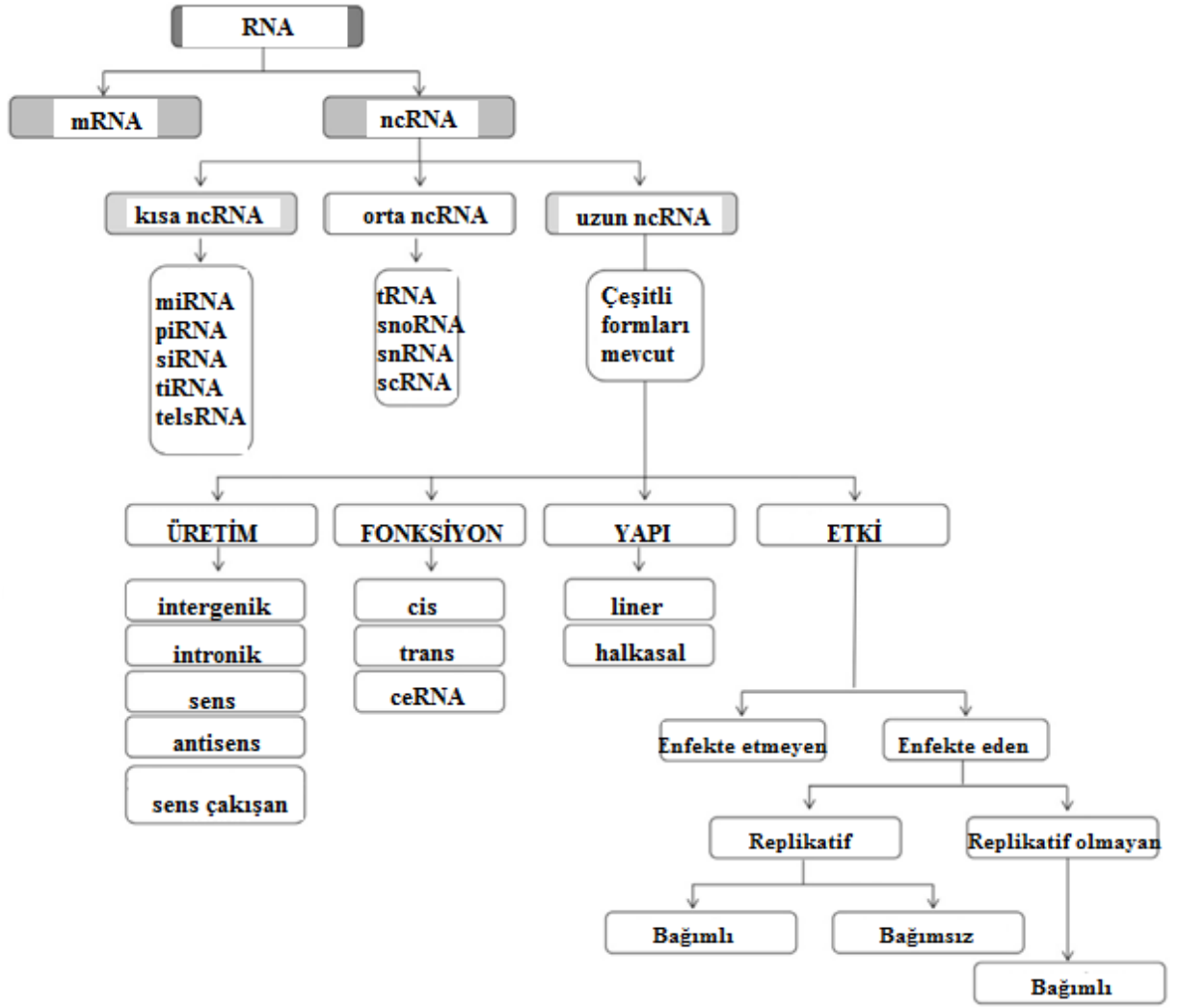
LncRNA'ların çoğunluğu RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir; 5' uçlarının başlıklı, 3' uçlarının poliadenillenmiş olması ve splay mekanizmasının gerçekleşmesi bakımından mRNA'lara benzemektedirler (Mercer ve Dinger, 2009). Öte yandan mRNA'lara kıyasla lncRNA'ların dokuya özgüllüğü daha fazladır, daha az ifade

olurlar ve genomda daha az korunmuşlardır (Djebali ve ark., 2012). Bu da söz konusu transkriptlerin son zamanlara kadar neden fark edilmediğinin kanıtıdır.

LncRNA'lar, RNA'ların heterojenik sınıfını oluştururlar ve standart bir sınıflandırması bulunmamaktadır. Bununla birlikte lncRNA terminolojisi; lncRNA'ların dokuya özgüllüğüne, moleküler fonksiyonuna ve genomik lokalizasyonuna dayanmaktadır. Genomda yerleşimlerine göre lncRNA'lar kalıp zincir, karşı zincir, intronik, genler arası (Bkz. Şekil 8), gen içi, 5'UTR, 3'UTR, eksonik, enhansır ve promotör lncRNA'ları şeklinde sınıflandırılabilir (Ma ve ark., 2013).

Bugüne kadar toplanan veriler lncRNA'ların birçok hücrel süreçte rol aldığını göstermektedir. Bazı lncRNA'lar transkribe olduktan sonra ikincil ve üçüncül yapılar kazanarak düzenleyici fonksiyonlarını yerine getirmek üzere proteinlerle, DNA ve diğer RNA'larla etkileşmektedirler (Cech ve Steitz, 2014). Elde edilen bulgular, lncRNA'ların hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası düzenlemelerde görev aldığını göstermektedir (Nie ve ark., 2012). Kromatin yeniden düzenleyicilerine rehberlik ederek, DNA kıvrılmasını indükleyerek, transkripsiyonu, splayı, translasyonu ve RNA kararlılığını düzenleyerek gen ifadesini kontrol eden lncRNA'ların çeşitli örnekleri mevcuttur (Yoon ve ark., 2012). Bununla birlikte çekirdek altyapılarının iskelesi olan, protein taşınımını ve translasyon sonrası modifikasyonları kontrol eden lncRNA'lar da bulunmaktadır (Wang ve ark., 2014).

Bir grup lncRNA fonksiyonunun ise hücre homeostasisi, büyümesi ve farklılaşmasında gerekli olduğu gösterilmiştir. LncRNA'ların fonksiyonları; genel olarak kromatin organizasyonu, transkripsiyonel düzenleme ve transkripsiyon sonrası kontrol şeklinde üç farklı seviyede incelenebilmektedir. Organizmanın gelişimsel sürecinde lncRNA'ların ifade düzeyi değişmektedir. Fonksiyonlarının çok çeşitlilik arz etmesi ve dolayısıyla birçok fizyolojik süreçte rol almaları bakımından lncRNA'ların pek çok hastalıkla ilişkilendirilmesi şaşırtıcı değildir. Günümüze kadar elde edilen birçok veri, değişen lncRNA ifadesinin metabolik hastalıklar, nörodejeneratif ve psikiyatrik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ile bağışıklık sistemi fonksiyon bozukluklarında önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Clark ve Blackshaw, 2014). Tüm bunlara ek olarak birçok lncRNA'nın viral enfeksiyonlarda ve antiviral cevapta da rol oynadığı belirtilmiştir (Fortes ve Morris, 2016).



Şekil 8: LncRNA'ların sınıflandırılması (Katsarou ve ark., 2015)

2.4. Viral Enfeksiyonlarda Uzun Kodlama Yapmayan RNA'lar

Virüsler, antiviral immün sistem ile savaşmak ve replikasyonlarını artırmak için birkaç strateji geliştirmiştir (Horner ve Gale, 2013). Son çalışmalar bu stratejilerden bazılarının lncRNA'lar vasıtasıyla gerçekleştiğini göstermektedir. LncRNA'ların özellikleri ise kısaca aşağıda belirtilmiştir.

1. Virüsler konak hücredeki fonksiyonlara benzer moleküler mekanizmaları benimsemişlerdir. Bu yolla virüs, konak hücre mekanizmalarını kullanabilmektedir. Konak hücrelerde ifade olan birçok lncRNA virüsler tarafından da ifade edilmektedir.
2. Virüsler hücrede güçlü seçici baskı altındadır. Özellikle RNA virüsleri bu baskıdan kurtulmak için kodlama yapmayan RNA'ları (ncRNA'lar) kullanmaktadırlar. Bunun

nedeni ise; lncRNA'ların kodlama yapan genlere göre mutasyonları daha iyi tolere etmesidir (Ulitsky ve ark., 2011).

3. Hücresel antiviral algılayıcılara görünmez olması protein faktörleri ile karşılaştırıldığında lncRNA'ların bir avantajıdır.
4. Yukarıda işaret edildiği gibi enfeksiyona karşı hücresel yanıt, hücresel proteomu etkiler. Yeni proteinlerin translasyonu protein kinaz R (PKR) aktivasyonu tarafından bloke edilir. LncRNA'lar bu protein karşıtı çevreye karşı bağışıklırlar (Fortes ve Morris, 2016).

Fortes ve Morris (2016)'in çalışmasında görüldüğü üzere viral lncRNA'lar, virüsün hayatta kalma yeteneğini artırma ve hücresel antiviral atmosfere direnç gösterme gibi fonksiyonlara sahiptir. Enfekte olmuş bir hücrede hücresel lncRNA'ların ekspresyonu virüs tarafından indüklenmekte ve bu lncRNA'lar, replikasyonunu artırmak üzere virüs tarafından kullanılmaktadır. Benzer bir şekilde enfekte edilmiş hücre, viral enfeksiyona karşı koyan hücresel lncRNA'ların da ifade olmasına sebep olur. Farklı virüslerle enfekte edilmiş hücrelerdeki transkriptom analizi, enfeksiyondan sonra ifadesi değişen viral ve hücresel lncRNA'ların teşhisine aracılık etmiştir.

2.4.1. Hücresel Uzun Kodlama Yapmayan RNA'ların Virüsle Enfekte Olmuş Hücrelerde Çalışma Mekanizmaları

Enfekte ve sağlıklı hücrelerin transkriptomu karşılaştırıldığında özellikle lncRNA'larda belirgin değişiklikler görülmektedir. Patojenle ilişkili moleküler modellerin (PAMP) aktivasyonu ya da interferon (IFN) tedavisi veya NF- κ B vasıtasıyla transkripsiyonu indükleyen TNF α muamelesi pek çok lncRNA'nın ifadesinde değişikliklere sebep olmaktadır (Aune ve Spurlock, 2016). Bu lncRNA'lardan bazılarının ifadesi viral proteinlerin ekspresyonuna cevapta değişmektedir. Örneğin; insan bağışıklık yetersizliği virüsü (HIV) ile enfeksiyon sonrası erken evrede negatif düzenleyici faktörün (Nef) ekspresyonu, aktive edilmiş T hücreleri nükleer faktörünün (NFAT) kodlama yapmayan baskılayıcısının (NRON) ifadesini azaltmaktadır (Lazar ve ark., 2015). NRON, NFAT'ın baskılayıcısı olduğu için, NRON'un azalmış seviyesi enfeksiyon sonrası erken evrede HIV genlerinin NFAT ile düzenlenmiş transkripsiyonuna izin vermektedir. HIV ile enfeksiyon sonrası geç evrede benzersiz viral proteinin (Vpu) ifadesi NRON ekspresyonunu artırmaktadır. Bu da NFAT'ın fonksiyonel yetersizliği ve viral yayılımın

öncüsü olan geç evredeki HIV genlerinin transkripsiyonunun azalması ile sonuçlanmaktadır. Bundan dolayı HIV enfeksiyonu boyunca değişen NRON düzeyi, transkripsiyonun düzenlenmesine aracılık etmektedir. Bu da bize enfekte hücrelerde lncRNA düzeylerinin doğru değerlendirilmesinin, enfeksiyon sonrası farklı zamanlarda yapılması gerektiğini göstermektedir (Fortes ve Morris, 2016). Hücrel lncRNA'ların ekspresyonu aynı zamanda enfeksiyonla indüklenmiş antiviral cevapta da değişebilmektedir.

2.4.2. Virüsle Enfekte Olmuş Hücrelerde Viral Uzun Kodlama Yapmayan RNA'lar

Viral kodlama yapmayan RNA'ların varlığı yıllardır bilinmektedir (Mathews, 1975; Marx, 1972). Bunlardan bazıları; *Adenovirus*'lardan kökenlenen, virüsle-ilişkili RNA'lar (VA RNA'lar), *Epstein-Barr* virüsünün (EBV) kodladığı küçük RNA (EBER) ya da kaposi sarkomu ile ilişkili *Herpesvirus* (KSHV)'tan orijin alan poliadenillenmiş nükleer RNA (PAN RNA)'dır (Conrad, 2016). Viral kodlama yapmayan RNA'lar polimeraz III (VA RNA'lar, EBER'ler) ya da polimeraz II (PAN RNA) promotörlerinden transkribe olurlar ve bazıları (PAN RNA) poliadenillenebilmektedir. Daha sonra bazıları tercihen enfekte olmuş hücrelerin çekirdeğinde bazıları ise sitoplazmasında (VA RNA'lar) toplanmaktadırlar (PAN RNA, EBER'ler). İlginç bir şekilde; bazı viral lncRNA'lar konak hücre mekanizmaları tarafından olgunlaşma süreci vasıtasıyla işlenmektedirler. Bunlardan bazıları ise subgenomik *Flavivirus* RNA'ları (sfRNA'ları) veya *Herpes simplex* virüs tip 1 (HSV-1)'den köken alan latensi ile ilişkili transkript (LAT)'tir (Fortes ve Morris, 2016).

Virüsler sıkıca paketlenmiş bir genoma sahiptir ve her bir viral lncRNA'nın amacına uygun bir fonksiyonu yerine getirmesi gerektiği belirtilmektedir. Pek çok hücrel proteinin viral ncRNA'lara bağlandığı gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak interferon (IFN) sentezinin ve sinyalinin düzenleyicileri olarak immün cevaba katılan proteinler ile transkripsiyon faktörleri ve kromatin modifiye edici faktörler verilebilir. Bazı durumlarda ncRNA ile etkileşimden dolayı protein ya bağlandığı yerden ayrılır ya da yanlış lokalize olur (Imamura ve ark., 2014). Ayrıca ncRNA'ya bağlanınca destabilize olan proteinler de vardır (Manokaran ve ark., 2015). Benzer şekilde bazı lncRNA'lar mikro RNA (miRNA)'ları da içeren hücrel RNA'lara bağlanmaktadırlar

(Lee ve ark., 2015). Örneğin; miRNA'ların stabilitesini ya da fonksiyonunu hedeflemek veya değiştirmek için spesifik faktörlere yakın lokalize olmaktadır. Tüm bu etkileşimler enfekte hücrede işlevsel etkilere dönüşmektedir.

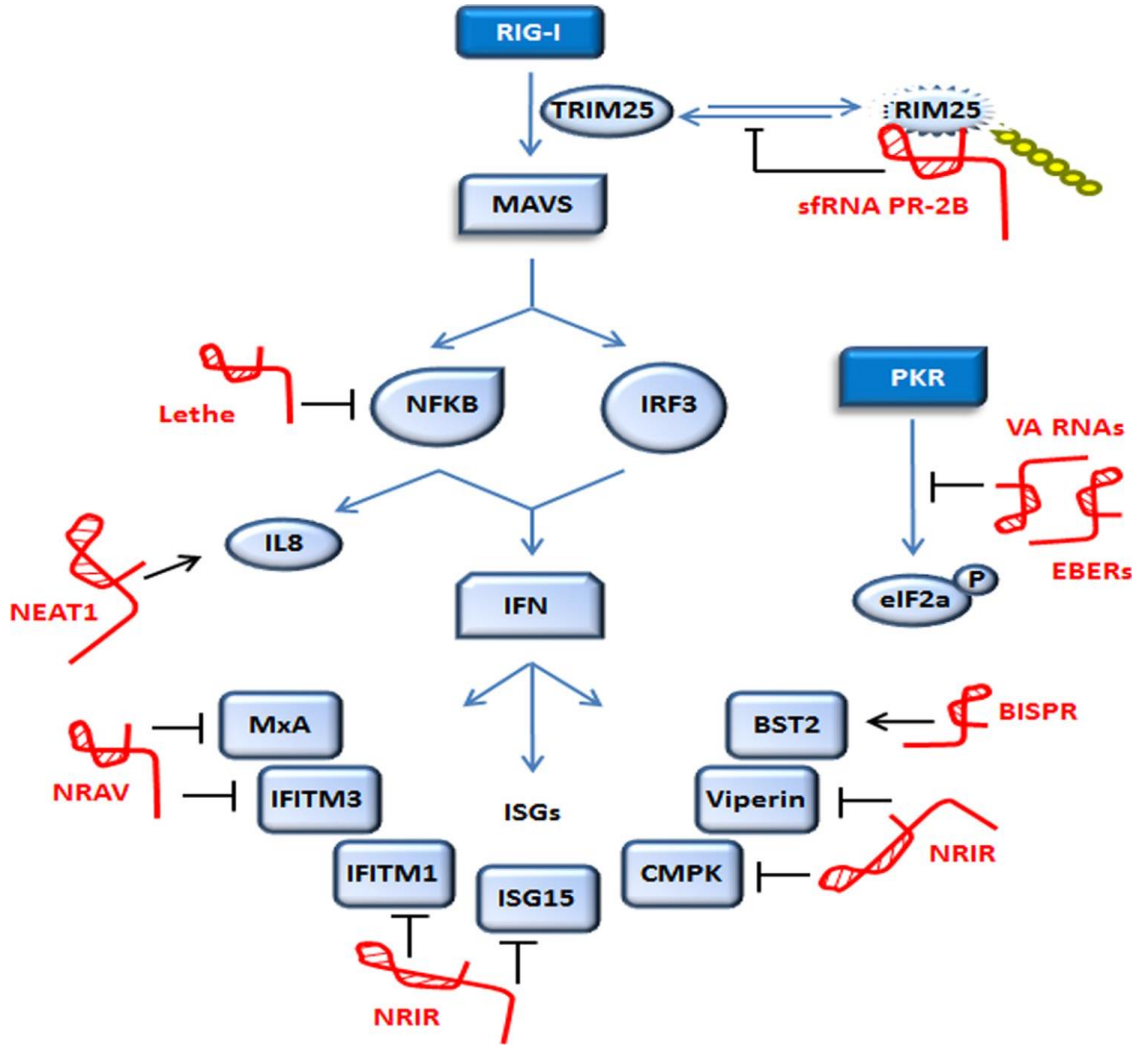
2.4.3. Antiviral Cevabın Düzenlenmesinde lncRNA'lar

Hücrel lncRNA'ların, enfeksiyon yoluyla indüklendiğinde antiviral cevabın süresini ve etkisini kontrol etmek için IFN sentezini ve sinyalini ya artırdığı ya da azalttığı gözlemlenirken; viral lncRNA'ların antiviral cevabı azalttığı belirtilmiştir (Fortes ve Morris, 2016).

Öncelikle; viral enfeksiyonlarda antiviral cevap, PAMP'ların belirlenmesiyle indüklenmektedir. PAMP'lar ise retinoid asitle indüklenebilir gen I (RIG-I) ya da PKR gibi sensörler tarafından tespit edilmektedir (Arnaud ve ark., 2011). Şekil 9'da da görüldüğü üzere RIG-I'in, mitokondriyal antiviral sinyal proteini (MAVS) ile etkileşime geçebilmesi için E3 ubiquitin ligaza (TRIM25) ihtiyacı vardır (Gack ve ark., 2007). MAVS'lar uyarıldığında ise interferon (IFN) düzenleme faktörü (IRF) 3'ün ve nükleer faktör kappa B (NF-κB)'nin aktivasyonuna sebep olmaktadır (Loo ve Gale, 2011). Daha sonra IRF3 ve NF-κB, tip I IFN'nin transkripsiyonunu indüklemektedir. Buna ek olarak IRF3 ve NF-κB, IFN vasıtasıyla düzenlenen gen (ISG)'lerin ve sitokinlerin transkripsiyonunu indükleyebilmektedir. Diğer taraftan PKR, bir IFN indüklü kinazdır (Dabo ve Meurs, 2012). Aktivasyondan sonra PKR'nin anahtar fonksiyonlarından bir tanesi ökaryotik translasyon başlangıç faktör 2a (eIF2a)'nın fosforilasyonudur. eIF2a'nin fosforilasyonu ise translasyonu bloke eden bir olaydır. Anlatılan tüm bu mekanizmalarda antiviral cevap boyunca ifadesi değişen birkaç hücrel lncRNA'nın ve viral lncRNA'ların fonksiyonu Şekil 9'da gösterilmiştir.

Hücrel lncRNA'nın çoğunun, birkaç mekanizma ile inflamasyonu ve antiviral gen ekspresyonunu düzenlediği görülmektedir. Bunlardan bazıları interlökin 8 (IL8) miktarını artıran ve çekirdekte bol bulunan zenginleştirilmiş transkript 1 (NEAT1) (Imamura et al., 2014), genler arası uzun kodlama yapmayan RNA-siklooksigenaz 2 (lncRNA-COX2), Lethe, interlökin 7 reseptörü (IL7R), antiviral cevabın negatif düzenleyicisi (NRAV) veya IFN cevabının negatif düzenleyicisi (NRIR)'dir (Ouyang ve ark., 2014). Bu da bugüne kadar çalışılan enfeksiyonla ilişkili lncRNA'ların büyük bir

kısının negatif regülatör olarak rol oynadığını ve dolayısıyla bu lncRNA'ların yangı ve IFN yolağının susturulmasında anahtar fonksiyona sahip olabileceğini önermektedir. Şekilde de belirtildiği üzere Lethe'nin NF-KB'yi baskıladığı, NRAV'ın ise tip I IFN'ler ile muamele edilen hücrelerde aktive edilen hücresel proteini (MxA) ve IFN indüklü transmembran protein 3 (IFITM3)'ü baskıladığı ve yine NRIR'ın da IFITM1, ISG15, sitidin monofosfat (CMP) kinazı (CMPK) ve viperin gibi ISG'leri baskıladığı; kemik iliği hücre antijeni 2 (BST2) IFN ile uyarılan pozitif regülatörün (BSPR) ise diğer hücrel lncRNA'ların aksine BST2'yi aktive ettiği görülmektedir. Viral ncRNA'lar ise; TLR3, RIG-I, PKR gibi bazı PAMP sensörü tarafından tespit edilebilmekte ve bu sayede antiviral yolağı indükleyebilmektedir. Bu yolda rolü olan viral lncRNA'lardan sfRNA PR-2B'nin TRIM25 oluşumunu, VA RNA'nın ve EBER'in ise PKR yolağını inhibe ettiği belirtilmiştir (Fortes ve Morris, 2016).



Şekil 9: Antiviral yolağı düzenleyen bazı lncRNA'lar (Fortes ve Morris, 2016)

2.4.4. Hüresel ve Viral lncRNA'larla Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Enfekte hücrede ifade olan birtakım lncRNA viral ve konak genlerinin ekspresyonunu düzenlemek için kullanılmaktadır. Bunu da iki şekilde gerçekleştirebilir: Birisi transkripsiyonu etkileyerek gen ekspresyonunun düzenlenmesi, diğeri ise RNA stabilitesini etkileyerek gen ekspresyonunun düzenlenmesi şeklindedir.

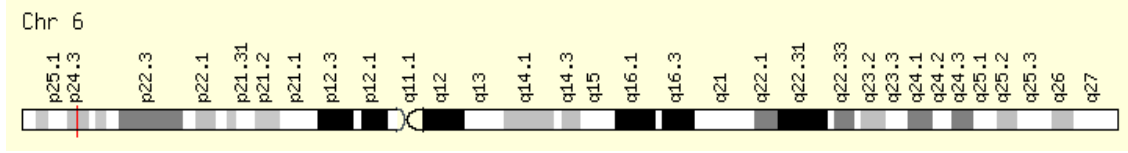
Bugüne kadar tanımlanan çoğu durumda viral gen ekspresyonunun lncRNA'lar tarafından düzenlenmesi transkripsiyon seviyesinde gerçekleşmekte ve bu da erken-geç evre enfeksiyonu ya da latent-litik fazı değiştirebilmektedir. Örnek verecek olursak; insan sitomegalovirüs (CMV) RNA 4.9, latent evre boyunca erken transkripsiyonu inhibe etmek için baskılayıcı kompleks PRC2'ye bağlanır (Noriega ve ark., 2014).

Diğer viral lncRNA'ların da kromatin ya da transkripsiyon faktörlerine bağlandığı gösterilmiştir (Saayman ve ark., 2014). Örneğin; antisens HIV transkriptleri DNA metiltransferaz 3A, EZH2 ve HDAC1 gibi susturucu faktörlere bağlanarak HIV ekspresyonunu baskılamaktadır. Başka bir örnek verilecek olursa EBER2, transkripsiyon faktörlerine rehberlik etmek için DNA'nın spesifik bölgelerine lokalize olabilmektedir (Tycowski ve ark., 2015). Bu da hücrel lncRNA'ların yeni oluşan transkriptlerle baz eşleşmesi yaparak transkripsiyon faktörlerine rehberlik edip edemeyeceğinin belirlenmesi için ilginç bir durumdur.

Konak gen ifadesinin düzenlenmesi esas olarak transkripsiyonun düzenlenmesiyle gerçekleşmesine rağmen RNA stabilitesinin kontrolü de bu olayda önemlidir. Birkaç hücrel lncRNA'nın miRNA'larla etkileştiği belirtilmiştir. Çoğu durumda bu lncRNA'ların miRNA'lara bağlanarak ilgili miRNA'ların hedef genlerinin ifadesinin artmasına sebep olduğu vurgulanmaktadır. Örnek olarak *Hepatit B* virüsü (HBV) ile ilişkili karaciğer kanserinde ifadesi artan lncRNA (HULC) verilecek olursa bu lncRNA'nın karaciğer kanseri olan hastaların karaciğer hücrelerinde ve serumlarında ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak HBV enfeksiyonuna maruz kalmış hastalarda bu lncRNA'nın kötü prognoz için bir markır olarak rol alabileceği üzerinde durulmuştur. Nitekim HULC, birçok insan kanseri tipinde hücre döngüsü, apoptoz, invazyon ve proliferasyonun düzenlenmesinde görev alan miR-372'ye bağlanarak bu miRNA'nın, hedef genlerine bağlanmasına engel olmuştur (Fortes ve Morris, 2016).

2.4.5. HULC

Karaciğer kanserinde ifadesi artan lncRNA (HULC), yeni bir mRNA benzeri ncRNA olarak karakterize edilmiştir. 500 nt'lik, splay olabilen ve poliadenillenen bu lncRNA, memeli LTR transposon 1A'ya benzemektedir. Açık okuma çerçeveleri içermez ve hiçbir translasyon ürünü saptanmamıştır. HULC, sitoplazmada bulunur. İki hepatoselüler karsinoma (HCC) hücre hattında siRNA aracılı HULC yıkımının birkaç genin ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir (Panzitt ve ark., 2007).

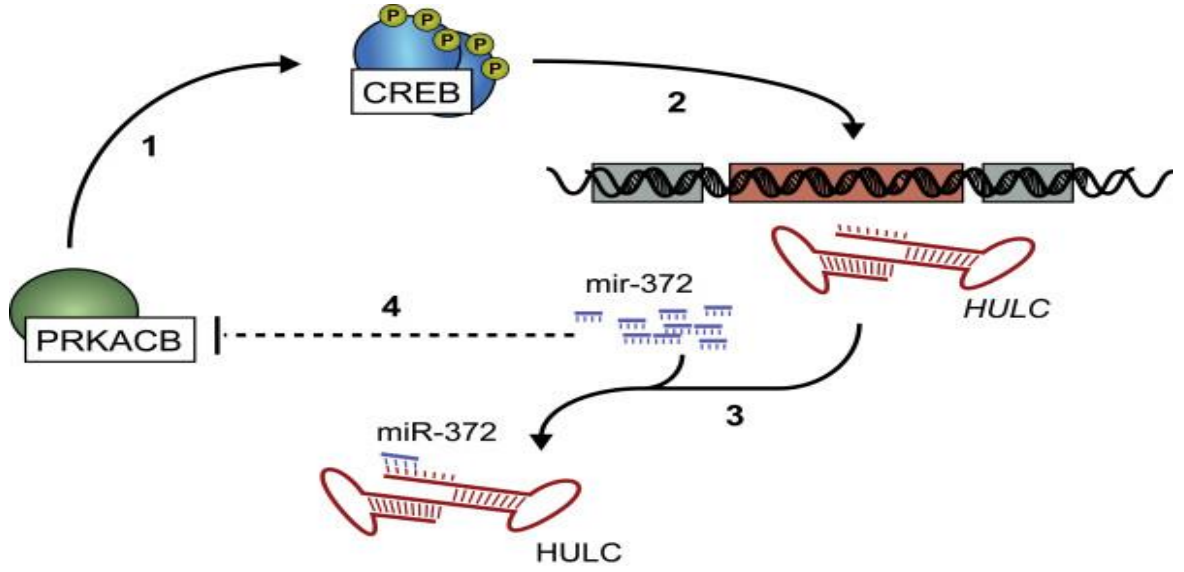


Şekil 10: HULC'un genomik yerleşimi

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HULC&keywords=hulc>)

Hepatit-B virüs (HBV) enfeksiyonu HCC'nin başlıca sebebidir (But ve ark., 2008). Son zamanlarda yapılan bir araştırma bazı lncRNA'ların HBV ile ilişkili HCC'de anormal bir şekilde ifade olduğunu göstermiştir. Bunlardan birisi de HULC'tur. Bu lncRNA'nın HBV ile ilişkili hepatokarsinogenezde anahtar rol oynadığı rapor edilmiştir. HBV X (HBx) proteini vasıtasıyla HULC'un ifadesinin arttığı rapor edilmiştir. İfadesi artan HULC, bir tümör baskılayıcı gen olan p18'i baskılayarak hepatoma hücrelerinin proliferasyonunu artırmaktadır (Du ve ark., 2012). HULC ekspresyonu vasıtasıyla mikroRNA 372 (miR-372) ifadesinin inhibisyonu karaciğer kanserinde bu lncRNA'nın upregüle olmasına yol açan otheregülasyon döngüsünün bir parçasıdır.

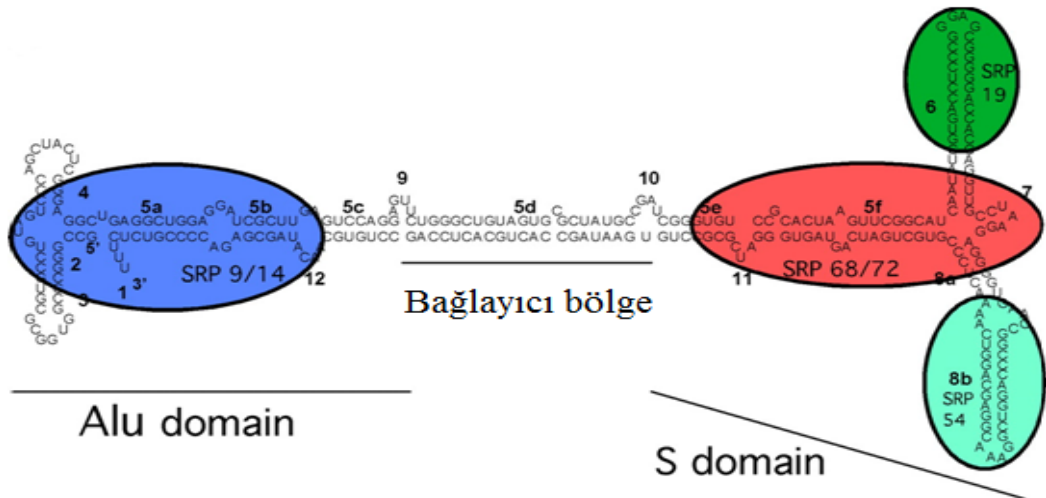
HBV ile ilişkili HCC'de, HBx'in, HULC ifadesini indüklediği, bu sebeple de tümör baskılayıcı gen olan p18'in ifadesini baskıladı ve dolayısıyla da proliferasyonu kolaylaştırdığı saptanmıştır (Li ve ark., 2014). HCC'de ileri sürülen HULC mekanizması Şekil 11'de gösterilmiştir. Protein kinaz ACB (PRKACB), CREB'in bir aktivatörü olarak işlev görmektedir. Fosforile (aktive) CREB, HULC ekspresyonunu aktive etmek için RNA pol II transkripsiyon makinesinin bir parçasını oluşturmaktadır (2). HULC RNA, baskılayıcı fonksiyonu olan miR-372'yi etkisiz hale getirmek için bir moleküler sünger gibi davranmaktadır (3). miR-372'nin baskılanması, PRKACB'nin translasyonel olarak baskılanmasını azaltacağından PRKACB seviyesi artmaktadır (4).



Şekil 11: HULC'un upregülasyon mekanizması (Gibb ve ark., 2011)

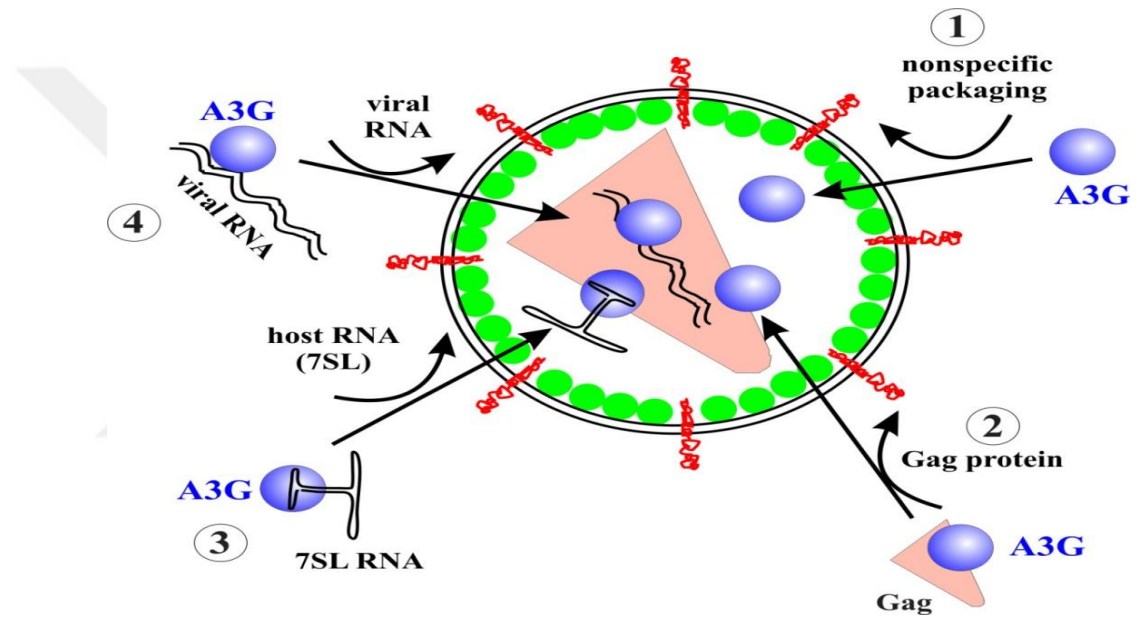
2.4.6. 7SL RNA

7SL RNA, RNA polimeraz III tarafından transkribe olan 300 nt'lik bir RNA'dır. Sinyal tanıma partikülü (SRP) ribonükleoprotein (SRPRNP) kompleksinin yapısal RNA bileşenidir (Zwieb ve ark., 2005). SRP, hücre içinde proteinlerin trafiğini yöneten ve onların salgılanmasını sağlayan evrensel olarak korunmuş ribonükleoproteindir (Lutcke, 1995). Memelilerde SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 ve SRP72 olmak üzere 6 tane SRP proteini bulunmaktadır (Şekil 12). Bunlar 7SL üzerinde birleşmekte ve SRP'leri oluşturmaktadırlar (Kuglstatter ve ark., 2002).



Şekil 12: 7SL RNA dizisi (Keene ve ark., 2010)

İlk olarak kuş ve fare onkojenik virüs partiküllerinde tespit edilmiş, sonrasında ise retrovirüslerin çoğunda paketlenmiş olarak bulunmuştur (Keene ve ark., 2010). Tian ve ark. (2007) 7SL RNA'nın HIV-1 viryonlarında, *Y* RNA, *7SK* RNA, *U6* snRNA gibi pol III tarafından transkribe edilen diğer, çok miktarda bulunan RNA'lardan ve hücrel mRNA'lardan daha seçici paketlendiğini göstermiştir. 7SL RNA'nın, APOBEC3G (A3G) ve APOBEC3F (A3F) gibi konak sitidin deaminazlarının doğuştan antiviral fonksiyonunda kofaktör olarak görev yaptığı öne sürülmüştür. A3G'nin 7SL RNA ile etkileştiği ve her ikisinin de viryonlarla birleştiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2008).



Şekil 13: 7SL RNA ve A3G'nin antiviral mekanizması (Strebel ve Khan, 2008)

7SL RNA bağlanmasının azaldığı A3G mutantlarında antiviral aktivitenin bozulduğu belirlenmiştir. SRP19'un aşırı ifadesi 7SL RNA, A3G ve A3F paketlemesini inhibe etmekte ve onların antiviral fonksiyonunu bozmaktadır (Wang ve ark., 2008). Üstelik hem A3F hem de hücrel 7SL RNA'nın viryon paketlemesi HIV-1 nükleokapsid domaininde aynı alanlarda haritalanmıştır (Tian ve ark., 2007). Şekil 13'te gösterildiği gibi A3G'nin antiviral mekanizmasında dört farklı yol öngörülebilir: A3G spesifik olmayan bir şekilde paketlenmiştir. A3G'nin viral Gag proteinlerine, viral ve hücrel RNA'lara olan duyarlılığı göz önüne alındığında, bu olasılık pek mümkün görünmemektedir (1). A3G, RNA'dan bağımsız bir şekilde Gag ile etkileşim yoluyla

paketlenmektedir (2). A3G, konakçı RNA ile etkileşime girer; özellikle de 7SL RNA'nın A3G'nin kapsüllemesine aracılık etmesi antiviral cevapta çok önemli yere sahiptir (3). A3G viral genomik RNA ile spesifik etkileşim yoluyla paketlenmektedir (4).

Bu çalışma, KKKA'lı hastalarda HULC ve 7SL RNA düzeylerinin belirlendiği ilk çalışmadır. Ayrıca KKKA'dan dolayı ölenler ve hayatta kalanlar, ölenler ve sağlıklı bireylerde HULC ve 7SL RNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amaçlarımız arasındadır. Buna ek olarak klinik verilerle de bu genlerin ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

3. MATERYAL-METOT

3.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu bireylerine ait kan örneklerinin kullanımı için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (25.03.2016 tarihli, 2016-03/10 nolu karar)'ndan onay alındı. Bu kapsamda 60'ı hasta, 40'ı kontrol grubu olmak üzere toplam 100 adet kan kullanıldı. Hasta grubunu Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim dalı tarafından KKKA hastalığı kesin tanısı konmuş bireyler, kontrol grubunu ise aynı anabilim dalı tarafından klinik muayenesi sonucu KKKA hastalığı bulunmayan sağlıklı bireyler oluşturmuştur. Kanlar tüm hücreleri parçalayan ve genetik materyali tespit eden özel bir sıvının olduğu RNA tüplerine (Qiagen-PAXgene kan RNA tüpü), alındığı anda konmuştur. Bu tüpler sayesinde kan örneği içinde tüm hücreler parçalanmış ve genetik materyal tespit edilmiştir. Kan örnekleri çalışma sırasına kadar -80 °C'de saklandı.

3.2. RNA İzolasyonu

LncRNA içeren total RNA, miRNeasy mini kit ile (QIAGEN-katalog no:217004) kit protokolüne uygun olarak kan örneklerinden izole edildi. İnkübasyon aşamasına kadar yapılan tüm muameleler modifiye edildi. Öncelikle çalışma sırasında kullanılacak tüm malzemeler RNaz'ları inaktifleştiren dietil pirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiş distile sudan geçirilerek steril edildi. İlk olarak RNA tüpündeki 7 ml kan örneği 4 °C'de, 5000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pelletin üzerine 4 ml

RNaz içermeyen su eklendi, pellet çözüne kadar vortekste karıştırıldı ve tekrar 4 °C'de, 5000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 500 µl Tris EDTA sodyum klorür (TES) ilave edildi. Homojen bir karışım elde edilene kadar vortekste karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 2 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı, üzerine 40 µl %10'luk (sodyum dodesil sülfat) SDS, 40 µl proteinaz K eklendi, vortekste karıştırıldı ve 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon aşamasından sonra her bir örneğe 600 µl QIAzol liziz reaktifi eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 200 µl kloroform eklendi ve kuvvetlice çalkalandı, 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4 °C'de, 12000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Üst faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine hacminin 1,5 katı kadar %100'lük etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Bu karışımdan 700 µl alınıp 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy mini kolona yüklendi. Sonrasında oda sıcaklığında 11000 g'de 15 sn santrifüj edildi ve atık döküldü. Örneğin kalan kısmı ile bu santrifüj adımı tekrarlandı. Atık döküldükten sonra kolona 700 µl RWT tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 11000 g'de 15 sn santrifüj edildi, atık döküldü. Bu adımdan sonra ise kolona 500 µl RPE tamponu eklenerek tekrar oda sıcaklığında 11000 g'de 15 sn santrifüj edildi ve atık döküldü. Ardından tekrar 500µl RPE tamponu eklenerek oda sıcaklığında 11000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Daha sonra kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 1 dk en yüksek hızda ağzı açık şekilde santrifüj edilerek kurutuldu. 1,5 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirilen kolona 35 µl RNaz içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 11000 g'de 1 dk santrifüj edilerek RNA elde edildi. Son olarak RNA örnekleri sonraki aşamada kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.3. RNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Belirlenmesi

Hasta ve kontrol grubu örneklerden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra ultraviyole-görünür spektroskopisi (UV-VIS) cihazında (Maestro NANO) tüm örneklerin total RNA konsantrasyonu (ng/µl) ve saflık derecesi (A_{260}/A_{280}) ölçüldü. Her bir örnekten 2µl kullanıldı. Ölçüm yapıldıktan sonra örnekler tekrar kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.4. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

İzolasyon aşamasından sonra konsantrasyonu ölçülen tüm örneklerden cDNA sentezi için öncelikle her birinin RNA konsantrasyonu nükleaz içermeyen su kullanılarak 200

ng/ μ l olacak şekilde eşitlendi. RNA'ların ters-transkripsiyonu için RT² HT First Strand Kit (QIAGEN-330411) kullanılarak kit protokolüne uygun bir şekilde cDNA sentezi yapıldı. Bu işlem genomik DNA eliminasyonu ve ters transkripsiyon olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi.

Öncelikle kit içerisindeki tüm reaktifler kısa bir süre (10-15 sn) santrifüj edildi. İlk aşamada; steril PCR tüplerindeki her bir RNA örneği için Tablo 1'de verilen genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Karışım pipetaj yapılarak kısa bir süre santrifüj edildi.

Tablo 1. Genomik DNA eliminasyon karışımı

Bileşen	Miktar
RNA	25 ng-5 μ g
GE tamponu	2 μ l
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam hacim	10 μl

Tüm örnekler 42 °C'de 5 dk inkübe edilerek sonrasında en az 1 dk buzda bekletildi. Genomik DNA eliminasyonundan sonra ikinci aşamaya geçildi. Bu aşamada Tablo 2'de verilen ters transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 2. Ters transkripsiyon karışımı

Bileşen	Miktar
BC4 ters transkriptaz karışımı	6 μ l
Nükleaz içermeyen su	4 μ l
Toplam hacim	10 μl

Genomik DNA eliminasyon karışımını içeren her bir örneğe, hazırlanan ters transkripsiyon karışımından 10 μ l ilave edilerek pipetaj yapıldı ve örnekler 42 °C'de 15 dk; ardından da 95 °C'de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra örnekler buza alındı ve her birine 91 μ l nükleaz içermeyen su eklendi. Tüm örneklerin cDNA konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü.

3.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

HULC ve 7SL RNA'nın hasta ve kontrol kanlarındaki ifade düzeylerinin belirlenmesi için cDNA sentezini takiben qPCR aşamasına geçildi. qPCR, örnekteki nükleik asit miktarının belirlenmesinde kullanılan bir metottur. Bu metotta amplifikasyonu görünür hale getiren floresan işaretli prob ya da boyalar kullanılır.

Kullanılan prob veya boyalar, çift zincirli DNA'ya bağlanır ve sinyal oluşturur. Reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı bir şekilde artan sinyal, örnekteki nükleik asitin niceliği hakkında fikir verir (Günel, 2007).

qPCR'da en fazla kullanılan boya çeşidi SYBR Green'dir. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green boyası bulunmaktadır. Serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında SYBR Green çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılım başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı da hızla artar ve bu artış qPCR cihazının ekranından izlenebilir (Kubista ve ark., 2006).

Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu analizde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. DNA'nın çift zinciri birbirinden ayrılmaya başladığında floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) vardır. T_m derecesi, çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Bu yüzden T_m derecesi her ürün için özeldir. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalması halinde ise farklı T_m dereceleri meydana gelmektedir.

Çalışmamızda HULC (Katalog no: LPH17802A), 7SL RNA (Katalog no: LPH21289A) ve referans gen SF3A1 (Katalog no:PPH19231A)'e ait optimize QIAGEN marka primerler (RT² IncRNA qPCR primerleri) ve RT²SYBR Green qPCR Mastermix (LOT 7540908) kullanılarak qPCR aşaması, ilgili markanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Öncelikle kullanılacak olan reaktifler kısa bir süre vortekslenip santrifüj edildi. cDNA sentezi yapılmış olan her bir deney ve kontrol grubu örneği için Tablo 3'te yer alan reaksiyon ortamı hazırlandı.

Tablo 3. qPCR bileşenleri

Bileşen	1 reaksiyon başına düşen miktar
Nükleaz içermeyen su	9,5 µl
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	2 µl
RT ² lncRNA qPCR primeri	1 µl
Toplam hacim	25 µl

Tüm hasta ve kontrol örneklerinde ekspresyonu incelenecek olan genler ve referans gen için Tablo 3'te verilen bileşenler her bir qPCR plaka kuyusuna toplam hacim 25 µL olacak şekilde yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra plaka, buharlaşmayı ve kontaminasyonu önleyici şeffaf yapışkan film ile kapatıldı. Daha sonra plaka LightCycler®96 (Roche) cihazına yerleştirildi ve cihaz Tablo 4'te verilen reaksiyon koşullarına uyarlanarak program çalıştırıldı.

Tablo 4. qPCR reaksiyon koşulları

Program	Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık
Başlangıç	1	10 dk	95 °C
inkübasyonu			
2-aşamalı	45	15 sn	95 °C
amplifikasyon		1 dk	60 °C
Erime eğrisi analizi	1	10 sn	95 °C
		1 dk	65 °C
		1 sn	97 °C

3.6. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kullanılacak kan örnekleri için örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde yanılma düzeyi; $\alpha=0.05$, $\beta=0.20$ olarak alındığında hasta grubuna 60, kontrol grubuna 40 kişi alınmasına karar verildi ve testin gücü 0.80634 bulundu. HULC ve 7SL RNA için qPCR aşaması hasta ve kontrol grubu örneklerinde iki tekrar olacak şekilde çalışıldı.

qPCR sonucu elde edilen veriler "RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5"(<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) yazılımına yüklendi ve analiz, $\Delta\Delta C_q$ metoduna göre yapıldı. P değeri kontrol ve deney grubunda çalışılan her bir gen için Student's t-test temel alınarak hesaplandı. 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmada KKKA kesin teşhisi konmuş 60 hasta ve 40 sağlıklı birey kullanıldı. 60 hastanın 11'i ise hayatını kaybetmiştir. Kontrol grubunu ise 25 (%62.5) erkek, 15 (%37.5) kadın birey oluşturmuştur. Kontrol grubundaki bireylerin yaş ortalaması 44.45'tir. Hasta grubuna ait demografik ve klinik veriler Tablo 5'te sunulmuştur.

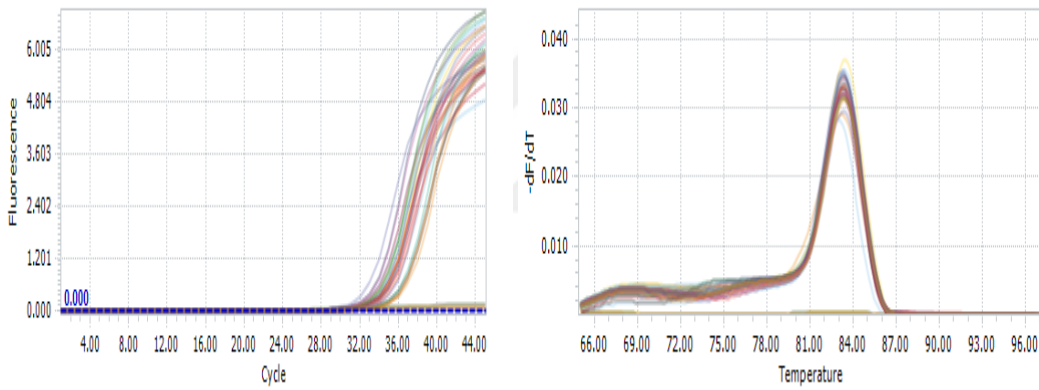
Tablo 5. Hasta grubuna ait demografik ve klinik veriler

Çalışma grubu	Birey sayısı (%)
HASTA	60
Yaş ortalaması	48.38
Erkek	35 (58.33)
Kadın	25 (41.67)
Ölü	11 (18.33)
Laboratuvar verileri	
AST	
N(0-50)	13 (21.67)
Y(>50)	47 (78.33)
ALT	
N(0-50)	23 (38.33)
Y(>50)	37 (61.67)
INR	
N(0.8-1.2)	44 (73.33)
Y(>1.2)	16 (26.67)
PT	
N(10.7-13)	40 (66.67)
Y(>13)	20 (33.33)
aPTT	
N(22-36.9)	33 (55)
Y(>36.9)	27 (45)
LDH	
N(0-248)	11 (18.33)
Y(>248)	49 (81.67)

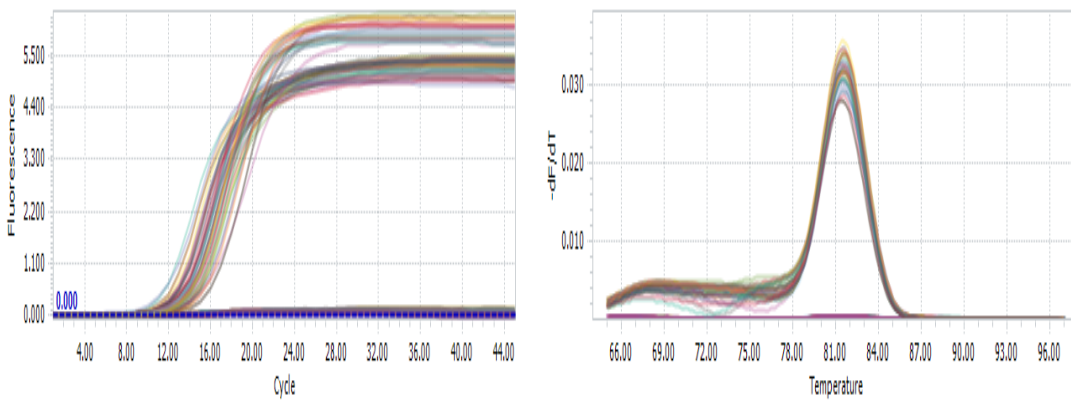
N: Laboratuvar verileri normal değerler arasında olan hastalar; Y: Laboratuvar verileri normal değerlerin üzerinde olan hastalar

Tüm örneklerde her bir genin ifade düzeyinin belirlenmesi için qPCR yapıldı ve veriler $\Delta\Delta C_q$ metoduna göre analiz edildi. İlk olarak, hasta ve kontrol grubunda HULC ve 7SL RNA ifade düzeyleri karşılaştırıldı. Daha sonra HULC ve 7SL RNA ifade düzeyi bakımından KKKA'dan dolayı ölenler ile hayatta kalanlar ve ölenler ile sağlıklı kişiler karşılaştırıldı. Ayrıca hasta grubundaki bireyler klinik verileri (AST, ALT, INR, PT, aPTT ve LDH) açısından normal değerler arasında olanlar ve normal değerlerden yüksek olanlar olmak üzere 2'ye ayrılarak HULC ve 7SL RNA ifadeleri karşılaştırıldı. Buna ek olarak klinik parametreleri normal değerlerin üzerinde olan KKKA hastalığından dolayı ölenler ile hayatta kalanlarda HULC ve 7SL RNA ifade düzeyleri incelendi.

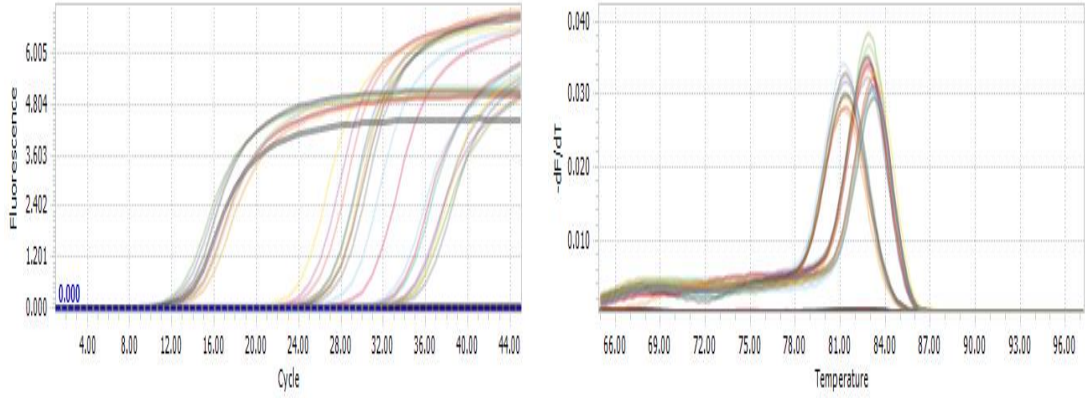
qPCR sonucu hasta ve kontrol grubu örneklerinde HULC ve 7SL RNA'ya ait amplifikasyon ve tm eğrileri her bir gen için Şekil 14, 15'te; HULC ve 7SL RNA'nın SF3A1 (iç kontrol geni) ile birlikte yer aldığı eğriler ise Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 14: HULC'a ait amplifikasyon (solda) ve tm eğrisi (sağda)

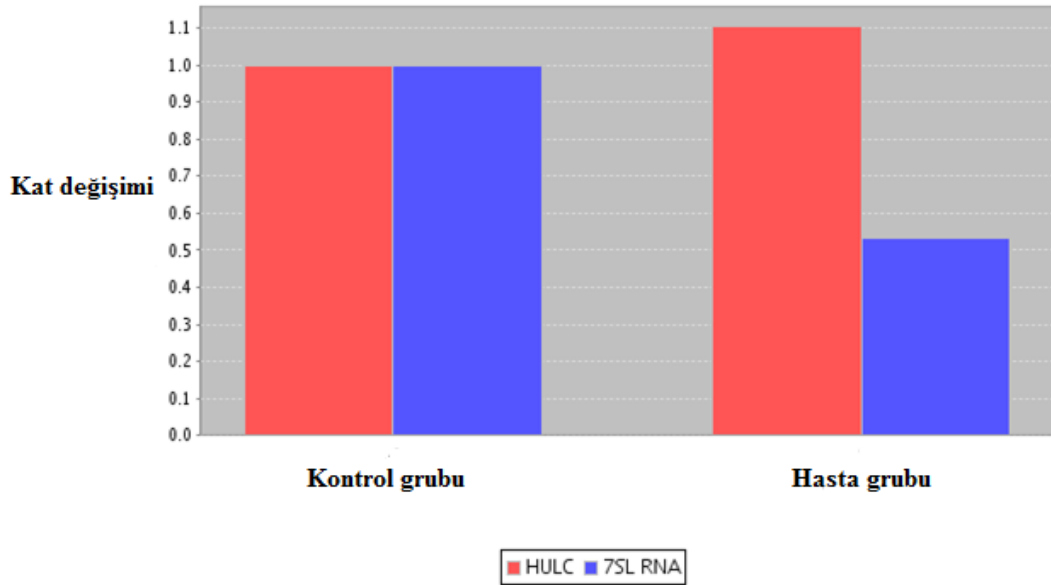


Şekil 15: 7SL RNA'ya ait amplifikasyon (solda) ve tm eğrisi (sağda)



Şekil 16: HULC, 7SL RNA ve SF3A1'e ait amplifikasyon (solda) ve tm eğrileri (sağda)

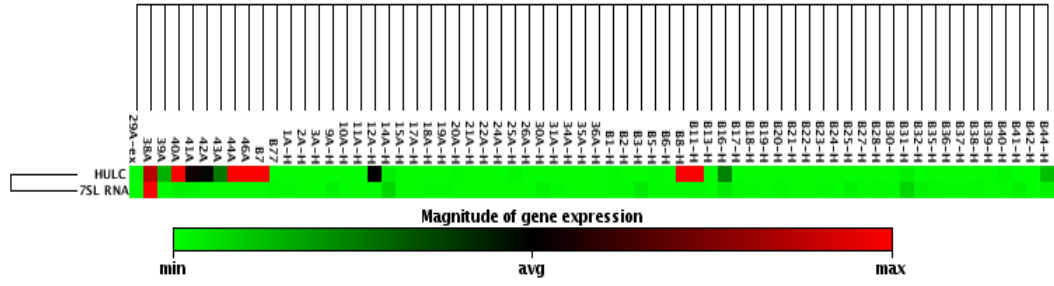
HULC ve 7SL RNA'nın kontrol grubuna göre hasta grubundaki kat değişim grafikleri ise Şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17: HULC ve 7SL RNA genlerinin hasta grubundaki kat değişimleri

KKKA hastalarında HULC'un ifadesi 1.10 kat artmış ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$). 7SL RNA'nın ifadesi ise hasta grubunda yaklaşık 2 kat azalmıştır ($p=0.93$).

KKKA hastalığından dolayı ölenler ve hayatta kalan hastalara ait clustergram ise Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18: KKKK’A’dan dolayı ölen ve hayatta kalan hasta bireylere ait clustergram (min: Gen ifadesinin en düşük olduğu nokta; avg: Gen ifadesinin ortalama değeri; max: Gen ifadesinin en yüksek olduğu nokta)

KKKAV ile enfekte hastalarla karşılaştırıldığında hastalıktan dolayı ölenlerde HULC ekspresyon seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Tablo 6. Hasta-kontrol, ölen-hayatta kalan ve ölen-kontrol gruplarında HULC ve 7SL RNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Grup	Gen	Kat değişimi	%95 CI	P değeri
Total hasta-kontrol				
	HULC	1.10	(0.16, 2.05)	0.04
	7SL RNA	0.53	(0.10, 0.97)	0.93
Erkek				
	HULC	1,11	(0.06, 2.16)	0,15
	7SL RNA	0,65	(0.14, 1.18)	0,72
Kadın				
	HULC	1,76	(0.00001, 4.27)	0,17
	7SL RNA	0,62	(0.04, 1.22)	0,66
Ölen-hasta				
	HULC	100,68	(0.00001,239.52)	$p < 0.01$
	7SL RNA	0,95	(0.00001, 2.57)	0,03
Ölen-kontrol				
	HULC	52,44	(0.00001,122.24)	$p < 0.01$
	7SL RNA	0,50	(0.00001, 1.33)	0,20

(Kat değişimi: Kontrol grubuna göre hasta grubundaki kat artışı; %95 CI: %95 güven aralığı; P değeri: Anlamlılık seviyesi)

$\Delta\Delta Cq$ analiz sonucuna göre kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında KKKK hastalarında HULC’un ifadesi 1.10 kat artmış ve bu artış istatistiksel olarak

anlamli bulunmuştur (p=0.04). 7SL RNA ekspresyonu ise hasta grubunda yaklaşık 2 kat azalmıştır (p=0.93).

Hastalıktan dolayı ölenler ile hayatta kalanlar arasında HULC ve 7SL RNA ifade düzeyleri karşılaştırıldığında ise ölen bireylerde HULC'un ifadesi istatistiksel anlamli olarak artmıştır (100 kat, p<0.01). 7SL RNA'nın azalan ifadesi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (1.04 kat, p=0.03). Sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında ise ölenlerde HULC'un ekspresyonu artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.01). Cinsiyet açısından analiz edildiğinde ise hem erkeklerde hem de kadınlarda HULC'un ifadesinin arttığı; 7SL RNA'nınkinin ise azaldığı tespit edildi. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında kadınlarda HULC erkeklere göre daha fazla, 7SL RNA ise daha az ifadelendiği (Bkz. Tablo 6).

Tablo 7. Klinik parametreleri normal olan hastalar ile normal değerlerin üzerinde olan hastalarda HULC ve 7SL RNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Parametre	Gen	Kat değişimi	% 95 CI	P değeri
AST	HULC	1,72	(0.00001, 4.03)	0,38
	7SL RNA	0,78	(0.14, 1.42)	0,67
ALT	HULC	1,45	(0.00001, 3.21)	0,20
	7SL RNA	0,76	(0.18, 1.34)	0,48
INR	HULC	3,34	(0.00001, 9.68)	0,01
	7SL RNA	0,51	(0.00001, 1.52)	0,12
PT	HULC	3,02	(0.00001, 8.08)	0,02
	7SL RNA	0,67	(0.00001, 1.78)	0,18
aPTT	HULC	2,15	(0.00001, 5.24)	0,10
	7SL RNA	0,46	(0.00001, 1.08)	0,36
LDH	HULC	1,17	(0.00001, 2.88)	0,55
	7SL RNA	0,57	(0.06, 1.10)	0,77

Ayrıca literatürde KKKA tanısı ve hatta mortalite ile ilişkili klinik parametreler de (AST, ALT, LDH, INR, aPTT ve PT) hasta grubunda HULC ve 7SL RNA'nın ifade düzeyleri bakımından değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 7). Klinik verileri normalin üzerinde olan hastalar ile normal değerler arasında olan hastalar karşılaştırıldığında, INR ve PT değerleri normalin üzerinde olanlarda HULC'un ifadesi 3 kat artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p=0.01 ve p=0.02, sırasıyla). 7SL RNA ifadesi ise klinik verileri normalin üzerinde olan hastalarda azalmıştır.

Tablo 8. Klinik parametreleri normal değerlerin üzerindeki ölmüş bireyler ile enfekte olmuş hayatta kalan bireylerde HULC ve 7SL RNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması

		Ölü-Hasta	
		Kat değişimi	P değeri
AST	HULC	89,84	p<0.01
	7SL RNA	0.89	0.06
ALT	HULC	80.29	p<0.01
	7SL RNA	1.16	0.07
INR	HULC	151.63	0.05
	7SL RNA	2.96	0.32
PT	HULC	165.33	0.01
	7SL RNA	2.43	0.26
aPTT	HULC	130.84	p<0.01
	7SL RNA	0.89	0.14
LDH	HULC	96.82	p<0.01
	7SL RNA	0.95	0.05

AST, ALT, PT, aPTT ve LDH'ı normal değerlerin üzerindeki ölen bireylerde HULC ifadesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ölenlerde HULC ekspresyonu; AST'si yüksek olanlarda 90 kat (p<0.01), ALT'si yüksek olanlarda 80 kat (p<0.01), PT'si yüksek olanlarda 165 kat (p=0.01), aPTT'si yüksek olanlarda 131 kat (p<0.01) ve LDH'ı yüksek olanlarda 97 kat (p<0.01) artmıştır (Bkz. Tablo 8).

5.TARTIŞMA-SONUÇ

Çalışmamız KKKA hastalarında HULC ve 7SL RNA genlerinin ifade düzeylerinin incelendiği ilk araştırmadır. Günümüze kadar KKKA hastalığı üzerine pek çok çalışma yapılmış olmakla beraber hastalığın epigenetiksel yönü ile ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır.

KKKA; kanama ve ateş bulguları ile seyreden ölümcül viral bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar (Bente ve ark., 2013; Papa ve ark., 2015) hastalığın Afrika, Avrupa ve Asya'da önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu vurgulamaktadır. Türkiye'de ise özellikle yaz ve sonbahar aylarında Orta Anadolu bölgesinde ortaya çıkan bir epidemi olarak dikkat çekmektedir. Hastalığın belirli bir bölgede görülmesi ise Papa ve ark. (2015) tarafından iklimsel değişikliklere, coğrafik koşullara, hayvancılık sektörüne ve kenelerle temasta bulunan insan sayısı gibi birçok faktöre dayandırılmıştır. *Hyalomma* cinsi kenelerle taşınan ve hastalığın etkeni olan KKKAV'nin muazzam bir genetik değişkenliğe sahip olması hastalıkla mücadelede yeni tanısal testlere ve uygun terapötik ajanlara ihtiyaç olduğu sonucunu doğurmaktadır. Bununla birlikte ülkemizde saptanan virüs suşları benzer olmasına rağmen olgular arasındaki klinik farklılığın nedeni tam olarak açıklanamamaktadır (Midilli ve ark., 2007). Söz konusu farklılığın sebebinin, virüslerin antiviral immün sistemle savaşmak üzere geliştirdikleri stratejiler olabileceği belirtilmiştir (Horner ve Gale, 2013). Son zamanlardaki araştırmalar bu stratejilerden birinin de ncRNA'lar vasıtasıyla gerçekleştiğini göstermiştir.

LncRNA'ların tercih edilmesinin sebebi, bu RNA'lardan pek çoğunun konağın antiviral cevabında pozitif ya da negatif düzenleyiciler olarak görev yapmasıdır. Günümüzde, enfekte hücrelerdeki lncRNA'lar ve fonksiyonları ile ilgili bilgi sınırlıdır. Bu alanda yapılan her yeni araştırmanın, viral enfeksiyonlarda farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve yeni hücrel yolakların tanımlanmasına katkıda bulunabileceği savunulmaktadır (Fortes ve Morris, 2016). Papa ve ark. (2015), viral enfeksiyonlarla mücadele etmek için çeşitli terapötiklerin geliştirilmesine odaklanılması gerektiğini belirterek, gelecekte araştırma öncelikleri için bir yol haritası oluşturmuşlardır.

KKKA hastalığının epigenetik temelini incelenmesine katkıda bulunmak için bu çalışmada HULC ve 7SL RNA genlerinin ifade düzeylerini araştırdık. Yüksek organizasyonlu canlıların çoğunluğunda transkripsiyona uğrayan genomun büyük bir

kısmı ncRNA'lardan oluşmaktadır. 2016'da yayınlanan GENCODE 26'ya göre 23.355 ncRNA geni, bunun da 15.787'sinin lncRNA geni olduğu tespit edilmiştir. LncRNA'lar hastalıklarda patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde göz ardı edilemez işlevlere sahiptir (Boon ve ark., 2016). Bu durum, lncRNA'ların tedaviye yönelik hedef olabileceği kanısını güçlendirmektedir.

HULC, karaciğerde ifadesi çok yüksek olan (GeneCards-25.05.2017) mRNA benzeri bir lncRNA'dır. Ayrıca HULC, HCC'ye özgü gen kütüphanesinde ilk tanımlanan lncRNA'dır (Panzitt ve ark., 2007). HULC'un karaciğer kanseri hastalarının tümör dokularında ve plazmalarında yüksek düzeyde ifade edildiği bildirilmiştir (Xie ve ark., 2013). KKKAV'nin en önemli hedef dokularından birisinin karaciğer olduğu bilinmektedir. Özellikle de şiddetli vakalar karaciğer büyümesi ve organ yetmezliği gibi klinik bulgularla ilişkilendirilmiştir (Bakır ve ark., 2012). HULC'un karaciğerdeki ifadesi önemli olduğundan, biz de çalışmamızda bu lncRNA'nın ekspresyonunu inceledik. Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında KKKAV hastalarında HULC ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ve 1.10 kat arttığını gözlemledik ($p=0.04$). Xie ve ark. (2013), HBV (-) ve HBV (+) toplam 30 HCC hastasının tümör dokuları ile 20 sağlıklı bireyin karaciğer dokularındaki HULC ifadesini karşılaştırmışlardır. HULC'un HCC dokularında belirgin seviyede artış gösterdiği bildirilmiştir ($p<0.01$). Aynı çalışmada HBV (+) ve HBV (-) HCC hastalarında da bu lncRNA ifadesi karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Tümör dokularında HULC ifadesinin HBV (+) durumu ile pozitif korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır ($p<0.01$). Elde edilen bulgulara dayanarak kronik HBV enfeksiyonunun HCC'nin başlıca nedeni olduğu ve multifonksiyonel bir onkoprotein olan HBx'in ise HCC gelişiminde önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Bu protein aracılığı ile HULC ifadesinin artması HBV enfeksiyonu ile bu lncRNA arasındaki ilişkinin araştırılmasına ön ayak olmuştur.

Yüksek HULC ifadesi HCC hastalarının kan hücrelerinde (Panzitt ve ark., 2007) ve plazmalarında tespit edilmiştir. Bu lncRNA'nın hastalığın tanısında umut verici yeni bir biyobelirteç olabileceği gündeme gelmiştir (Xie ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda ise tüm kanda HULC ifadesi incelenmiştir. Nitekim KKKAV, immün cevabı bloke etmek ve replikasyonunu artırmak için lenfositler gibi bağışıklık yanıtta yer alan hücreleri hedef almaktadır (Akıncı ve ark., 2013).

KKKAV'nın seyri bireyden bireye farklılık göstermektedir. Bazı bireyler enfeksiyondan sonra hastaneye hiç uğramadan hastalığı atlatabilirken bazıları ise

hastalığı şiddetli geçirmekte ve hatta ölmektedir. HBV ile ilişkili HCC'de tümör dokuları, doku farklılaşması durumuna göre derece I, II, III ve IV olmak üzere 4 grupta incelenmiştir. Hastalığın en ciddi seyrettiği III ve IV. derecedeki tümör dokularında HULC'un çok daha fazla ifade olduğu sonucuna varılmıştır ($p < 0.01$). Bu durum, HULC seviyesindeki artışın hastalığın ilerlemesinin göstergesi olabileceğini güçlendirmektedir (Xie ve ark., 2013). Çalışmamızda ölenler ve hayatta kalanlar karşılaştırıldığında ölenlerde HULC'un ifade düzeyindeki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Sonuç olarak bulgularımız, HULC'un KKKA'da kötü prognozla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

7SL RNA enfekte olmuş konağın antiviral fonksiyonunda rol almaktadır (Wang ve ark., 2007). 7SL RNA'nın azalması immün cevapta rol alan konak sitidin deaminazlarının görevlerini yerine getirememesiyle ilişkilendirilmektedir. İnsan sitidin deaminazları RNA'yı ya da DNA'yı modifiye etmektedirler. Bu proteinlerden A3G, ters transkripsiyon sırasında sitozinin urasile deaminasyonunu indükler (Suspene ve ark., 2004). Bu mekanizma ile A3G ve A3F'nin viral DNA oluşumunu ve birikimini azalttığı bildirilmiştir (Luo ve ark., 2007). A3G, 7SL RNA'yı da kapsayan polimeraz III türevli RNA'larla etkileşmektedir. Nitekim 7SL RNA, antiviral cevapta A3G'ün kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Bu lncRNA ifadesinin azalması sonucu ise A3G'nin virüs paketleme fonksiyonunun ve antiviral mekanizmanın bozulduğu ileri sürülmüştür. KKKA hastalığı sonucu ölen bireylerde 7SL RNA'nın ifade düzeyinin düşmesi çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 7SL RNA, A3G ve A3F proteinleri ile yapılan çalışmaların (Wang ve ark., 2007) sonuçları bulgularımızla tutarlılık göstermektedir.

Hücre içi 7SL RNA'ların çoğunluğu, SRPRNP komplekslerinin oluşumunda yer almaktadır. Bu kompleksler 7SL RNA'nın ve 6 adet SRP proteininin (SRP72, SRP68, SRP54, SRP19, SRP14 ve SRP9) her birinin bir kopyasını içerir (Egea ve ark., 2005). Serbest 7SL RNA, antiviral süreçte rol almak üzere HIV-1 virionları içine paketlenir (Onafuwa-Nuga ve ark., 2006). Özellikle SRP19'un SRPRNP kompleksinin oluşumunu desteklediği gösterilmiştir (Egea ve ark., 2005). SRP19, 7SL RNA'ya bağlanır ve bu lncRNA'da konformasyonel değişikliklere neden olabilir (Menichelli ve ark., 2007). Dolayısıyla, SRP19'un 7SL RNA'ya bağlanmasının, 7SL RNA'nın A3G'ü tanmasına engel olduğu bildirilmiştir. Wang ve ark. (2007)'ları, SRP19 proteinlerinin aşırı ifadesinin yanı sıra SRP54 veya SRP9/14'ün de A3G ve 7SL RNA arasındaki etkileşimi azalttığı sonucuna varmıştır. Sonuç olarak, SRP19'un veya diğer SRP proteinlerinin

aşırı ifadesinin A3G'nin antiviral aktivitesini azalttığı vurgulanmıştır. Nitekim virüsle enfekte olan hücrelere fazladan 7SL RNA verildiğinde, bu durumun tam tersine dönüştüğü belirtilmiştir. Sonuç olarak, 7SL RNA üzerine yapılan araştırmalar bulgularımızı desteklemektedir. Nitekim biz de çalışmamızda hasta bireylerde 7SL RNA ifadesinin azaldığı ölenlerde ise bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna vardık.

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda AST, ALT, LDH, PT, aPTT, INR gibi birkaç klinik verinin prognostik kriterler olduğu bildirilmiştir (Swanepoel ve ark., 1989). Bakır ve ark. (2012), hastalık şiddet skorlama sistemi oluşturmuşlardır. Ölümcül vakalar arasında ortalama PT ($p<0.001$), aPTT ($p=0.001$) ve INR ($p<0.001$)'nin daha uzun olduğu; ortalama ALT ($p<0.001$), AST ($p<0.001$), LDH ($p <0.001$), CPK ($p=0.004$) düzeylerinin ise daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda ise PT'si uzun ve INR'si normal değerlerin üzerinde olan hastalarda HULC ifadesinin 3 kat arttığını gözlemledik ($p=0.02$ ve $p=0.01$, sırasıyla). Bu durum klinik parametrelerin hastalığın seyrinde önemli bir belirteç olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu parametrelerin KKKA hastalığında rolü olan lncRNA'ların ifade seviyesini de etkileyebileceği gündeme gelmektedir. Hasta ve kontrol grubundaki HULC ve 7SL RNA ifade düzeyleri cinsiyete göre analiz edildiğinde ise kadınların KKKA hastalığında daha duyarlı olduğu söylenebilir. Buna ek olarak klinik parametreleri normal değerlerin üzerindeki ölen bireyler ve hastalar karşılaştırıldığında ölen bireylerde HULC ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Bu durum normalin üstündeki klinik veriler ile HULC seviyesindeki artış arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda ve ölenlerde HULC'un ekspresyonundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0.04$ ve $p<0.01$, sırasıyla). Hasta bireyler ile karşılaştırıldığında 7SL RNA ifadesinin ölenlerde azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0.03$). Ayrıca INR ve PT'si normal değerlerin üzerinde olan hastalarda HULC'un ifadesi artmıştır ($p=0.01$ ve $p=0.02$, sırasıyla). Buna ek olarak klinik parametreleri normal değerlerin üzerinde olan ölmüş bireylerde HULC artmıştır ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. KKKA hastalığının patogenezinde hem HULC hem de 7SL RNA'nın önemli biyobelirteçler olduğu ve bu lncRNA'ların terapötik hedef olma potansiyelinin yüksek olabileceği düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

- Akın, L. (2008). Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39:134-143.
- Akıncı, E., Bodur, H., Leblebicioğlu, H. (2013). Pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Vector Borne Zoonotic Dis.*13(7):429-37.
- Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., ... & Meurs, E. F. (2011). Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS pathogens*, 7(10), e1002289.
- Aune, T. M., & Spurlock, C. F. (2016). Long non-coding RNAs in innate and adaptive immunity. *Virus research*, 212, 146-160.
- Bakir, M., Engin, A., Gozel, M. G., Elaldi, N., Saadettin Kilickap, S., and Cinar, Z. (2012). A new perspective to determine the severity of cases with Crimean Congo hemorrhagic fever *J Vector Borne Dis* 49, pp. 105–110.
- Bayar, M., (2015). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinde Serum Alfa Defensin-1 Düzeylerinin Klinik seyir ve Prognoz ile İlişkisi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı tez
- Bente, D. A., Forrester, N. L., Watts, D. M., McAuley, A. J., Whitehouse, C. A., Bray, M. (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research*, 100:159–189.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816.
- Bodur, H., Akinci, E., Onguru, P., Uyar, Y., Basturk, B., Gozel, M. G., Kayaaslan, B. U. (2010). Evidence of vascular endothelial damage in Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Int. J. Infect. Dis.* 14, e704–e707.
- Boon, R. A., Jaé, N., Holdt, L. Dimmeler, S. (2016). Long Noncoding RNAs From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? 67 (10).
- Burt, F. J., Swanepoel, R., Shieh, W. J., Smith, J. F., Leman, P. A., Greer, P. W., Coffield, L. M., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J., Zaki, S. R. (1997). “Immuno histochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis”, *Arch Pathol Lab Med*, 121, 839-46.

- Buttigieg, K. R., Dowall, S.D., Findlay-Wilson, S., Miloszewska, A., Rayner, E. et al. (2014) A Novel Vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Protects 100% of Animals against Lethal Challenge in a Mouse Model. *PLoS ONE*, 9(3): e91516. doi:10.1371/journal.pone.0091516.
- Capua I. (1998) Crimean-Congo haemorrhagic fever in ostriches: A public health risk for countries of the European Union? *Avian Pathology*; 27:117-20.
- Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., Pesce, E., Ferrer, I., Collavin, L., Santoro, C., Forrest, A. R., Carninci, P., Biffo, S., Stupka, E., Gustincich, S. (2012). Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* 491, 454-457.
- Casals, J. (1969). Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 233-6.
- Cech, T. R., Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77–94.
- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 147,358-369.
- Clark, B. S., and Blackshaw, S. (2014). Long non-coding RNA-dependent transcriptional regulation in neuronal development and disease. *Front. Genet.* 5:164. doi: 10.3389/fgene.2014.00164
- Connolly-Andersen, A. M., Douagi, I., Kraus, A. A., Mirazimi, A. (2009). Crimean Congo hemorrhagic fever virus infects human monocyte-derived dendritic cells. *Virology* 390, 157–162.
- Conrad, N. K. (2016). New insights into the expression and functions of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus long noncoding PAN RNA. *Virus research*, 212, 53-63.
- Çevik, M. (2004). Kırım-Kongo Kanamalı ateşi: Klinik özellikleri. *Klimik Derg*; 17: 59-61.
- Dabo, S., & Meurs, E. F. (2012). dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. *Viruses*, 4(11), 2598-2635.
- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann., et al. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108.

- Dogancı, L. (2007). New insights on the bleeding disorders in CHF. *J Infect.*
- Du, Y., Kong, G., You, X., Zhang, S., Zhang, T., Gao, Y., ... & Zhang, X. (2012). Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26302-26311.
- Egea, P. F., Stroud, R. M., & Walter, P. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current opinion in structural biology*, 15(2), 213-220.
- Ergonul, O. (2006). Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis*, 6: 203-14.
- Ergonul, O. (2008). Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 78.
- Ergonul, O., Tuncbilek, S., Baykam, N., Celikbas A., Dokuzoguz, B. (2006). Evaluation of serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 193: 941-944.
- Ergonul, O., Whitehouse, C.A. (2007). Introduction. Ergonul O, Whitehouse CA, eds. Crimean Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Dordrecht (NL): Springer, 3-11.
- Ergonul, Ö. (2016). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Tedavisi ve Ribavirin Kullanımı, *Klinik Dergisi*; 29(1): 2-9
- Ergönül, Ö. (2006). Türkiye'de Yeni Bir Enfeksiyon: Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *STED*, 15 (6) 99.
- Ergönül, Ö. (2009). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *ANKEM Derg*, 23 (Ek 2):34-240.
- Ergönül, Ö. (2012). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Virology Current Opinion in*; 2: (215-220)
- Feng, J., Bi, C., Clark, B. S., Mady, R., Shah, P., Kohtz, J. D. (2006). The Evf-2 noncodingRNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev.* 20, 1470–1484.
- Flick, R., Flick, K., Feldmann, H., Elgh, F. (2003). “Reverse Genetics for Crimean Congo Hemorrhagic Fever” *Virus Journal of Virology*, 77, 5997-6006.
- Fortes, P. ve Morris, K. V. (2016). “Long noncoding RNAs in viral infections”, *Virus research*, 212, 1-11.

- Gack, M. U., Shin, Y. C., Joo, C. H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., ... & Jung, J. U. (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I mediated antiviral activity. *Nature*, 446(7138), 916-920.
- Geisbert, T. W., Jahrling, P. B. (2004). Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med*; 10: S110-21.
- Gibb, E. A., Brown, C. J., & Lam, W. L. (2011). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular cancer*, 10(1), 38.
- Goad, J. A., Nuyen, J. (2003) Haemorrhagic fever viruses. *Top Emerg Med*; 25:66-72.
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464, 1071–1076.
- Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR” bilimsel mektup, *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007, 27:763-767
- Hoogstraal, H. (1979). The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol*; 15(4): 307-417.
- Horner, S. M., Gale Jr., M. (2013). Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat. Med.* 19, 879–888.
- <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> (Erişim Tarihi: 25.05.2017).
- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HULC&keywords=HULC> (Erişim Tarihi: 25.05.2017).
- Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi A., et al. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol. Cell* 53, 393–406.
- Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., et al. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat. Genet.* 47, 199–208.
- Karti, S. S., Odabasi, Z., Korten, V., Yilmaz, M., Sonmez, M., Caylan, R., Akdogan, E., Eren, N., Koksal, I., Ovali, E., Erickson, B. R., Vincent, M. J., Nichol, S. T., Comer, J. A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G. (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (8), 1379–1384.

- Katsarou, K., Rao, A. L. N., Tsagris, M., & Kalantidis, K. (2015). Infectious long non coding RNAs. *Biochimie*, 117, 37-47.
- Keene, S. E., King, S. R., & Telesnitsky, A. (2010). 7SL RNA is retained in HIV-1 minimal virus-like particles as an S-domain fragment. *Journal of virology*, 84(18), 9070-9077.
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E. S., Rinn, J.L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11667–11672.
- Konstantina Katsarou a, A. L. N., Rao, b., MinaTsagris, c., Kriton Kalantidis, A. C. (2015). Infectious long non-coding RNAs *Biochimie* 117 (2015) 37-47
- Kubista M, Andrade J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind K, et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med*; 27: 95-125.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum C., Zody M. C., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*; 409: 860-921.
- Lazar, D. C., Morris, K. V., Saayman, S. M. (2015). The emerging role of long non coding RNAs in HIV infection. *Virus Res.*, In press.
- Leblebicioglu, H., Ozaras, R., Irmak, H., Sencan, I. (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: Current status and future challenges. *Antiviral Research*, 126:21-34.
- Lee, N., Moss, W. N., Yario, T. A., Steitz, J. A. (2015). EBV noncoding RNA binds nascent RNA to drive host PAX5 to viral DNA. *Cell* 160, 607–618.
- Li, G., Zhang, H., Wan, X., Yang, X., Zhu, C., Wang, A., ... & Zhao, H. (2014). Long noncoding RNA plays a key role in metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *BioMed research international*, 2014.
- Loo, Y. M., & Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680-692.
- Luo, K., T. Wang, B. Liu, C. Tian, Z. Xiao, J. Kappes, and X.-F. Yu. 2007. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J. Virol.* 81: 7238-7248.
- Ma, L., Bajic, V. B., Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*;10: 925–33.

- Mahanty, S., Bray, M. (2004). Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect. Dis.* 4, 487–498.
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E.Z., et al. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*.
- Mao, Y. S., Sunwoo, H., Zhang, B., Spector, D. L. (2011). Direct visualization of the co transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 13, 95-101.
- Mathews, M. B. (1975). Genes for VA-RNA in adenovirus 2. *Cell*, 6(2), 223-230.
- Menichelli, E., Isel, C., Oubridge, C., & Nagai, K. (2007). Protein-induced conformational changes of RNA during the assembly of human signal recognition particle. *Journal of molecular biology*, 367(1), 187-203.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat Rev Genet*; 10(3):155–159.
- Messina, J. P., Pigott, D. M., Golding, N., Duda, K. A., Brownstein, J. S., Weiss, D. J., ... & Nuttall, P. A. (2015). The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(8), 503-513.
- Midilli, K., Gargılı, A., Ergonul, Ö., Şengöz, G., Öztürk, R., Bakar, M., and Jongejan, F. (2007). Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Istanbul. *BMC Infectious Diseases*
- Nie, L., Wu, H. J., Hsu, J. M., Chang, S. S., Labaff, A. M., Li, C. W., et al. (2012). Long non coding RNAs: Versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *Am J Transl Res.*4(2):127–150.
- Noriega, V. M., Haye, K. K., Kraus, T. A., Kowalsky, S. R., Ge, Y., Moran, T. M., & Tortorella, D. (2014). Human cytomegalovirus modulates monocyte-mediated innate immune responses during short-term experimental latency in vitro. *Journal of virology*, 88(16), 9391-9405.
- Onafuwa-Nuga, A. A., Telesnitsky, A., & King, S. R. (2006). 7SL RNA, but not the 54 kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. *Rna*, 12(4), 542-546.
- Ouyang, J., Zhu, X., Chen, Y., Wei, H., Chen, Q., Chi, X., ... & Wang, G. (2014). NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through

- suppression of interferon-stimulated gene transcription. *Cell host & microbe*, 16(5), 616-626.
- Ozkurt, Z., et al. (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: Clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *J.Infect.*;52(3):207-15
- Ozturk, B., Kuscu, F., Tutuncu, E., Sencan, I., Gurbuz, Y., Tuzun, H. (2010). Evaluation of the association of serum levels of hyaluronic acid, sICAM-1, sVCAM-1, and VEGF-A with mortality and prognosis in patients with Crimean–Congo hemorrhagic fever. *J. Clin. Virol.* 47, 115–119.
- Panzitt, K., Tschernatsch, M. M. O., Guellyetal, C. (2007). “Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA,” *Gastroenterology*, 132 (1): 330-342.
- Papa, A., Weber, F., Hewson, R., Weidmann, M., Koksal, I., Korukluoglu, G., Mirazimi, A. (2015). Meeting report: First International Conference on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 120:57-65.
- Peters, C. J., Zaki, S. R. (2002). Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med* 30: S268-73.
- Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. 2013 raporları
- Schnittler, H. J., Feldman H. (2003). Viral hemorrhagic fever- a vascular disease? *Thromb Haemost*; 89: 967-972.
- Seçmeer ve ark. (2010). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *J Pediatri Inf*; 4:152-161.
- Shi, X., van Mierlo, J. T., French, A., Elliott, R. M. (2012). Visualizing the replication GC glycoprotein. *J. Virol.* 84, 8460–8469.
- Simon, M., Johansson, C., Lundkvist, A., Mirazimi, A. (2009). Microtubule-dependent and microtubule-independent steps in Crimean–Congo hemorrhagic fever virus replication cycle. *Virology* 385, 313–322.
- Simpson, D. I. H., Knight, E.M., Courtois, G., Williams, M. C., Weinbern, M. P., Kibukamusoke, J. W. (1967). Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa, human isolations and clinical notes. *East Afr Med J*, 44:87.
- Strebel, K., & Khan, M. A. (2008). APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it?. *Retrovirology*, 5(1), 55.
- Suspene, R., Sommer, P., Henry, M., Ferris, S., Guetard, D., Pochet, S. et al. (2004). APOBEC3G is a single stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reversetranscriptase. *Nucleic Acids Res.* 32: 2421-2429.

- Swanepoel, R., Gill D. E., Shepherd, A. J., et al. (1989). The clinical pathology of Crimean Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis*; 11(Suppl 4): 794-800.
- Taşdelen-Fışgın, N. (2014). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi: Patogenez ve Klinik Bulgular. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics*; 7(2):14-8
- Taşyaran, M. A., Özkurt, Z. (2004) Kırım-Kongo hemorajik ateşi: Tedavi ve korunma. *Klimik Dergisi*; 17: 157-60.
- Tian, C., Wang, T., Zhang, W., & Yu, X. F. (2007). Virion packaging determinants and reverse transcription of SRP RNA in HIV-1 particles. *Nucleic acids research*, 35(21), 7288-7302.
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, S. M., Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P. A., Blencowe, B. J., Prasanth, S. G., Prasanth, K. V. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* 39,925–938.
- Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamarast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329, 689–693.
- Türk Tabipleri Birliği Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu Birinci Baskı, Mayıs 2010, Ankara Türk Tabipleri Birliği Yayınları ISBN 978 605-5867-30 0/ https://www.ttb.org.tr/kutuphane/kirim_kongo_rpr.pdf
- Tycowski, K. T., Guo, Y. E., Lee, N., Moss, W. N., Vallery, T. K., Xie, M., & Steitz, J. A. (2015). Viral noncoding RNAs: more surprises. *Genes & development*, 29(6), 567-584.
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Sive, H., Bartel, D. P. (2011). Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell* 147, 1537–1550.
- Van de Wal, B. W., Joubert, J. R., van Eeden, P. J., King, J. B. (1985). A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part IV. Preventive and prophylactic measures. *S Afr Med*; 68:729-32.
- Wang, T., Tian, C., Zhang, W., Luo, K. Et al. (2007). 7SL RNA Mediates Virion Packaging of the Antiviral Cytidine Deaminase APOBEC3G *JOURNAL OF VIROLOGY*, 81 (23): 13112-13124.
- Wang, F. X., Huang, J., Zhang, H., Ma, X., & Zhang, H. (2008). APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1

- infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. *Journal of General Virology*, 89(3), 722-730.
- Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., Jiang, Z., Xu, J., Liu, Q., Cao, X. (2014). The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science* 344, 310–313.
- Watts, D.M. K. Siasek T.G., Linthicum, K.J., Hoogstraal, H. (1988). Crimean-Congo hemorrhagic fever. In Monath TP, editor. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Boca Raton, FL, USA: CRC.
- Whitehouse, C. A. (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *AntiviralRes*;64:145-205.
- Woodall, J. P., Williams, M.C., Simpson, D. I. (1967). Congo virus: A hitherto undescribed virus occurring in Africa. II. Identification studies. *East Afr Med J* 44: 93-8.
- www.dicle.edu.tr/Contents/67ed41bc-9585-454e-8a381a582cb769a7.pdf (Erişim: 17.01.2017).
- Xiao, X., Feng, Y., Zhu, Z., Dimitrov, D. S. (2011). Identification of a putative Crimean Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 253–258.
- Xie, H., Ma, H., Zhou, D. (2013). Plasma HULC as a Promising Novel Biomarker for the Detection of Hepatocellular Carcinoma *BioMed Research International* Volume.
- Yao, H., Brick, K., Evrard, Y., Xiao, T., Camerini-Otero, R. D., Felsenfeld, G. (2010). Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes Dev.* 24, 2543–2555.
- Yoon, J. H., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Yang, X., Martindale, J. L., De, S., Huarte, M., Zhan, M., Becker, K. G., Gorospe, M. (2012). LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol. Cell* 47, 648–655.

İZİNLER

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında HULC ve 7SL RNA İfade Düzeylerinin Araştırılması
-----------------------	--

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başhekimlik Girişi Kampüsü, TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 258 00 25
	FAKS	0 346 258 00 24
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Serdal Arslan			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yüksek lisans tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülşay Yıldırım
İmza:



GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında HULC ve 7SL RNA İfade Düzeylerinin Araştırılması
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
DIĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2016-03/10	Tarih: 25.03.2016		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmaman/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmaman/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Gülay Yıldırım

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şahande Elagöz	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Dr. Serpil Değerli	Parazitoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Prof. Dr. Naim Nur	Halk Sağlığı	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Doç. Dr. Diğdem Eren	Diş Hastalıkları ve Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Doç. Dr. Sulhattin Arslan	Göğüs Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			
Doç. Dr. Zehra Gölbaşı	Doğum-Kadın Hastalıkları Hemşireliği	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimler Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>			
Yrd. Doç. Dr. Pakize Cantürk Kılıçkaya	Eczacılık Farmasötik Biyoteknoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczalık Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>			

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülay Yıldırım
İmza:

GENETİK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Kırım kongo kanamalı ateşi hastalığının seyrini etkileyen genetik (kalıtsal) nedenleri bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi "Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında HULC ve 7SL RNA İfade Düzeylerinin Araştırılması" dır.

Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda bu hastalık ile ilgili bir araştırma gerçekleştirilecektir. Araştırmada kanı kullanılacak gönüllü sayısı 100'dür. Araştırmanın tahmini tamamlanma süresi 1 yıldır. Bu çalışmada daha önceki çalışma için alınmış olup, geriye kalan kan örneğinizden genetik materyal, RNA elde edilecektir. Sonuçta elde edilen RNA ile hastalık arasındaki ilişki incelenecektir.

Eğer bu araştırmada önceki çalışmadan kalan kan örneğinizin kullanılmasını kabul ederseniz bu kayıtlar hastalığın seyrinin bilinmesine yardımcı olacaktır ve kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılacaktır. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmada daha önce alınmış olan kanınızın kullanılması için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, tarafınıza derhal bildirilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz, ilgili genetik hastalığın seyrinin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalıkta geline noktanın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi, ileride bu hastalıktan etkilenecek bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirseniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz

yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden araştırıcı sorumludur.

Daha önce alınmış olan kan örneğinin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örneği bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

Veya

Bu bilimsel araştırma sırasında kan örneklerinin tamamı kullanılmayıp bir bölümü benzeri araştırmalarda kullanılmak üzere saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

() Kan, DNA ve RNA örneklerinin sadece bu çalışmayla ilgili olarak kullanılmasını istiyorum. Çalışma bitiminde kalan örneklerin uygun şekilde yok edilmesini istiyorum. İleride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

() Kan, DNA ve RNA örnekleri bu çalışmada kullanıldığı gibi gelecekteki hastalığımla ilgili diğer bilimsel çalışmalarda kullanılabilir. Ancak kalan örneklerimin hastalığım dışındaki başka bir araştırmada kullanılmasını uygun bulmuyorum.

() Tarafımdan alınan kodlanmış örneğın yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

() Tarafımdan alınan kodlanmış örneğın, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

() Tarafımdan alınan kodlanmış örneğın önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Prof. Dr. Mehmet Bakır (Doç. Dr. Aynur Engin) tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı.

Araştırmada sırasında hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan

çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “daha önceden alınmış olan kan örneğimin kullanılması” kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

2.4.7. GÖNÜLLÜNÜN		2.4.8. İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		2.4.9. İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		2.4.11. İMZASI
2.4.10.		
<i>ADI & SOYADI</i>		
<i>TARİH</i>		

2.4.12. GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		2.4.13. İMZASI
<i>ADI & SOYADI</i>		
<i>GÖREVİ</i>		
<i>TARİH</i>		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Burcu BAYYURT
Doğum Yeri ve Tarihi	Erzurum-1988
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	ebayyurt@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu

Lisans	Atatürk Üniversitesi, 2006
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Görevlisi, 2015-