

Şap Virüsü İzolasyonu ve Teşhisi için Fetal Sığır Dilinden Hücre Hattı Oluşturulması ve Karakterizasyonu

Şükran Yılmaz

DOKTORA TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Ekim 2019

Establishment and Characterization of Fetal Bovine Tongue Cell Line for Detection and
Isolation of Foot and Mouth Disease Virus

Şükran Yılmaz

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biotechnology and Biosafety

October 2019

Şap Virüsü İzolasyonu ve Teşhisi için Fetal Sığır Dilinden Hücre Hattı oluşturulması ve
Karakterizasyonu

Şükran Yılmaz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Didem Turgut Coşan

Bu Tez,

TÜBİTAK tarafından 1059B141500935 numaralı 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs
Programları kapsamında desteklenmiştir.

Ekim 2019

SEVGİLİ ANNEM, ONURCAN'IM VE MERT CANIM'A

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Şükran YILMAZ'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı “Şap Virüsü İzolasyonu ve Teşhisi için Fetal Sığır Dilinden Hücre Hattı Oluşturulması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Didem Turgut Coşan

İkinci Danışman: -

Doktora Tez Savunma Jürisi

Üye: Prof. Dr. Didem Turgut Coşan

Üye: Prof. Dr. Ahmet Çabuk

Üye: Doç. Dr. Pınar Aytar Çelik

Üye: Prof.Dr. Feray Alkan

Üye: Doç. Dr. Feyzan Özdal Kurt

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
.....sayılı kararıyla onaylanmıştır

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Şap Virüsü İzolasyonu ve Teşhisi için Fetal Sığır Dilinden Hücre Hattı Oluşturulması ve Karakterizasyonu” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu, tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı, tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun olarak elde ettiğimi, tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallarına göre sunduğumu beyan ederim.

Tez çalışmasında primer kültürlerin kurulumunda kullanılan ve mezbahadan temin edilen sığır fötüsü dil materyalleri ve çalışmaları için Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hayvan Deneyleti Etik Kurul Başkanlığından 93369491. HDYEK-604-7 protokol numaralı izni alınmış, ‘Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi’ ve ‘Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi’nde yer alan tüm şartlara uyulmuştur. 21.10.2019

Şükran YILMAZ

ÖZET

Bu tez çalışması ile şap virüsüne duyarlı, şap hastalığının teşhisini ve şap virüsünün izolasyonunu daha etkin kılacak alternatif yeni hücre hatları oluşturulması hedeflenmiştir. Böylece, hem bu hücre hatlarının hastalığın doğal konakçısı ile aynı homolojiye sahip olması hem de ilk enfeksiyon belirtilerinin görüldüğü ve enfeksiyona duyarlı bir organ olan dilden hazırlanması nedeniyle şap virüsünün teşhisine ve izolasyonuna daha etkin katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Çalışmanın birinci aşamasında, mezbahadan alınan yaklaşık 5 aylık sığır fötüsü dilinden, güvenli laboratuvar koşullarında hazırlanan primer kültürün ayırıştırma ve saflaştırılmasıyla, sonlu epitelyal ve fibroblast hücre hatları oluşturulmuştur. İkinci aşamasında, oluşturulan bu iki yeni hücre hattının karakterizasyonları kapsamında, mikrobiyal ve viral sterilite, büyüme karakteristiği, tür orijini doğrulaması, doku orijini doğrulaması testleri ve şap virüsü için spesifik hücresel reseptörlerin varlığının tespiti yapılarak tanımlı hücre hatları haline getirilmişlerdir. Üçüncü aşamasında ise yeni hücre hatlarının şap virüsü laboratuvar suşlarına ve (A TUR/11, O TUR/07 ve Asia1/11) ve BHK 21 An₃₁ hücre hattında negatif olan 20 adet saha suşuna olan duyarlılıkları incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda, FBTEC hücre hattının ömrünün 10 pasaj olduğu, FBTFC hücre hattının ise 60. pasaja kadar çoğaldığı görülmüştür. Yapılan virüs duyarlılık testlerinde, her iki yeni hücre hattının da kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattına göre ya eşdeğer ya da daha duyarlı olduğu görülmüştür. Ancak FBTEC hücre hattının ömrünün çok sınırlı olması bu hücre hattının uzun süreli kullanılabilirliğini sınırlamaktadır. FBTFC hücre hattı ise hem uzun süre pasajlanabilir olması hem de diploit hücre özelliğiyle atasal özelliklerini korumasından dolayı, iyi bir bankalama stratejisi ile daha uzun yıllar kullanılabilir yeni ve alternatif bir hücre hattı olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hücre hattı kurulumu ve karakterizasyonu, sonlu hücre hattı, şap virüsü, teşhis, virüs izolasyonu

SUMMARY

In this thesis, new cell lines susceptible to foot and mouth disease virus (FMDV) development, for diagnosis and isolation was aimed. These cell lines were prepared from the natural host's tongue where the first typical symptoms appear. In the first stage of the study, fibroblastic (FBTFC) and epithelial (FBTFC) finite cell lines were formed from a 5 months old bovine fetus's tongue in accordance with safe laboratory conditions. In the second stage, sterility, growth characteristics, purity, species and tissue origin verification, specific FMDV receptors determination were done within the scope of the new cell lines' characterization. In the third stage, susceptibility to laboratory strains were examined in terms of antigenicity-infectivity titers, infectivity period and plaque characters. 20 field strains, FMDV positive with PCR but negative in BHK 21 An₃₁ cells were tested with the new cells. CPE detection and serotyping for FMDV were done after 3 blind passages and if any, performed by qRT-PCR. The results revealed that degenerations and proliferation defects started in the FBTEC cell line after the 10th passage in parallel with prolonged doubling time. FBTFC cell line reached to the 60th passage with no morphological and proliferation problem. Both novel cell lines were either equivalent or more sensitive than BHK 21 An₃₁ to FMDV. However, short lifespan of the FBTEC cell line limits its long-term usability. The FBTFC is a new cell line which can be used for years with a good banking strategy because of its longer passage life and maintaining its ancestral properties with diploid cell feature.

Keywords: Cell line establishment and characterization, finite cell line, foot and mouth disease virus, diagnosis, virus isolation

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamı gerçekleştirirken beni destekleyen ve yüreklendiren başta tez danışmanım Prof.Dr.Didem Turgut Coşan ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Ahmet Çabuk hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın karakterizasyon çalışmaları aşamasında imkanlarını ve yardımlarını esirgemeyen Leibniz Enstitüsü-DSMZ (Almanya), İnsan ve Hayvan Hücre Kültürleri Bölümünden, başta sorumlu danışmanım Dr.Sonja Eberth olmak üzere Prof.Dr.Hans Drexler, Dr.Wilhelm Dirks, Dr.Cord C. Uphoff, Dr.Claudia Pommerenke, Dr.Roderick A.F MacLeod, Yvonne Merkhoffer, Maren Kaufmann, Silke Fähnrich ve Sabine A. Denkmann'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında Şap Enstitüsü olanaklarını ve desteklerini esirgemeyen Şap Enstitü Müdürlüğü'ne saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarımın gerçekleştirilmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Şap Enstitüsü Müdürlüğü'den çalışma arkadaşlarım Yasemin Gültekin, Müslüm Kaan Arıcı, Haydar Karadaş, Burak Küçük, Ali Özdemir, Ayşenur Ulusoy, Gül Nazik Müftüoğlu, Erdi Kaya ve kendi bölümüm olan Hücre Bölüm Başkanlığındaki çalışma arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım Prof.Dr.S.İsmet Deliloğlu Gürhan'a, Dr.Nilay Ünal'a ve Dr.Gülnur Kalaycı'ya sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman maddi ve manevi desteği ile yanımda olan değerli aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin tez çalışması aşamasında beni destekleyen TÜBİTAK BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı)'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
2.1. Şap Hastalığı.....	5
2.2. Şap Hastalığı Etkeni	6
2.3. Şap Hastalığı Teşhisi ve Mücadelesi.....	9
2.4. Şap Hastalığı Teşhis ve İzolasyonunda Kullanılan Hücre Kültürleri.....	11
2.5. BHK 21 (Yavru Hamster Böbrek) Hücre Hattı.....	11
2.6. Şap Virüsü Hücresel Reseptörleri	14
2.6.1. İntegrinler	18
2.6.2. Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPGs)	24
2.7. Hücre Kültürlerinin Kurulumu ve Tanımlanmaları.....	25
2.8. Hücre Kültürlerinin Karakterizasyonu	30
2.8.1. Mikrobiyal ve viral kontaminatlar yönünden güvenlik	31
2.8.2. Hücre morfolojisi.....	33
2.8.3. Hücre büyüme kinetiği	34
2.8.4. DNA barkodlama.....	35
2.8.5. Karyotip	37
2.8.6. Transkriptom analizi	37
2.8.7. Doku orijinin immünohistokimya ile tanımlanması.....	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Sığır fötüsü	42
3.1.2. Kontrol grubu hücre hatları	42

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.3. Şap virüsleri	43
3.1.4. Saha materyalleri	43
3.1.5. Besi ortamları.....	44
3.1.6. Serum.....	44
3.1.7. Antikorlar.....	44
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Primer kültürün kurulumu	45
3.2.2. Subkültürasyon ve fibroblast ve epitel hücrelerinin ayrıştırılması	45
3.2.3. Hücre hatlarının mikoplazma ve viral kontaminatlar yönünden sterilite testleri.....	49
3.2.3.1. <u>Mikoplazma ajanı yönünden sterilite testi</u>	49
3.2.3.2. <u>Viral kontaminantlar yönünden sterilite testi</u>	51
3.2.4. Hücre hatlarının morfolojileri.....	53
3.2.5. Hücre büyüme kinetiği	54
3.2.6. DNA barkodlama.....	54
3.2.7. Karyotip ve Tripsin G-Bantlama (GTG)	57
3.2.8. İmmünoboyama	60
3.2.9. Transkriptom analizi (RNA dizileme=RNAseq)	61
3.2.10. Şap virüsü hücre reseptörlerinin kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile tayini	62
3.2.11. Şap virüsü laboratuvar suşlarının FBTEC ve FBTEC hücre hatlarında enfektivite süresi tayini	66
3.2.12. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarından elde edilen şap virüsü laboratuvar suşlarının 146S antijenik partikül miktarlarının tayini	66
3.2.13. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarında şap virüsü laboratuvar suşlarının plak test ile enfektivite titrelerinin tayini	67
3.2.14. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının şap virüsünün saha izolatlarına karşı duyarlılık testi	68

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.15. Hücre pasajları yapılan saha materyallerinde çoklu qRT-PCR ile şap virüsü serotiplerinin belirlenmesi	70
3.2.16. İstatiksel Değerlendirmeler.....	72
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	73
4.1. Epitelyal ve Fibroblast Hücrelerinin Sığır Fötüsü Dili Primer Kültüründen Saflaştırılması Sonuçları	73
4.2. Hücre Hatlarının Mikoplazmal ve Viral Kontaminatları Yönünden Sterilite Test Sonuçları.....	75
4.3. Hücre Büyüme Kinetiği Sonuçları	77
4.4. DNA Barkodlama İle Hücre Hatlarının Tür Orijini ve Saflığı Sonuçları	81
4.5. Karyotip ve Tripsin G-Bantlama (GTG) İle Hücre Hatlarının Kromozom Analizi Sonuçları.....	83
4.6. FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarının İmmünoboyama Sonuçları	86
4.7. Transkriptom Analizi İle FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarının Tür Orijini, Doku Orijini Ve Şap Virüsü Hücre Reseptörleri İfadesinin Sonuçları.....	89
4.8. Şap Virüsü Hücre Reseptörleri İçin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	94
4.9. Şap Virüsü Laboratuvar Suşlarının FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarında Çalışma Süresinin Tayini	95
4.10. FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarından Şap Virüsü Laboratuvar Suşlarının Plak Test İle Enfektivite Titrelerinin Tayini	97
4.11. FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarından Elde Edilen Şap Virüsü Laboratuvar Suşlarının 146S Antijenik Partikül Miktarlarının Tayini Sonuçları	99
4.12. Hücre Pasajları Yapılan Saha Materyallerinde Çoklu qRT-PCR ile Şap Virüsü Serotiplerinin Değerlendirme Sonuçları	102
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR DİZİNİ	110
EK AÇIKLAMALAR.....	128

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

Ek Açıklama-A: Etik kurulraporu.....	129
Ek Açıklama-B: FBTEC DNA barkodu elektroferogramı.....	131
Ek Açıklama-C: FBTEC DNA barkodu elektroferogramı.....	132
Ek Açıklama-D: FBTEC hücre hattının DNA barkodlama ile kimliklendirme sertifikası...	133
Ek Açıklama-E: FBTEC hücre hattının DNA barkodlama ile kimliklendirme sertifikası...	134
ÖZGEÇMİŞ.....	135

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Şap virüsü kapsidi ve kapisidi oluşturan alt birimlerin ve GH ilmeğinin şematik gösterimi	7
2.2. Şap virüsü genomunun şematik diyagramı, viral polipeptidin işlenmesi ve yapısal proteinlerin uyumu	8
2.3. BHK 21/C13 hücresinin faz kontrast invert mikroskop görüntüsü	13
2.4. Şap virüsünün hücresele reseptör bağlanma bölgelerinin şematik modeli.....	14
2.5. Şap virüsünün reseptör-aracılı endositozla hücreye girişi ve sitoplazmada replikasyonunun şematik gösterimi.	16
2.6. Tanımlanmış 24 integrin heterodimeri ve sınıflandırılmaları.....	19
2.7. İntegrin altünitelerinin yapısı	20
2.8. İntegrin heterodimerinin etkileşimde olduğu hücre iskeleti ve hücre dışı matris molekülleri	21
2.9. Hücre yüzeyi ve hücre dışı HSPG'ler	25
2.10. İn vitro sistemlerdeki hücre hattı tipleri ve ilişkileri	28
2.11. Hücre morfoloji tipleri.....	33
2.12. Büyüme eğrisi ve fazları.....	35
2.13. Mitokondriyal genom ve CO1 geninin pozisyonu	37
3.1. Epitel dokunun tabakaları.....	45
3.2. 146S tayini absorbans grafiği.....	67
4.1. Sığır fötüsü dili primer kültürü pasaj 0'ın doku kültürü mikroskopu görüntüsü.....	73
4.2. Sığır fötüsü dili fibroblast hücrelerinin 5.pasajı doku kültürü mikroskopu görüntüsü	74
4.3. Sığır fötüsü dili epitel hücrelerinin 5.pasajı doku kültürü mikroskopu görüntüsü.....	74
4.4. Hücre hatlarının mikoplazma ajanı için DAPI floresan çekirdek boyaması floresan mikroskop görüntüsü.....	75
4.5. Hücre hatlarının mikoplazma ajanı yönünden PCR testi sonuçları.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6. Hücre hatlarının BVD viral ajanı yönünden İFAT sonuçları	76
4.7. Hücre hatlarının BPV3 ve MVM viral ajanları yönünden PCR testi sonuçları	76
4.8. FBTEC hücre hattı doku kültürü mikroskop görüntüsü	77
4.9. FBTEC hücre hattının pasajlara göre büyüme eğrileri ($p<0.05$)	78
4.10. FBTEC hücre hattının popülasyon ikiye katlanma zamanı ($p<0.05$)	78
4.11. FBTEC hücre hattının doku kültürü mikroskop görüntüsü	79
4.12. FBTEC hücre hattının pasajlara göre büyüme eğrileri ($p<0.05$)	80
4.13. FBTEC hücre hattının popülasyon ikiye katlanma zamanı ($P<0.05$)	81
4.14. PCR sonucu elde edilen CO1 geninin 658 bp'lik korunmuş gen bölgesi amplikonların jel elektroforezdeki 658 bp bandındaki görüntüleri.....	82
4.15. FBTEC hücre hattı mitokondriyal DNA CO1 geninin 658 bp'lik bölgesinin sekansı	82
4.16. FBTEC hücre hattı mitokondriyal DNA CO1 geninin 658 bp'lik bölgesinin sekansı	83
4.17. Hücre hatlarının 50 adet metafaz plağında kromozom dağılımları ve karyotipi.....	83
4.18. FBTEC hücre hattının 5. pasajdaki metafaz plağı ve karyotipi.....	85
4.19. FBTEC hücre hattının 5. pasajdaki metafaz plağı ve karyotipi.....	86
4.20. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının ve kontrol grubu hücre hatlarının sitokeratin 8 (CK8) intermediyer filamentleri için immünoboyaması	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.21. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının ve kontrol grubu hücre hatlarının sitokeratin 18 (CK18) intermediyer filamentleri için immünoboyaması	88
4.22. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının ve kontrol grubu hücre hatlarının vimentin intermediyer filamentleri için immünoboyaması	89
4.23. FBTEC (epitelyal) ve FBTFC (fibroblast) hücre örneklerinin total RNA elektroferogram görüntüleri	90
4.24. FBTFC (fibroblast) ve FBTEC (epitelyal) örneklerinin mRNA dizilemesi için uyum verimliliği.....	91
4.25. FBTFC (fibroblast) ve FBTEC (epitelyal) örneklerinden elde edilen mRNA dizilimi verilerinin ve yayınlanmış veriler olan Ovi1 ve Ovi2'nin PCA analiz grafiği	92
4.26. RNAseq ile epitelyal ve fibroblastik doku proteinlerinin gen ifadeleri grafiği.....	93
4.27. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarında şap virüsü hücre reseptörlerinin RNA sekanslama ile gen ifadesi sonuçları	94
4.28. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarında şap virüsü hücre reseptörlerinin qRT-PCR ile ifadesi sonuçları	95
4.29. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An ₃₁ hücre hattındaki plak morfolojileri.....	97
4.30. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An ₃₁ hücre hatlarına göre enfektivite titre grafiği.....	98
4.31. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An ₃₁ hücre hatlarına göre 146S antijenik partikül miktarları (p<0.05)101	101
4.32. Saha virüslerinin FBTEC hücre hattında 3 seri pasajı sonrası kristal viyoleto boyaması	103
4.33. Saha virüslerinin FBTFC hücre hattında 3 seri pasajı sonrası kristal viyoleto boyaması	104
4.34. Saha virüslerinin BHK 21 An ₃₁ hücre hattında 3 seri pasajı sonrası kristal viyoleto boyaması	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Virüsler ve reseptör grupları.....	17
2.2. İntegrinler ve ligandları	22
3.1. Şap virüsü içeren saha materyalleri bilgi tablosu	43
3.2. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının Mikoplazma ajanı testinde PCR amplifikasyonu için karışım	50
3.3. Mikoplazma testi için PCR numunelerini hazırlama tablosu	50
3.4. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının viral ajan testinde PCR amplifikasyonu için karışım	58
3.5. MVM ve BPV3 aranmasında PCR amplifikasyonu numunelerinin hazırlanma Çizelgesi.....	53
3.6. DNA barkodlama CO1 PCR amplifikasyonu için karışım.....	55
3.7. DNA barkodlama sekans ve kapiller elektroforez için SP6 promotör primer PCR karışımı	56
3.8. Hipotonik solüsyon konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri tablosu.....	58
3.9. . Tripsin G-Bantlama için solüsyonlar.....	59
3.10. İmmünoboyamada kullanılan primer antikorlar	60
3.11. qRT-PCR için şap virüsü hücre reseptörleri primer dizileri.....	64
3.12. Mpx-qRT-PCR ile şap virüsü tip tayini için primer seti.....	71
3.13. Mpx-q-RT-PCR ile şap virüsü tip tayini için prob seti.....	71
3.14. Mpx-q-RT-PCR örnek primer ve prob derişimleri.....	71
4.1. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTEC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An ₃₁ hücre hattındaki enfektivite süreleri	96
4.2. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTEC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An ₃₁ hücre hattındaki enfektivite titre değerleri tablosu	98

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

- 4.3. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFc hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattındaki 146S antijenik partikül miktarları tablosu.....100
- 4.4. Şap virüsü şüpheli saha örneklerinin FBTEC ve FBTFc hücre pasajları sonrası qRT-PCR sonuçları.....102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$\Delta\Delta CT$	Delta delta döngü eşiği

Açıklama

Kısaltmalar

3T3	Fare embriyo fibroblast hücre hattı
9 CFR	Hayvan ve hayvan ürünleri için “The Code of Federal Regulations”
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
An	Ankara
ANOVA	Varyans analizi
BHK 21	Yavru hamster böbrek hücre hattı
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPV3	Sığır parvovirüs tip 3
BTY	Sığır tiroid hücresi
BVD	Sığır viral ishal hastalığı
CBOL	Yaşamın barkodlanması konsorsiyumu
cDNA	Komplementer DNA
CFR	ABD federal regülasyonlar kodu
CHO	Çin hamster ovaryum hücre hattı
CK	Sitokeratin
CME	Klatrin aracılı endositoz
cm ²	Santimetre kare
CO1:	Sitokrom C oksidaz 1 geni
COL1A1	Kollajen tip 1 alfa1 zinciri
COLO-849	İnsan melenoma hücre hattı
CPE	Sitopatolojik etki
CT	Döngü eşiği
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium/nutrient nixture F-12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSMZ	Alman mikroorganizma ve hücre kültürü koleksiyonu
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzim-Bağlı immünosorbent test
EMBL-EBI	The European Molecular Biology Laboratory - The European Bioinformatics Institute
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FASTA	Metin tabanlı dizileme dosyası
FBS	Fetal sığır serumu
FBTEC	Sığır fötüsü dil epitel hücresi
FBTFC	Sığır fötüsü dil fibroblast hücresi
FITC	Floresan izosiyanat
FLK-BLV-044	Koyun embriyonal böbrek hücre hattı
FMD	Şap hastalığı
FMDV	Şap hastalığı virüsü
FTM	Fluid thioglycollate medium
GAG	Glikozaminoglikan
GMEM	Glasgow minimum esential medium
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTG	Tripsin G-Bantlama
HPSGs	Heparan sülfat proteoglikanlar
IB-RS-2	Domuz böbrek hücre hattı
IBOL	Uluslararası Yaşamın Barkodlanması organizasyonu
IgG	Immünglobulin G
HS	Heparan sülfat
ICAM	Hücreiçi adezyon molekülü
ICC	İmmünohistokimya

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
İFAT	İmmün floresan antikor teniği
IRES	İnternal ribozomal giriş bölgesi
KRT	Keratin
KYSE 410	İnsan özofangial skuamöz hücreli karsinoma hücre hattı
LFBK	Domuz böbreği hücre hattı
LI-CAM	Ligand uyarılı hücre adezyon molekülü
MDBK	Madin-Darby sığır böbrek hücre hattı
mRNA	Mesajcı RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MVM	Fare minute virüsü
NGS	Yeni nesil dizileme
Na ₂ EDDA	Edetate disodium dihydrate
OIE	Dünya hayvan sağlığı örgütü
ORF	Açık okuma bölgesi
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PCA	Ana Bileşen Analizi
PDT	Popülasyon ikiye katlanma zamanını
pfu	Plaque forming unite
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDZ	“Postsynaptic density protein, disc-large, zonulin-1”
PECAM	Trombosit hücre adezyon molekülü
RGD	Arg-Gly-Asp tripeptit
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
RNAseq	RNA sekanslama
rpm	Dakidaki devir sayısı
S100A4	Fibroblast spesifik protein / kalsiyum bağlama proteini

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SAT 1 serotipi	“Southern African Territories” 1 serotipi
SAT 2 serotipi	“Southern African Territories” 2 serotipi
SAT 3 serotipi	“Southern African Territories” 1 serotipi
SDC	Sindekan
SK	Domuz böbrek hücre hattı
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SOP	Standart operasyon prosedürü
TRITC	Tetrametil rodamin izosiyanat
TSB	Tryptone soya broth
TUR	Türkiye
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UTR	Kodlanmayan bölge
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
VIM	Vimentin
VP1-4	Viral kapsit protein 1-4
Vpg	Viral genom proteini
ZZR-127	Keçi dili epitel hücre hattı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Şap hastalığı, oldukça bulaşıcı ve çoğu durumda orta ile düşük mortalite ve yüksek morbidite salgınlarına neden olan, hayvan ve hayvansal ürün ticaretini sınırlayan en önemli hayvan hastalığıdır (Rodriguez ve Grubman, 2009). Hastalık geviş getiren çift tırnaklı evcil (sığır, koyun, keçi, vb.) ve yabanıl hayvanlarda görülmekte olup, belirtileri, hayvanlarda dil ve ağızın mukoza tabakasında, ayaklarda çatal aralarında, burun ve memelerde veziküllerin oluşumu ile karakterizedir (Sütçü, 1986; Fenner, 1987). Hastalık etkeni, Picornaviridae familyasının, Aphthovirüs cinsi içinde yer alan şap virüsüdür. Virüsün kapsid proteinlerinin antijenitesine göre serolojik olarak bilinen 7 serotipi (A, O, Asia, C, SAT1, SAT2, SAT3) olup, 67'den fazla alt tipi mevcuttur (Bachrach, 1968; Chakraborty vd., 2014). Ülkemizde endemik olarak virüsün A, O ve Asia serotipleri görülmektedir (Sütçü,1986).

Şap hastalığı ile mücadelede aşılama, kesim ve karantina stratejileri ayrı ayrı veya beraberce uygulanır. Hastalığın endemik olarak seyrettiği bölgelerde ise mücadelede etkili yöntem kesim ve aşılama değildir. Bu nedenle aşılamanın şap hastalığı ile mücadelede çok önemli bir yeri vardır. Bu bağlamda, günümüzde endüstriyel düzeyde devamlı hücre kültürleri kullanılarak, milyonlarca doz aşının üretilmesi, hastalığın yaygınlığını ifade etmek açısından önemlidir. Knight-Jones ve Rushton'a göre 2013 yılında hayvanlara yaklaşık 2,35 milyar dozluk şap aşısı uygulanmıştır (Puckette vd., 2017). Ülkemizde de hastalıkla mücadele, ilkbahar ve sonbahar olmak üzere, yılda iki defa uygulanan aşılama programı ile yapılmakta olup, 2018 yılında Şap Entitüsü'nde 119.962.700 monovalan doz aşı üretilmiştir. Ayrıca etken virüsün, birbirine karşı immünite sağlamayan serotiplere ve alt tiplerine sahip olma özelliği, aşılama söz konusu olduğunda büyük bir önem kazanmaktadır (Bartelling, 2002). Aşının etkinliği ise sahada seyreden virüs tipiyle yakından ilgilidir. Virüs tipleri aşı içindeki virüs tiplerinden uzaklaşmış ya da yeni bir alt tip ise, hastalık etkeni olan virüsün izolasyonu, tiplendirmesi, mevcut aşı suşunun bu tipi koruyup korumadığı gibi birçok çalışmayı mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirerek, yeni aşı suşu ve bu suşla yeni aşının hazırlanması süreci büyük bir önem kazanır. Bu süre zarfında hastalığın yeni bir tipe ait olduğu ihtimali göz önünde bulundurularak, sahada acil eylem planı uygulanır. Bu aşamalarda sahada seyreden yeni ya da şüpheli şap virüsü tipinin izolasyon ve teşhis süreçleri önem arz etmektedir. Hastalık etkeni ne kadar kısa sürede izole edilir ve

tanımlanırsa hastalıkla mücadelede de o kadar zamandan kazanılmış olur (Zabal ve Fondevila, 2013).

Günümüzde, şap virüsünün saha izolatlarından teşhisinde bazı hızlı moleküler tekniklerden (PCR ve PCR tipleri) faydalanılmasına rağmen bu teknikler ancak materyaldeki virüs miktarı yeterli olduğunda iyi sonuç verebilmektedir. Virüsün yetersiz olduğu materyallerden teşhis edilme çabaları, izolasyonu, yeni suştan aşı hazırlanmasının gerekliliğinin olup olmadığı kararının verilmesi sürecini geciktirebilmektedir. Bu nedenle virüs izolasyon ve teşhis protokolünün maksimum hassasiyetle dizayn edilmesi gerekmektedir (LaRocco vd., 2013). Bu bağlamda teşhiste moleküler teknikler ve hücre kültürünün birlikte kullanılması daha iyi bir strateji olarak görülmektedir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) direktiflerinde de hastalık etkeninin izolasyon yöntemlerinde, hücre kültürü sistemleri temel olarak görülmektedir (OIE, 2019). Ayrıca, hücre kültürlerinde virüs izolasyonu yöntemi diğerlerine göre yavaş olmasına rağmen vazgeçilemez bir yöntemdir, çünkü ileri çalışmalar için gerekli olan virüs materyali de bu yöntemle sağlanabilmektedir (Zabal ve Fondevila, 2013). Bu amaçla sahadan hasta hayvanlardan alınan ve içinde hastalık etkeni virüsün olduğu düşünülen doku materyallerinden hazırlanan inokülümleden hücre kültür sistemlerinde virüsler izole edilir ve aşı suşu haline getirilirler (OIE, 2019)

OIE'nin şap hastalığının teşhisi ile ilgili direktiflerinde primer sığır tiroit (BTY) hücre kültürü, diğer primer kültürler arasında ilk sırada yer almaktadır. Ancak, BTY pasajlandığında ve dondurulduğunda şap virüsüne karşı olan hassasiyetini kaybetmektedir. Ayrıca primer hücre kültürlerinin devamlı olarak taze hazırlanması ve kullanılması ise zor ve masraflı bir işlemdir (Fukai vd., 2013). Bu nedenle teşhiste, primer hücre kültürleri kadar hassas olmasa da BHK 21, IB-RS-2, SK-6, ZZR-127, PK-15 (Barteling 2002; Clarke ve Spier 1980; Radlett 1987) ve LFBK (LaRocco, 2013) yaygın olarak kullanılan devamlı hücre hatlarıdır. Ancak bu sayılan hücre hatları arasında hastalığın büyük hedef kitlesi ve şap virüsünün doğal konakçılarından olan sığırlarla homolog kökenli bir hücre hattı bulunmamaktadır. Ayrıca, bu devamlı hücre kültürlerinin hepsi bütün serotiplere karşı aynı hassasiyeti göstermemektedir (LaRocco, 2013). Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nde de dünyanın birçok yerinde olduğu gibi rutin teşhiste hücre kültürü olarak, BHK 21 devamlı hücre hattı kullanılmaktadır.

Devamlı hücre hatlarının primer hücre kültürlerine göre hassasiyetlerinin az olması, primer kültürlerin hazırlanmasındaki güçlükler de düşünüldüğünde ara basamakta olan sonlu hücre hatları avantajlı hale gelmektedir. Belirli bir ömüre sahip sonlu hücre hatlarının kendine özgü maksimum bölünme ya da katlanma sınırı vardır. Bu sınırı Hayflick yaptığı çalışmalar sonucunda bulduğu için Hayflick Sınırı olarak da adlandırılır ve genelde de bu sınır memeli hücreleri için ortalama 40-60 bölünme olarak öngörülür (Hayflick ve Moorehead, 1961; Shay ve Wright, 2000). Sonlu hücre hatlarının sınırlı ömürlü olmasına rağmen, iyi ve yoğun bir hücre bankalaması yapıldığında, hem uzun süre kullanılabilme imkanının olması, hem de devamlı hücre hatlarına göre orijin açısından primer kültüre yakınlıkları nedeniyle, şap virüsünün teşhis ve izolasyonunda öncelikli hale gelebilirler.

Hayvan hücre hatları, temel hücre biyolojisi, genetik haritalama, gen ekspresyonu ve gen tedavisi gibi çeşitli disiplinlerdeki bilim insanları, *in vitro* sistemler ve araçlar için önemlidir. Bu faaliyetlerde, hücre hattı doğrulama ve karakterizasyonu çok önemli bir aşamadır. Hücre hattı doğrulama ve karakterizasyonu artık morfoloji, mikrobiyal kontaminasyonlar, hücresel çapraz kontaminasyon ve işlevsellik gibi sistematik testler için birkaç tamamlayıcı teknolojiyi kullanan kapsamlı bir strateji gerektirmektedir. Araştırma verilerinden elde edilen sonuçların geçerliliği, hücre hattı kimliği ve fonksiyonunun tutarlı ve kesin olarak doğrulanmasına bağlıdır. Kötü veya yanlış tanımlanmış hücre hatları nedeniyle oluşan maddi zararın milyonlarca dolar olduğu tahmin edilmektedir (Reid, 2014). Bu nedenle iyi karakterize edilmiş, sterilite, saflık, kalite kontrol testleri ve stokları tam yapılmış hücre hatlarının mevcudiyeti, hastalıklarla mücadelede güvenli teşhis, izolasyon ve üretim imkanı sağlar.

Ortaya konulan bilgi, sorun ve tespitler ışığında tam olarak tanımlanmış, sterilitesi, saflığı ve karakterizasyonu yapılmış, kolayca ve uzun süreli muhafaza edilebilen, pasajlamalarla şap virüsüne olan duyarlılığı kaybolmayan ve virüsün bütün serotiplerine ve alt tiplerine karşı duyarlı olan yeni bir hücre hattına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bu tez çalışması ile şap hastalığının hedef hayvanlarından olan sığırın fötüsünün dilinden şap virüsüne duyarlılığı yüksek, alternatif yeni hücre hatları oluşturularak, bu hücre hatlarının hem aynı homolojiye sahip hedef hayvandan hem de hastalığın hayvanda ilk başladığı ve enfeksiyona duyarlı olduğu bir organ olan dilden hazırlanacak olmasından dolayı şap virüsünün teşhisinde ve izolasyonunda kolaylık sağlanması hedeflenmiştir. Elde edilecek

hücre hatları, sığır fötüs dilinden yapılan primer hücre kültürleri dışında yapılacak olan ilk sınırlı hücre hatları olması nedeniyle de özgün bir nitelik taşımaktadır. Bu hücre hatları sadece Şap Enstitüsü Müdürlüğü ve ülkemize değil, şap hastalığı ya da diğer sığır viral hastalıkları ile mücadele eden, araştırmalar yapan ulusal ya da küresel bütün araştırmacı kurumlara ve araştırmacılara da katkı sağlayacak olması nedeniyle ayrı bir önem arz etmektedir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Şap Hastalığı

Şap hastalığı, Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonunun (World Organisation for Animal Health, OIE) bulaşıcı hayvan hastalıkları arasında çok bulaşıcı, tehlikeli ve yayılcı sınıfında yer alan, serbest ülke ve bölgelerin resmi bir listesini oluşturduğu ilk hastalıktır (Grubman ve Baxt, 2004; Kumar vd., 2011; OIE, 2019). Hastalık geviş getiren çift tırnaklı evcil (sığır, koyun, keçi, vb.) ve yaklaşık 70 yabancı hayvan türünde görülmektedir (Brehm vd., 2009). Hasta hayvanlarda dil ve ağzın mukoza tabakasında, ayaklarda çatal aralarında, burun ve memelerde veziküllerin oluşumu ile karakterize olup, çok tahrip edici, tehlikeli ve önlenmesi zor olan, canlı hayvan ve hayvansal ürün ticaretini olumsuz yönde etkileyerek, büyük ekonomik kayıplara neden olan viral hayvan hastalıklarından birisidir. Bunun nedenleri arasında, hastalığın çok bulaşıcı olması, coğrafik yaygınlığı, hastalığa duyarlı hayvan türlerinin ve virüsün serotiplerinin çok fazla oluşu, serotipler arası çapraz koruma olmaması, nispeten kısa süreli bağışıklık oluşturması ve pek çok hayvan türünün taşıyıcı olarak rol oynaması sayılabilir (Bachrach, 1968; Sütçü, 1986; Brown, 1981; Fenner, 1987; Rodriguez ve Grubman, 2009, Chakraborty vd., 2014). Ayrıca virüsün yayılma hızı ve antijenik kimliğini değiştirebilme kabiliyeti ülkelerin et ve süt endüstrileri için endişe verici durumların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Stram vd., 1995).

Şap hastalığının ilk yazılı bilgisi, İtalya'da muhtemelen 1514 yılında ortaya çıkan ve çok bulaşıcı bir hastalığın hayvanlarda büyük telefata ve zarara yol açtığı olayın, 1546 yılında Hieronymus Fracastorius tarafından bildirilmesi ile başlar. Yaklaşık 400 yıl sonra, 1897'de Loeffler ve Frosch filtrelenebilir bir ajanın şap hastalığına neden olduğunu göstermişlerdir. Bu olay hem bir hayvan hastalığına filtrelenebilir bir ajanın neden olduğunun ilk göstergesi hem de veteriner viroloji biliminin de başlangıcı olmuştur (Sütçü,1986; Grubman ve Baxt, 2004). Ülkemizde ise hastalık halk arasında “dabak”, resmi olarak ise “şap” olarak adlandırılmakta olup istatistiki bilgi ve kayıtlara göre ilk şap hastalığı vakası 1914 yılında ortaya çıkmıştır (Sütçü, 1986).

2.2. Şap Hastalığı Etkeni

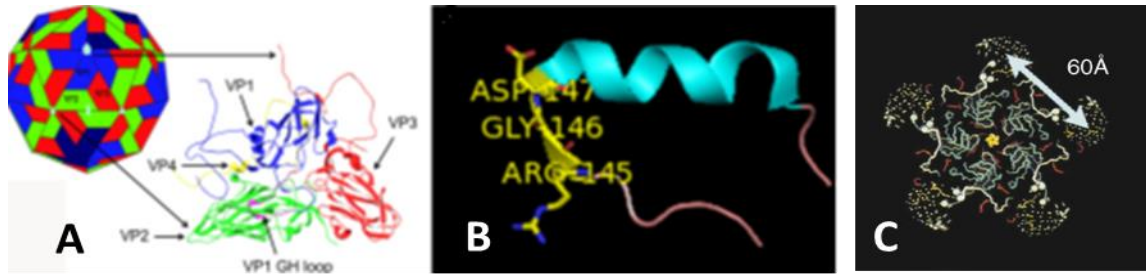
Hastalık etkeni olan şap virüsü, Picornaviridae ailesinin Aphthovirüs cinsi içinde yer alır. Virüsün kapsid proteinlerinin antijenitesine göre serolojik olarak bilinen 7 serotipi (A, O, Asia, C, SAT1, SAT2, SAT3) olup, 67'den fazla alt tipi mevcuttur (Brooksby, 1958; Bachrach, 1968; Chakraborty vd.,2014). Serotip A, Fransızca'da Almanya'nın adı olan Allemagne'nin baş harfi, Serotip O ise bir Fransız şehri olan Oise'nin baş harfi alınarak, Fransız bilim insanları Vallee ve Carre tarafından 1922'de tanımlanmıştır. Bu tanımlamadan dört yıl sonra Waldmann ve Trautwein tarafından 1926'da C serotipi bildirilmiştir. Diğer serotipler olan SAT1, SAT2 ve SAT3 ise 1934'de Güney Afrika ülkeleri Botswana, Zambia ve Zimbavye'den gelen numunelerden izole edildikleri için Güney Afrika Bölgeleri'nin (Southern African Territories) kısaltması olan SAT olarak adlandırılmışlardır. Son tanımlanan Asia1 serotipi ise 1954'de Asya ülkeleri Hindistan ve Pakistan'da izole edildikleri için bu adı almıştır (Brooksby, 1958). Ülkemizde endemik olarak şap virüsünün A, O ve Asia1 serotipleri görülmektedir (Sütçü,1986).

Virüs pH 7–9 arasında ve düşük sıcaklık derecelerinde stabildir, fakat 50 °C'nin üzerinde süratle inaktive olurken, morötesi ışığa, asit ve alkali şartlara karşı duyarlıdır. Doğrudan güneş ışığı ve aşırı kuru olmayan ortamlarda uzun süre canlı kalabilir. Enfekte karkaslarda (kesilmiş gövde eti), laktik asit oluşumu nedeni ile süratle inaktive olmasına karşın, kan, kemik iliği, lenf bezleri ve iç organlarda uzun süre dayanabilir. Süt ve bazı süt ürünlerinde de uzun süre aktivitesini koruyabilir (Sütçü, 1986, Rueckert, 1990; Mann ve Sellers, 1990). Kontamine yemde ve uygun iklime sahip çevre koşullarında bir aya kadar, kemik iliği ve lenf bezlerinde ise uzun süre persiste kalabilir (Wild vd., 1969).

Şap virüsü yaklaşık 30 nm çapında, zarfsız, tek iplikçikli, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür. Enfeksiyöz genomik RNA'nın tekli bir kopyası ile birlikte virüs tarafından kodlanan ve ikozahedral bir kapsit oluşturan dört kapsit proteininin [VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) ve VP4 (1A)] 60 kopyasından oluşur (Şekil 2.1A) (Acharya vd., 1989; Grubman ve Baxt, 2004). Tüm serotipler, VP1 kodlama genindeki yaklaşık %30-50 arasındaki farklılıklar ile belirgin bir şekilde genetik soylara göre gruplandırılmıştır (Knowles ve Samuel, 2003). Serotipler arasında çapraz koruma yoktur (Fenner, 1981). Diğer RNA virüsleri gibi, yüksek bir mutasyon oranına sahiptir. VP1, VP2 ve VP3 kapsidin dış

yüzeyinde yer alırken VP4 iç kısımda yerleşmiştir ve ayrıca virüsün temel yapısal proteinleri Picornaviridae familyasının diğer virüslerindeki karşılıklarından daha küçüktür (Acharya vd., 1989). Özellikle de VP1 ölçülerindeki bu azalma yüzey bölgesinin düzleşmesi ile gerçekleşir. Bu nedenle diğer picornavirüsler için dikkat çekici bir yüzey özelliği olan kanyon ve çukurlar, şap virüsü yüzeyinde bulunmaz ve bu da şap virüsü kapsidini hem inceltir hem de düzleştirir (Jackson vd., 2003).

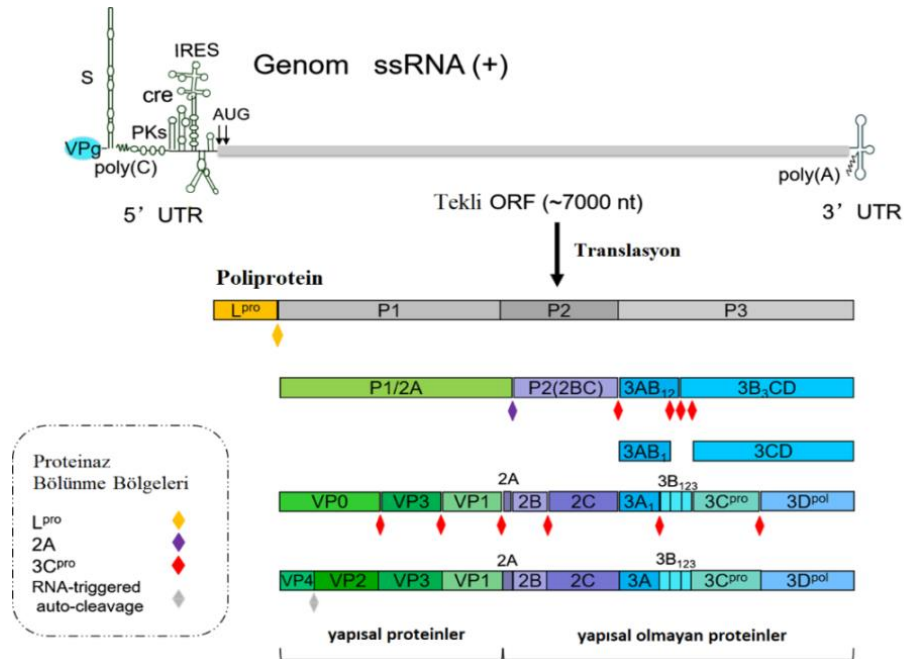
Şap virüsü partiküllerinin yüzeyinin en belirgin özelliği, VP1 kapsit proteininin 140-160 rezidülerinin β G- β H kolları tarafından oluşturulan yüzeyinin, oldukça korunmuş RGD (arjinin, glisin, aspartik asit) dizisini taşıyan çıkıntı şeklindeki G-H ilmeğini içermesidir (Şekil 2.1A) (Acharya vd., 1989). RGD dizisi hem hücre tanınması için esas olup hem de virüs partikülünün temel antijenik bölgesini oluşturur, ayrıca nötralizan antikörlerin de bağlandığı bölgedir (Şekil 2.1.B) (Fry vd., 1999; Baranowski vd., 2000). Uzun esnek ilmeklerin ucuna yaklaşık olarak 60Å aralıklarla yerleşerek pentamerik bir düzen oluşturan RGD motiflerinin bu titiz uzaysal düzenlemesi, hücre yüzeyindeki integrin kümeleşmesini teşvik eder ve virüs partikülü üzerindeki her pentona beş integrin molekülü bağlanmasına izin verir (Şekil 2.1C) (Jackson vd., 1997; Fry vd., 1999; Nemerow ve Stewart, 2001).



Şekil 2.1. Şap virüsü kapsidi, kapsidi oluşturan alt birimler ve GH ilmeğinin şematik gösterimi: (A) Dört yapısal proteinin (VP1–4) her birinin 60 kopyasından oluşan viral ikozahedral kapsidin şematik gösterimi. VP1, mavi; VP2, yeşil; VP3, kırmızı; VP4, sarı. FMDV VP1 GH ilmeği eflatun rengi. (B) VP1 GH ilmeği. Korunmuş RGD (Arg-Gly-Asp) motifi renkli çubuklarla etiketlenmiştir (Han vd., 2014). (C) 60Å aralıklarla yerleşerek pentamerik bir düzen oluşturan RGD motifleri (Stewart ve Nemerow, 2007).

Şap virüsü genomu yaklaşık 8500 nükleotitten (nt) oluşan, uzun 5' çevrilmemiş bir bölge (5'UTR), bir açık okuma alanı (ORF) ve kısa bir 3' UTR bölgesi olmak üzere 3 bileşenden oluşur (Grubman, 1980; Belsham, 2005; Wang vd., 2015). Açık olarak

sıralanacak olursa, 5'UTR yapısal olmayan VPg ile başlar, S-parçası, Poly (C), yalancı düğüm, cre (cis-aracılı replikasyon elemanı) ve yaklaşık 450 nükleotit uzunluğundaki IRES (internal ribozomal giriş bölgesi) 'den oluşur (Grubman ve Baxt, 2004). Yapısal olmayan ve 23-24 amino asit kalıntısı içeren VPg (3B), şap virüsü ile enfekte hücrelerde genomik RNA'nın 5'UTR'sine bağlanmasını takiben hücresel bir enzim tarafından bölündükten sonra şapka yapısını kaybederek serbest bir 5'UTR'sine sahip olur (Gao vd., 2016). Diğer picornavirüslerde genomun değişik yerlerinde bulunabilen cre sadece şap virüsü genomunda kodlayıcı bölgenin dışında ve 5' UTR'de yer alır. RNA sentezinin başlaması için gerekli korunmuş bir motif olan AAACA dizisi bu bölgededir (Belsham, 2005). Translasyon, IRES'de bulunan ve 84 nükleotitten oluşan 2 AUG kodonu ile başlar (Sobrinho vd., 2001; Mason vd., 2003). VPg hücresel bir enzim tarafından bölündükten sonra, IRES yönetiminde bir poliprotein üretilir, bu daha sonra iki adet virüs kodlu proteinazlar [(lider (Lpro) ve 3Cpro)] tarafından parçalanarak yapısal ve yapısal olmayan proteinleri oluşturur (Şekil 2.2) (Gao vd., 2016).



Şekil 2. 2. Şap visüsü genomunun şematik diyagramı, viral polipeptidin işlenmesi ve yapısal proteinlerin uyumu. ORF bölgesi, olgun polipeptitlerin farklı fonksiyonları nedeniyle genellikle dört fonksiyonel alana (L, P1, P2 ve P3) bölünür. ORF kodlu poliprotein, Lpro, 2A ve 3Cpro tarafından dört ürüne, Lpro, P1-2A, 2BC ve P3'e işlenir. P1-2A, 2BC ve P3 prekürsörleri ayrıca olgun viral proteinler ve VP0 veya 1AB, 3ABC, 3BCD, 3AB ve 3CD gibi, 3Cpro gibi nispi stabiliteye sahip bazı bölünme ara maddelerine işlenerek yapısal proteinler, biyolojik protomer ve viral kapsidi oluşturur (Gao vd., 2016).

2.3. Şap Hastalığı Teşhisi ve Mücadelesi

Şap hastalığı ile mücadelede kesim, aşılama ve kesim, aşılama ve diğer önlemlerin uygulanmasıyla endemik durumun belirlenmiş alanlara hapsedilmesi ve diğer bölgelere sıçramasının engellenmesi şeklinde uygulanır. Hastalığın endemik olarak seyrettiği bölgelerde ise mücadelede en etkili yöntem kesim ve aşılamadır. Bu nedenle, aşılanmanın şap hastalığı ile mücadelede çok önemli bir yeri vardır ve bu amaçla, dünyada milyonlarca doz aşı üretilmektedir (Brown, 1981; Amadori ve Volpe, 1997; Brown, 2003). Şap aşıları hazırlanması oldukça riskli, masraflı ve uzun işlemler gerektiren aşılardır. Kültür metoduyla üretilmesi 1947'de Frenkel tarafından sığır dili epitel dokusunun kullanılmasıyla başlamış (Cartwright vd., 1957) ve günümüzde de milyonlarca doz aşı endüstriyel düzeyde, devamlı hücre kültürleri kullanılarak üretilmektedir (Chakraborty 2014). Dünyada yaygın olarak da BHK 21 hücre kültürlerinde üretilen aşı virüslerinin BEI (binary ethylene-imine) ve ısı ile inaktivasyonu ve konsantrasyonunu takiben alüminyum hidroksit, saponin veya yağ adjuvantı ilavesiyle hazırlanmaktadır (Barteling, 2002; Cao vd., 2016). Knight-Jones ve Rushton göre 2013 yılında yaklaşık 2.35 milyar dozluk şap aşısının hayvanlara uygulanmış olması, hastalığın dünyadaki yaygınlığını göstermek açısından önemli bir veridir (Puckette vd., 2017). Ayrıca etken virüsün, birbirine karşı immünite sağlamayan serotiplere ve alt tiplerine sahip olma özelliği, aşılama söz konusu olduğunda ayrı bir önem kazanmaktadır (Kitching, 1998; Bartelling, 2002; Brown, 2003; Chakraborty vd., 2014). Şap virüsünün immünodominat bölgesinin yer aldığı VP1 kapsit proteini proteolitik enzimlere, aşının saklanma koşullarına ve adsorbe edildikleri adjuvanlara karşı oldukça duyarlı olduğundan aşının optimum olmayan hazırlama ve saklama koşulları VP1'de yıkımlanmalara neden olabilir (Ünal ve Gürhan, 1998). Ülkemizde hastalıkla mücadele şekli, ilkbahar ve sonbahar da olmak üzere yılda iki defa uygulanan aşılama programı ve gerektiği durumlarda mihrak aşılamaları ile yapılmaktadır. Mücadele politikalarında Türkiye'nin benimsediği, Trakya yoğunluklu izlenen politikanın sonuçları 2000'li yıllardan itibaren sero-sörvey verileriyle ortaya konmuş olup, 2009 yılında Trakya'nın şap hastalığı yönünden aşılı-ârilik statüsü için OIE'ye başvurulmuş ve 2010 yılında kabul edilmiştir. Halen de Trakya'nın bu aşılı ârilik durumu korunmaktadır (OIE, 2019).

Aşının etkinliği sahada seyreden virüs tipiyle yakından ilgilidir. Virüs tipleri aşı içindeki virüs tiplerinden uzaklaşmış ya da yeni bir alt tip oluşmuş ise, sahadaki aşılamaya

rağmen hastalanan bu hayvanlardan alınan doku materyalleri ile yeni bir aşı suşu hazırlanması gerekir. Bu konuda Türkiye'deki referans kurum olan Şap Enstitüsü Müdürlüğü hastalık etkeni virüsün izolasyonu, tiplendirmesi, mevcut aşı suşunun bu tipi koruyup korumadığı gibi birçok çalışmayı mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirmekle yükümlüdür. Bu süre zarfında yeni bir tip olduğu belirlenen hastalık için T.C Tarım ve Orman Bakanlığı'nın "Şap Hastalığının Kontrolüne İlişkin Yönetmeliğin (ŞHKİY,2011) 57. Maddesi gereğince hazırlanan şap hastalığı Acil Eylem Planı kapsamında karantina ve diğer önlemler alınır. Eğer aşı suşu bu yeni tipi korumuyorsa ivedi olarak etkili aşı suşu geliştirilmesi için hücre kültürüne adaptasyon, karakterizasyon, viral saflık ve sterilite çalışmaları tamamlanarak Şap Enstitüsü'nde yeni aşı üretimine başlanması ve Bakanlığın da onayı ile sahada uygulanması sağlanır. Bu aşamalarda sahada seyreden yeni yada şüpheli şap virüsü tipinin izolasyon, teşhis ve aşı suşu haline getirilmesi aşamaları önem arz etmektedir. Hastalık etkeni ne kadar kısa sürede izole edilir, tanımlanır ve aşı suşu haline getirilirse hastalıkla mücadelede de o kadar zaman kazanılmış olur.

Hastalığın teşhisinde ve tanımlanmasında, saha numunelerinde, hücre kültüründe virüs izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı testler (Real time-PCR, Multiplex PCR, Quantitative Real Time-PCR), enzim bağlı immunosorbent analiz (ELISA) tabanlı testler (sandwich-ELISA (S-ELISA), liquid-phase blocking ELISA (LPBE), komplement fiksasyon (CF) ve sahada hızlı teşhis için geliştirilen yanal akış cihazları, pen side testler, ters transkriptaz-loop aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) ve immunostrip testler kullanılmaktadır (Longjam vd., 2011). Saha materyali olarak, epitel, özofarengal numuneler ve serum dahil bir dizi numune tipi, hücre kültüründe virüs izolasyonu veya RT-PCR ile incelenebilir. Buna karşılık ELISA, CF ve yanal akış cihazları, epitel süspansiyonları, veziküler sıvılar veya hücre kültürü süpernatantlarının incelenmesi için uygundur. Ancak, epitel hücreler, özofarengal numunelerinin veya serumun doğrudan incelenmesi için yeterince hassas değildir (OIE, 2018). Şap Enstitüsü'nde de şap virüsünün saha materyallerinden teşhisinde, tanımlanmasında, izolasyonunda, PCR, ELISA ve/veya hücre kültüründe izolasyondan faydalanılmaktadır. Moleküler ve serolojik teknikler hızlı olmasına rağmen zaman zaman yanlış pozitif sonuçlar alınabilmekte ya da ELISA ve PCR'da pozitif çıkan bazı sonuçlardan mevcut hücre kültüründe cevap alınamamakta veya ELISA ve PCR da negatif çıkan numuneler hücre kültüründe pozitiflik görülebilmektedir. Bu durum materyalden, materyaldeki virüs konsantrasyonun yeterli olup olmamasından,

ELISA ve PCR'dan ya da kullanılan hücre kültürünün hassasiyetinden kaynaklanabilir. Bütün bu süreçler, virüsün yetersiz olduğu materyallerden teşhis edilme çabaları, izolasyonu, yeni suştan aşı hazırlamasının gerekli olup olmadığı kararının verilmesi sürecini geciktirebilmektedir. Bu nedenle virüs izolasyon ve teşhis protokolünün maksimum hassasiyetle tasarlanması gerekmektedir (LaRocco vd., 2013). OIE direktiflerinde de hastalık etkeninin izolasyon yöntemlerinde, hücre kültürü sistemlerinde izolasyonu temel görülmekte ve önerilmektedir (OIE, 2019). Ayrıca, virus izolasyonu yöntemi diğerlerine göre yavaş olmasına rağmen vazgeçilemez bir yöntemdir. Bu yöntem çok duyarlı olmasının yanında ileri çalışmalar için gerekli olan virüs materyalini de sağladığından dolayı da çok önemlidir (Zabal ve Fondevila, 2013). Bu amaçla sahadaki hasta hayvanlardan alınan ve içinde hastalık etkeni virüsün olduğu düşünülen doku materyalleri laboratuvarlarda inokülüm solüsyonları haline getirilerek, içeriğindeki virüs partikülleri hücre kültür sistemlerinde izole edilmeye ve varsa çoğaltılmaya çalışılır. Moleküler ve serolojik testlerle tiplendirmesi yapılan virüsün aşı virüsü haline getirilmesi gerekiyorsa öncelikle hücre kültürüne adaptasyonu yapılır.

2.4. Şap Hastalığı Teşhis ve İzolasyonunda Kullanılan Hücre Kültürleri

OIE'nin şap hastalığının teşhisinde virüs izolasyonu ile ilgili direktiflerinde primer sığır tiroit (primary bovine thyroid, BTY) hücre kültürü, diğer primer kültürler ve devamlı hücre hatları arasında ilk sırada yer almaktadır (OIE, 2019). Gürhan ve arkadaşları da (1993) BTY ve domuz böbrek devamlı hücre hattı olan IB-RS-2 ile yaptıkları çalışmada BTY hücrelerinin IB-RS-2 devamlı hücre hattına oranla şap virüsünün saha suşlarına karşı daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Ancak, BTY pasajlandığında ve dondurulduğunda şap virüsüne karşı olan hassasiyetini kaybetmektedir. Buna bağlı olarak, primer hücre kültürlerinde ise, her defasında hayvandan doku örneklerinin alınıp laboratuvara transferi, spesifik büyüme faktörleri, hormonlar, kimyasallar, antibiyotikler gibi katkı maddeleri ve sarf malzemelerinin kullanılması, kültürün sterilite testlerinin yapılması gibi işlemler zaman, maliyet ve risk teşkil etmektedir (Anonim, www.daff.gov.au, 2013; Zabal ve Fondevila, 2013; Fukai vd.,2013). Bu nedenle teşhiste, primer hücre kültürleri kadar hassas olmasa da kullanım kolaylıklarından dolayı yaralanılan birçok devamlı hücre hattı vardır. Bunlar, yavru Hamster böbreği (baby hamster kidney, BHK 21, Stocker ve Macpherson, 1961), domuz böbreği (pig kidney, IB-RS-2, Chapman ve Ramshaw, 1971; SK-6, Kasza vd., 1972),

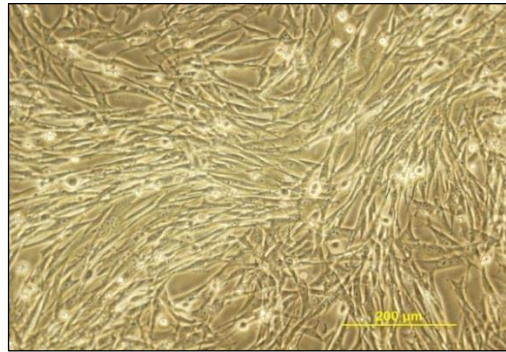
keçi dili epiteli (fetal goat tongue, ZZR-127, Brehm vd., 2009), domuz böbrek epiteli (porcine kidney, PK-15, Kasza vd., 1972) ve domuz böbreği (LFBK/LFBK $\alpha\beta 6$, Swaney, 1988). Özellikle de yaygın olarak BHK 21 ve IB-RS-2 hücre hatları kullanılmaktadır. Brehm ve arkadaşlarının (2009), ZZR-127, IB-RS-2 ve BHK 21 hücrelerinde 7 farklı şap virüsü tipi ile yaptıkları çalışmada ZZR-127 hücrelerini şap virüsü için daha duyarlı bulmuşlardır. SK-6 ve PK-15 şap virüsüne duyarlılık yönünden yine BHK 21 hücre hattı ile benzer hassasiyette olup, kullanımları pek yaygın değildir. Swaney 1988'de LFBK ve IB-RS-2 devamlı hücre hatları ile yaptığı çalışmada LFBK'yı şap virüsüne daha hassas bulmuştur. LaRocco ve arkadaşları (2013), ölümsüzleştirilerek devamlı hatlar haline getirilen hücrelerin (örn. BHK 21 ve domuz böbrek epitel hücreleri) devamlılığı çok daha kolay iken, birçok durumda hedef konakçı hayvandan türetilmiş FMDV serotiplerine karşı daha az duyarlı olduklarını belirtmişlerdir. Ali ve arkadaşları da (2019) LFBK ve LFBK $\alpha\beta 6$ hücre hatlarının şap virüsüne olan duyarlılığını karşılaştırmışlar ve LFBK $\alpha\beta 6$ 'yı daha duyarlı bulmuşlardır. Ancak, LFBK hücre hattı izolasyonunda sığır kökenli olduğu belirtilmesine karşın daha sonra yapılan çalışmalarda, domuz genomuna sahip olduğu belirtilmiş olan problemlili bir devamlı hücre hattıdır (LaRocco ve vd., 2015). LFBK $\alpha\beta 6$ devamlı hücre hattı, LFBK hücrelerine sığır $\alpha\beta 6$ integrin transfeksiyonu yapılarak oluşturulmuştur (LaRocco vd., 2013). Ayrıca IB-RS-2'nin sitopatojenik hog cholera virus (HCV) ile enfekte olduğu (Castro, 1973), LFBK/LFBK $\alpha\beta 6$ 'nın da nonsitopatojenik BVD virüsü ile enfekte olduğu belirtilmiştir (LaRocco ve vd., 2015). Bu açıdan da bu hücre hatlarının laboratuvarlarda rutin kullanımlarında ve izolasyonu yapılan virüslerin ileri uygulamalar için kullanılmasında risk oluşturabilme ihtimali nedeniyle dezavantajları bulunmaktadır.

Devamlı hücre kültürlerindeki hücrelerin ilerleyen pasajlarla birlikte orijinden uzaklaştıkça üreme, cam yüzeyine yapışma, karyotip ve virüse duyarlılık gibi özelliklerinde de değişimler olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Clark ve Spier., 1977; Whiteside vd., 1983). Polyoma virüsü ile transforme edilmiş BHK 21 hücre kültürlerinde şap virüsüne duyarlılığın azalmasının, kendiliğinden transformasyona uğramış hücre kültürlerine göre daha erken başladığı belirtilmiştir (Clarke, 1983). Ayrıca ölümsüzleştirilerek devamlı hücre hatları haline getirilen hücrelerin devamlılığı çok daha kolay iken, birçok durumda saha suşlarına karşı daha az duyarlıdır (LaRocco vd., 2013). Stacey ve arkadaşları (1998), farklı laboratuvarlardan sağlanan, içinde BHK An₃₁ hücrelerinin

de olduğu 22 adet BHK 21 hücresinin karakterizasyonlarını, şap virüsüne (O1 Manisa suşu ve A22 Mahmatlı suşu) ve kuduz virüsüne olan duyarlılıklarını çalışmışlardır. Çalışmada hücreler şap virüsüne kuduz virüsünden daha duyarlı bulunmuşlardır. BHK An₃₁ hücresinin de hem monolayer karakterde olup hem de şap virüsünün iki tipine de duyarlı olan hücreler arasında olduğu görülmektedir. Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nde de rutin teşhiste ve izolasyonda, PCR ile birlikte hücre kültürü olarak BHK 21 An₃₁ hücresi kullanılmaktadır.

2.5. BHK 21 (Yavru Hamster Böbrek) Hücre Hattı

BHK 21 hücresi, 1961 yılında Stocker ve Macpherson'ın, bir batında doğmuş 21 adet bir günlük normal Suriye Hamster yavrularından 5 tanesinin böbreklerinden hazırladıkları primer kültürden elde edilmiş ve subkültürler dondurularak stoklanmıştır. 1962 yılında yine Macpherson ve Stocker tarafından bu hücreler polyoma virüs ile transforme edilerek devamlı hücre hattı haline getirilmiş ve BHK 21/C13 hücre hattı elde edilmiştir. Morfolojisi, birbirine paralel olarak üreyen fibroblast görünümlü (Şekil 2.3) bu hücre hattının karyotipi $2n=44$ 'dür. Capstick ve arkadaşları 1962 yılında, bu hücrenin süspanse kültürlerde üreyebilme yeteneğini tanımlamışlardır (Capstick vd., 1962). Aynı yıl Mowat ve Chapman, bu hücre hattının şap virüsüne duyarlı olduğunu göstermişlerdir (Mowat ve Chapman, 1962). Tek tabakalı kültürlerde ikilenme süresi ortalama 12 saat (Stoker ve Macpherson, 1964), süspanse kültürlerde ise ikilenme süresi ortalama 14 saat olarak tespit edilmiştir (Gürhan vd., 1987). BHK21/C13 hücre hattı İngiltere Glasgow ve Pirbright Hayvan Virüsleri Enstitü'nden dünyanın birçok laboratuvarlarına gönderilmiş olup, her laboratuvar bu hücreyi kendi şartlarında değişik amaçlarla kullanmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir.

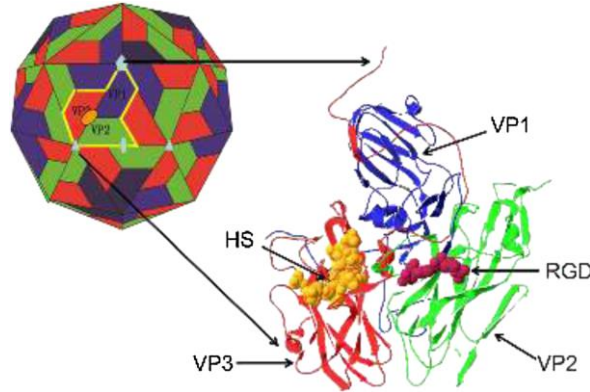


Şekil 2. 3. BHK 21/C13 hücresinin faz kontrast doku kültürü mikroskop görüntüsü.

Dünyadaki farklı laboratuvarlardan topladıkları farklı pasaj numaralarındaki BHK 21/C13 hücrelerine şap virüsünün A, O ve C tipleri için virüs hassasiyet testlerini uygulayan Clarke ve Spier (1977) ile Stacey ve arkadaşları (1998), orijinleri aynı bu hücrelerde şaşırtıcı sonuçlar bulmuşlardır. Bazıları 3 tip virüse birden hassasiyet gösterirken, bazılarının sadece bir ya da iki tipe, bir kısmının da hiçbir tipe hassasiyet göstermediği görülmüştür. Bu da orijini aynı dahi olsa farklı laboratuvarlarda işlem görmüş hücrelerin bazı özelliklerinde zaman içerisinde farklılaşmalar meydana geldiğini ortaya koymaktadır (Clarke ve Spier, 1977; Clarke ve Spier, 1980, Stacey vd., 1998).

2.6. Şap Virüsü Hücresel Reseptörleri

Şap virüsü kapsit proteinlerinden VP4 haricinde, VP1, VP2 ve VP3 hem antijeniteyle ilgili olup hem de hücresel reseptörler (integrinler ve heparan sülfat proteoglikanlar, HPSGs) ile etkileşebilirler (Şekil 2.4) (Fry vd., 2005).

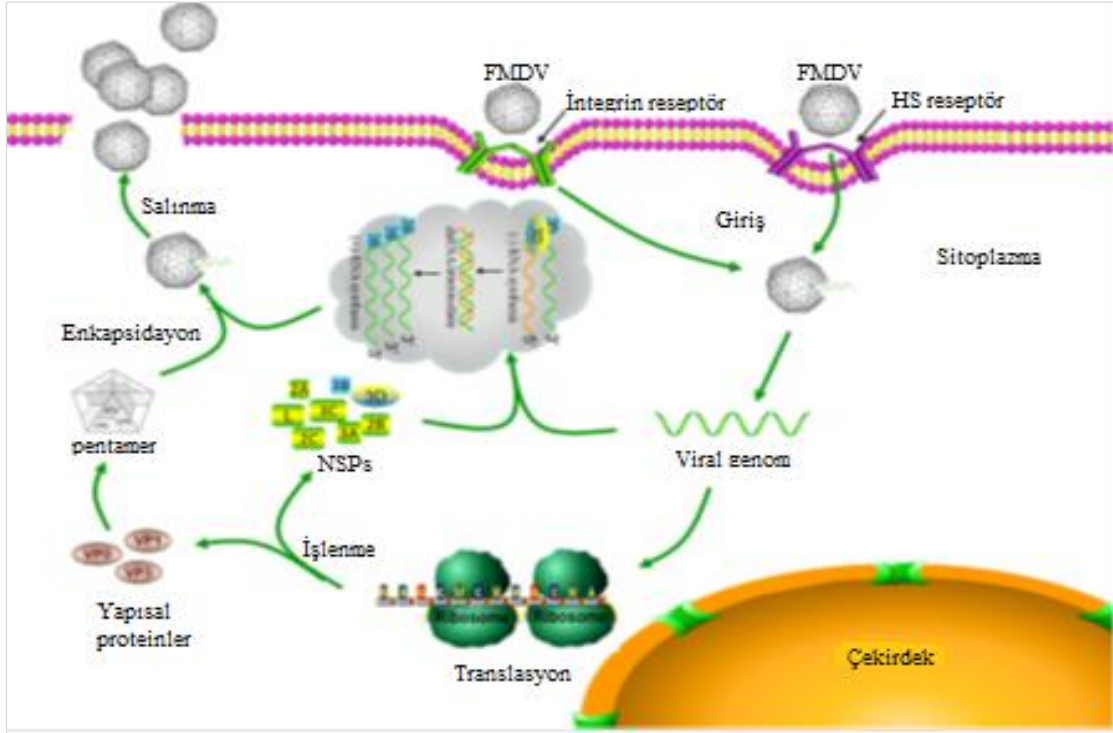


Şekil 2.4. Şap virüsünün hücresel reseptör bağlanma bölgelerinin şematik modeli. HPSGs bağlanma bölgesi turuncu, integrin bağlanma bölgesi olan RGD motifi koyu eflatun ile gösterilmiştir (Wang vd., 2015).

Virüs evrim süreci boyunca doğada ve *in vitro* koşullarda RGD dizisine bağlı olmayan birçok farklı, canlı ve enfeksiyöz virion üretebilir. Bu yeni varyant suşlar da hücresel reseptörlerle etkileşime geçmek için RGD dizisine benzer (RGG: Arg, Gly, Gly; GGG: Gly, Gly, Gly) tripeptit dizilerini kullanılabiliyorlar. Bununla birlikte, bu mutasyona uğramış reseptör bağlanma bölgelerinin ve virüsün hücreye girişindeki işlevi ve akabinde hücresel protein moleküllerinin tanınmasıyla ilgili mekanizmalar henüz tam olarak

bilinmemektedir. Bu nedenle bu reseptör bağlayıcı bölgelerdeki varyasyonların konakçı tropizminde değişikliklere neden olup olmadığı belirsizdir (Martinez vd.,1997; Gutiérrez-Rivas vd., 2008). Ayrıca, viral partiküllerini oluşturan şap virüsü kapsid proteinlerindeki amino asit rezidülerinin varyasyonları, sadece virüsler ve hücrel reseptörleri arasındaki adsorpsiyon kabiliyetini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda virüslerin biyolojik özelliklerini de etkileyebilir. Şap virüsünün VP1 kapsid proteinindeki G-H halkasının RGD dizisi, hücrel integrin proteinleri ile son derece kararlı bir kompleks oluşturur ve bu kompleks EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)'ya dirençlidir. Bu kompleksin stabilitesi, virüsün adsorpsiyon ve internalizasyon olasılığını artırır ve böylece virüsün infektivitesini de artırmaya yardımcı olur (Wang vd., 2015).

Şap virüsü, hücrelere reseptör-aracılı endositozun bir mekanizması ile girer ve sitoplazmada replike olur (Şekil 2.5) (Acharya vd., 1989; Fox vd., 1989; Baxt ve Becker 1990; Mason vd., 1994; Fry vd., 1999, Fry vd., 2005). Konakçı hücrenin adsorpsiyonu, virüsün hücreleri enfekte etmesi için bir ön şarttır. Bu adsorpsiyon süreci, konakçı hücre reseptörlerine bağlıdır. Virüsler, duyarlı konakçı hücrelerinin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak enfeksiyon sürecini başlatır ve hücre içine alınır. Konakçı dokular ve spesifik hücre yüzeyi reseptörleri, virüslerin invazyon yollarını, yayılma yöntemlerini ve konakçıların patojenik özelliklerini belirlemektedir (Crowell ve Tomko, 1994; Wang vd., 2015). Virüs hücreye girdikten sonra oluşan endozomun düşük pH'sı viral genomun açılmasını tetikler, daha sonra endozomal membrandan sitozole translokasyonu gerçekleştirir (Berryman vd., 2005; O'Donnel vd., 2005).



Şekil 2.5. Şap virüsünün reseptör-aracılı endositozla hücreye girişi ve sitoplazmada replikasyonunun şematik gösterimi (Gao vd., 2016).

Kültüre edilmiş hücrelerin şap virüsü ile enfekte edilmesinde Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi integrinler ve heparan sülfat proteoglikanlar olmak üzere iki hücresel reseptör tanımlanmıştır (Sa-Carvalho vd., 1997; Jackson vd., 1997; Jackson vd., 2003).

Çizelge 2. 1. Virüsler ve reseptör grupları (Baranowski vd., 2001)

Reseptör Sınıfı	Hücresel Yapılar	Virüs Ailesi
Hücre adezyonu ve hücre-hücre kontakt proteinleri	CXCR4 (TM7 ailesi) CXCR4 (TM7 ailesi) a-Dystroglycan İntegrinler ICAM-1 (Ig süper ailesi) MHC I (Ig süper ailesi)	HIV, SIV, FIV (<i>Retroviridae</i>) HIV, SIV (<i>Retroviridae</i>); HHV-7 (<i>Herpesviridae</i>) LCMV, Lassa fever virüsü (<i>Arenaviridae</i>) Adenovirüs 2, 3, 12 (<i>Adenoviridae</i>); FMDV , koksakivirüs (A9, B1, B3, B5), ekovirüs (1, 8, 9 Barty); insan parekoovirüs 1 (<i>Picornaviridae</i>); hantavirüs (<i>Bunyaviridae</i>); İnsan papilloma virüsleri (<i>Papovaviridae</i>); rotavirüs SA11 (<i>Reoviridae</i>) Büyük grup HRV, koksakivirüs (A13, A18, A21) (<i>Picornaviridae</i>) MHC I (Ig süper ailesi) SV40 (<i>Papovaviridae</i>); adenovirüs 5 (<i>Adenoviridae</i>); koksakivirüs A9, ekovirüs 7 (<i>Picornaviridae</i>)
Komplement kontrol protein süper ailesi	CD46 DAF (CD55)	Measles virüs (<i>Paramyxoviridae</i>); HHV-6 (<i>Herpesviridae</i>) koksakivirüs (A21, B1, B3, B5), ekovirüs (3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33), enterovirüs 70 (<i>Picornaviridae</i>)
Diğer proteinler	Aminopeptidaz-N CAR (Ig süper ailesi) LDLR protein ailesi PVR, HveB ve HveC ile ilgili proteinler (Ig süper ailesi)	İnsan koronavirüs 229E, TGEV, FIPV, CCV (<i>Coronaviridae</i>) Koksakivirüs (B1-B6) (<i>Picornaviridae</i>); adenovirüs 2, 5 (<i>Adenoviridae</i>) Minör grup HRV (<i>Picornaviridae</i>); HCV, BVDV (<i>Flaviviridae</i>); alt grup Kuş lökozis ve sarkoma virüs (<i>Retroviridae</i>) Poliovirüs (<i>Picornaviridae</i>); HSV (<i>Herpesviridae</i>)
Hücre dışı matriks komponentleri ve şeker türevleri	Heparansülfat glikozaminogikanlar Siyalik asit (N-asetilnörominik asit, N-asetil-9-O-asetilnörominik asit, N-glikolilnöro-minik asit)	HSV, İnsan sitomegalovirüs, BHV, PRV (<i>Herpesviridae</i>); HIV (<i>Retroviridae</i>); aşı virüsü (<i>Poxviridae</i>); adenovirüs 2, 5 (<i>Adenoviridae</i>); AAV2 (<i>Parvoviridae</i>); Dengue virüs, CSFV (<i>Flaviviridae</i>); FMDV (<i>Picornaviridae</i>); Sindbis virüs (<i>Togaviridae</i>); HRSV (<i>Paramyxoviridae</i>); İnsan papilloma virüs (<i>Papovaviridae</i>) İnfluenza virüs (<i>Orthomyxoviridae</i>); reovirüs tip 3, grup A porcine rotavirüs (<i>Reoviridae</i>); insan korona virüs OC43, BCV, TGEV (<i>Coronaviridae</i>); adenovirüs 8, 19a (<i>Adenoviridae</i>); Sendai virüs, İnsan parainfluenza virüs 3, NDV (<i>Paramyxoviridae</i>); Sığır enterovirüs, TMEV suş DA, HRV 87 (<i>Picornaviridae</i>)

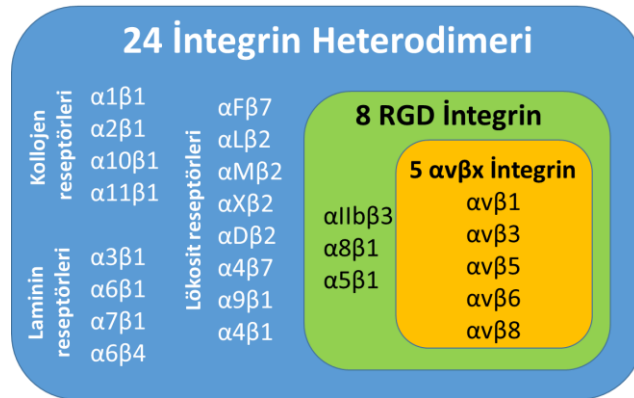
Şap virüsü integrinler aracılığıyla hücelere girerken, klatrin aracılı endositozu (CME) kullanır. CME, en iyi çalışılmış integrin internalizasyon yoludur ve bu sürecin anahtar komponentleri olarak tanımlanan 50'den fazla protein, membran invajinasyonunu, klatrin kaplı çukurların oluşumunu, kargo alımını ve vezikül kesimini koordine eder (Moreno-Layseca vd., 2019). Şap virüsü HPSGs aracılığıyla hücelere girerken kaveol aracılı endositozu kullanır ve kaveola, endozomlu trafik ile ilişkilendirilebilir ((Zahid., 2016; Ruiz-Sáenz vd., 2009). Ancak, yapılan çalışmalarda integrinlerin, şap virüsünün hücre içine girişinde heparan sülfattan daha fonksiyonel bir reseptör olduğu gösterilmiştir (Neff vd.,1998). Bununla birlikte, şap virüsünün hücre kültürüne adaptasyonunda integrinler yerine heparan sülfatlara bağlanma özelliğinin kazanılması, virüsün özelliklerinde değişikliklere neden olabilir. Aşı üretmek için kültüre adaptasyonu yapılan O Cathay topotipinin (1994-2005 yılları arasında Filipinlerde salgına sebep olan suş) BHK 21 hücrelerinde yüksek enfektivite göstermesine rağmen, süt emen farelerde bu enfektivitenin azalması nedeniyle orjin suşdan farklılaştığı gösterilmiştir. *In vitro*'da heparan sülfat, şap virüsü için iyi bir reseptördür. Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi, heparan sülfatın integrinlerle birlikte eksprese edildiğinde, virüsün heparan sülfata karşı daha fazla afiniteye sahip olduğu gösterilmiş olmakla birlikte bu glikozaminoglikanın *in vivo*'da şap virüsü enfeksiyonundaki rolü henüz bilinmemektedir. Bu veriler ışığında, hücre kültürüne adaptasyonu yapılan ve bundan aşı hazırlanan suşların *in vivo* ortamdaki sonuçlarında iyi olması beklendiği için, saha suşlarından hücre kültürüne adaptasyonu yapılacak aşı suşunu seçmek, aşı endüstrisi için kritik bir aşamadır (Ruiz-Sáenz vd., 2009).

2.6.1. İntegrinler

İntegrinler, çok hücreli hayvanların tüm çekirdekli hücrelerinde ifade edilen hücre adezyon moleküllerinin büyük ve temel ailesidir (Hynes, 2002; Lowell, 2012). Ancak çeşitlilikleri türlere göre değişir (Humphries, 2000, 2002). İntegrinler ilk defa 1986'da Tamkun ve arkadaşları tarafından integral membran proteini olarak karakterize edilmiş ve aynı çalışma grubundan, Hynes ve arkadaşları "integrin" adını, bir integral membran protein kompleksi olduğu ve bu proteinin hücre dışı matriksi hücre iskeletine bağladığı için önermişlerdir (Hynes, 2004). 1987'de tanınmasından bu yana, en çok araştırılan hücre adezyon reseptörleri ailesi olmuştur (Lowell ve Mayadas., 2012). İntegrinlerin doku organizasyonu ve hücre gelişimindeki temel rolleri, çift yönlü sinyal iletim mekanizmaları

olup (Şekil 2.8), son zamanlarda terapötik hedefler gibi potansiyelleri de belirlenmiştir (Campbell ve Humphries, 2011). Hücre proliferasyonu, apoptozis, hücre göçü, yangı, morfogenezis, embriyogenez ve yara tamiri gibi bir çok fizyolojik prosesi de düzenlerler (O'Donnell vd., 2005). Ayrıca gelişme, hemostaz, immün yanıtın yanı sıra kanser ve otoimmün gibi hastalıklara da katkıda bulunurlar. Mekanik olarak bağlama rollerine ek olarak, hücre iskelet düzeninden, hücre büyüme faktörü sinyali ve gen transkripsiyonuna kadar çeşitli süreçleri etkileyen, çift yönlü sinyal iletiminin önemli kanallarındırlar (Lowell ve Mayadas., 2012).

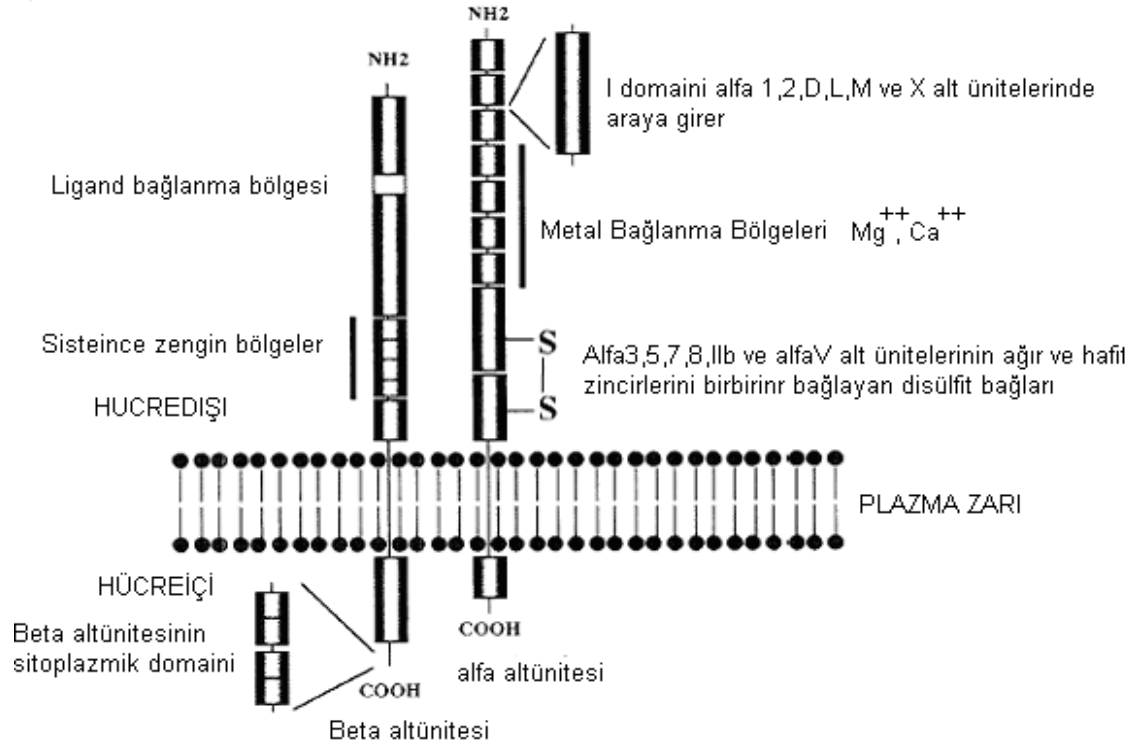
İntegrinler, birbirine non-kovalent bağlarla bağlı, alfa ve beta alt birimlerinin oluşturduğu heterodimer yapıya sahiptirler. Omurgalılarda, farklı bağlanma özelliklerine ve farklı doku dağılımına sahip 18 α ve 8 β alt ünitesinin kombinasyonları ile oluşan 24 farklı integrin heterodimeri vardır ve her bir integrin heterodimeri yaklaşık 24 nm uzunluğundadırlar (Şekil 2.6) (Campbell ve Humphries, 2011; Xiong vd., 2003). Bunlardan 8 tanesi RGD dizisi içeren ligandlara bağlanır ve bunların da 5 tanesi α v altünitesini (α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6, α v β 8) içerir (Şekil 2.6) (Hatley vd., 2018).



Şekil 2. 6. Tanımlanmış 24 integrin heterodimeri ve sınıflandırılmaları (Hatley, 2018)

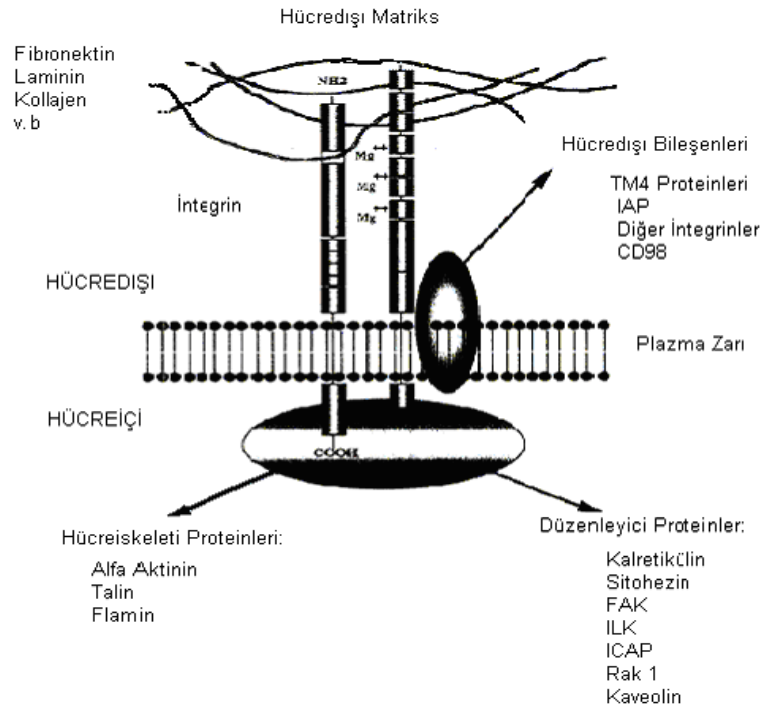
Her altünite büyük bir hücre dışı bölgeye (>700 amino asit), bir transmembran bölgeye ve kısa bir sitoplazmik bölgeye (50-60 amino asit) sahiptir (Şekil 2.7) (Darribere vd., 2000). Büyüklükleri değişebilir, ancak tipik olarak α ve β alt birimleri sırasıyla yaklaşık 1000 ve 750 amino asit içerir. Fakat beta 4 altünitesinin sitoplazmik bölgesi diğerlerinden

farklı olarak ~1000 amino asitlik uzun bir sitoplazmik bölgeye sahiptir ve dört tane fibronektin tip III tekrar alanı içerir (Campbell ve Humphries, 2011).



Şekil 2. 7. İntegrin altünitelerinin yapısı (Darribere vd., 2000)

İntegrinler, hücre iskeleti ile hücre dışı matris moleküllerini birbirine bağlayıp, bir sinyal makinesi şeklinde çalışarak, hücre dışı adezyon molekülleri ile hücre içi molekülleri arasındaki etkileşimi sağlarlar (Şekil 2.8). İntegrin aracılığıyla adezyon, hızlı ve tamamiyle düzenlidir. İntegrinin fonksiyonu, sitoplazmik bölgenin hücre içi proteinler ile etkileşimine bağlıdır. Alfa ve beta altünitelerindeki sitoplazmik etkileşimler, bir allosterik enzim aracılığıyla integrinin hücre dışı bölgesinin afinitesini düzenleyebilir (Liddington, 2004).



Şekil 2. 8. İntegrin heterodimerinin etkileşimde olduğu hücre iskeleti ve hücre dışı matriks molekülleri (Darribere vd., 2000).

Bu etkileşimlerde ligandlar önemli rol oynar (Hynes vd., 1989). İntegrinler, ligandlarına düşük afinite (10^6 - 10^9 litre/mol) ile bağlandıkları için, hücre yüzeyinde diğer reseptörlere oranla 10-100 kat daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar ve bu özellikleri ile diğer hücre yüzeyi reseptörlerinden ayrılırlar (Burman vd., 2006). Ayrıca bu zayıf bağlanma hücre için bir avantajdır, çünkü integrinler eğer ligandlarına kuvvetlice bağlanırsa, hücreler muhtemelen matrikse geri dönüşümsüz olarak bağlanacak ve hareketlilikten mahrum bırakacaktır. İntegrinler hücre yüzeyinde dağınık şekilde buldukları ligandlarına hemen bağlanamaz ancak belirli uyaranlar mevcut olduğunda, fokal temaslar oluşturmak için kümelenirler (Ruiz-Sáenz vd., 2009). Her integrin spesifik ligandlarını tanır ve her heterodimer için ligand özgülüğü alfa ve beta alt ünitelerinin spesifik kombinasyonları tarafından belirlenir (Milner and Campbell., 2002; Bowen ve Hunt., 2000). İntegrin-ligand bağlanması genellikle Mg^{2+} ve Mn^{2+} iyonları tarafından uyarılır, Ca^{2+} tarafından inhibe edilir. Ligandlara bağlanmak için, integrinin hem alfa hem de beta alt birimlerine ilaveten alfa zincirine bağlanan iki değerli katyona da ihtiyacı vardır (Ruiz-Sáenz vd., 2009). Ligandların yeterliliği ise integrinlerin substratlarında hazır bulunan tripeptit dizisiyle (RGD) birleşme sıklığıyla tanımlanabilir (Darribere vd., 2000). Bazı integrinler sadece bir spesifik liganda bağlanırken, bir kısmı da bir kaç liganda birden bağlanır, hatta bazı

hücre dışı ligandlar birkaç integrine birden bağlanabilir (Çizelge 2.2) (Loftus vd., 1994; Darribere vd., 2000; Milner ve Campbell., 2002). Bu bağlanma çeşitleri özgüllüğe ve çeşitliliğe izin verir. Çünkü aynı hücre dışı matriks ligandları farklı integrinler ile farklı hücre sel cevapları tetikler (Milner and Campbell., 2002).

Çizelge 2. 2. İntegrinler ve ligandları (Darribere vd., 2000)

İntegrinler	Ligandlar
$\alpha 1\beta 1$	Lamininler, kollajenler I/IV
$\alpha 2\beta 1$	Kollajenler, lamininler, tenaskin
$\alpha 3\beta 1$	Laminin, epiligrin, kollajenler, fibronektin, entaktin
$\alpha 4\beta 1$	Fibronektin, VCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	Fibronektin, L1/Ng-CAM, tenaskin, invazin
$\alpha 6\beta 1$	Laminin, merosin, kalinin, invazin
$\alpha 7\beta 1$	Lamininler
$\alpha 8\beta 1$	Fibronektin, tenaskin, vitronektin
$\alpha 9\beta 1$	Kollajen I, laminin, tenaskin, VCAM-1
$\alpha V\beta 1$	Vitronektin, fibronektin, osteopontin
$\alpha 11\beta 1$	Kollajen
$\alpha L\beta 2$ (LFA1)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha M\beta 2$ (Mac1)	Fibrinojen, C3b, ICAM-1, X faktör
$\alpha X\beta 2$	Fibrinojen, C3b
$\alpha D\beta 2$	ICAM-1, VCAM-1
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinojen, fibronektin, vitronektin, trombospondin, von Willebrand faktör
$\alpha V\beta 3$	Vitronektin, fibrinojen, fibronektin, osteopontin, trombospondin, denatüre kollajenler, tenaskin, von Willebrand faktör, laminin, PECAM-1/CD31, LI-CAM
$\alpha 6\beta 4$	Laminin, kalinin
$\alpha V\beta 5$	Vitronektin, osteopontin, fibronektin
$\alpha V\beta 6$	Fibronektin
$\alpha 4\beta 7$	Fibronektin, VCAM-1, MadCAM-1
$\alpha IEL\beta 7$	E.kaderin
$\alpha V\beta 8$	Vitronektin, fibronektin

İntegrinler, zarflı ve zarfsız virüsler tarafından hücreye bağlanma ve / veya giriş için kullanılan, fizyolojik olarak önemli reseptörlerin başında gelir (Stewart ve Nemerow, 2007). Bu bağlamda, integrinler şap virüsü için de hem virüsün hücreye bağlanması hem de hücre içine alınmasında temel hücre sel reseptörlerdendir ve *in vitro* da şap virüsü için tanımlanmış en az 4 integrin mevcuttur; $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$ (Duque vd., 2004; Wang vd., 2013).

$\alpha\beta 1$ integrin, 2002 yılında Jackson ve arkadaşları tarafından CHO (Chinese hamster ovary) hücrelerine transfekte edilerek ifade ettirildiğinde, hücrelerin şap virüsüne duyarlı hale geldiği ve böylece $\alpha\beta 1$ 'in şap virüsü için fonksiyonel bir reseptör olduğu kanıtlanmıştır. $\alpha\beta 1$ integrin, magnezyum ve kalsiyum iyonlarının normal fizyolojik konsantrasyonlarında virüs bağlanmasını ve enfeksiyonu desteklemez. Bununla birlikte mangan iyonlarının varlığında hücreler $\alpha\beta 1$ ifade ettiğinde, şap virüsünün hücreyi enfekte etmesinde önemli ölçüde artış olduğu görülmüştür. Şap virüsünün reseptör olarak $\alpha\beta 1$ integrini kullanabilmesi, integrin protein molekülleri ve ligandları arasındaki etkileşimin altında yatan bir hücresel düzenleyici mekanizmaya bağlı olabilir (Jackson vd., 2002; Berryman vd., 2005; Wang vd., 2015).

$\alpha\beta 3$ integrin, 1995'te Berinstein ve arkadaşları tarafından tanımlanan ilk şap virüsü hücresel reseptörüdür ve RGD tripeptidi aracılığıyla bütün şap virüsü serotiplerine bağlanabilir (Berinstein, 1995; Zahid, 2016). 2005 yılında Monaghan ve arkadaşları, immünofloresan konfokal mikroskopi ve gerçek zamanlı PCR kullanarak şap virüsü hedef dokularından olan sığır epitel hücrelerinde $\alpha\beta 3$ ve $\alpha\beta 6$ ekspresyonunu izlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, doğal enfeksiyon sırasında yüksek şap virüsü replikasyon seviyesine sahip epitelyal hücrelerin, $\alpha\beta 6$ 'yı ifade ettiği, ancak $\alpha\beta 3$ 'ü ifade etmediği ve yine ayaklarda enfekte çatal arası deri hücrelerinde de $\alpha\beta 6$ 'nın ifade edildiğini göstermiştir. Bu veriler $\alpha\beta 3$ 'ün FMDV'nin hedef epitel hücrelerini enfekte etmesi ve doku tropizm için *in vivo* da temel reseptör olmadığını da göstermiştir. Ancak $\alpha\beta 3$ integrinin şap virüsünün hücreye internalizasyonunda görev aldığı Berinstein (1995) tarafından gösterilmiştir. Ayrıca $\alpha\beta 3$ integrin ifade etmeyen fakat heparan sülfat ifade eden CHO hücrelerine insan $\alpha\beta 3$ integrin transfeksiyonu yapıldıktan sonra hücrelerde şap virüsü viral replikasyonunun gerçekleştiğini göstermişlerdir. Yine Neff ve arkadaşları (1998) α veya $\beta 3$ alt ünitelerinin sitoplazmik kısımlarının yokluğunun viral enfeksiyonun etkinliğini etkilemediğini göstermişlerdir. Bu nedenle $\alpha\beta 3$ integrin, diğer hücre yüzeyi molekülleriyle ortak reseptör olarak görev yapabilir ve virüslerin internalizasyonunda rol oynayabilirler (Neff vd., 1998; Neff vd., 2001).

$\alpha\beta 6$ integrin, ekspresyonu epitel hücreleri ile sınırlı olup, dil epiteli, uterus, mesane, solunum yolu ve tükürük bezi epitellerinde gözlenmiştir. Bununla birlikte, ifadesi epitel hücrelerinin çeşidine göre farklılık gösterebilir. Sağlıklı ve yetişkin epitel hücrelerinde

ise orta ya da düşük seviye de ifade edilir (Ruiz-Sáenz vd., 2009). Ayrıca, sığır ve koyunun trakeal epitel hücrelerinde yüksek oranda ifade edilmesi, geniş getiren hayvanlarda şap virüsü enfeksiyonunun erken safhasında giriş yolu olabileceğinin bir göstergesi olabilir. $\alpha\beta6$ integrinin dokulardaki dağılımı, şap virüsü için doku tropizmini belirleyen temel fonksiyonel bir reseptör olabileceğini göstermektedir (Wang vd., 2015). İntegrin $\beta6$ alt ünitesi sadece integrin $\alpha\upsilon$ alt ünitesi ile heterodimer oluşturur. 2000 yılında Jackson ve arkadaşları, şap virüsüne duyarlı olmayan SW480 (İnsan Dukes tip B kolorektal adenokarsinoma) hücrelerini insan $\beta6$ integrin alt ünitesi ile transfekte edip, şap virüsüne duyarlı hale geldiğini göstererek $\alpha\beta6$ integrinin şap virüsü için fonksiyonel bir reseptör olduğunu göstermişlerdir. Şap virüsünün hücre ile olan etkileşiminde, $\beta6$ alt ünitesinin sitoplazmik kısmının virüsün hücreye tutunmasında bir etkisi olmazken, virüs hücreye girdikten sonraki olaylarda önemli rolü olduğu saptanmıştır (Berryman vd., 2005).

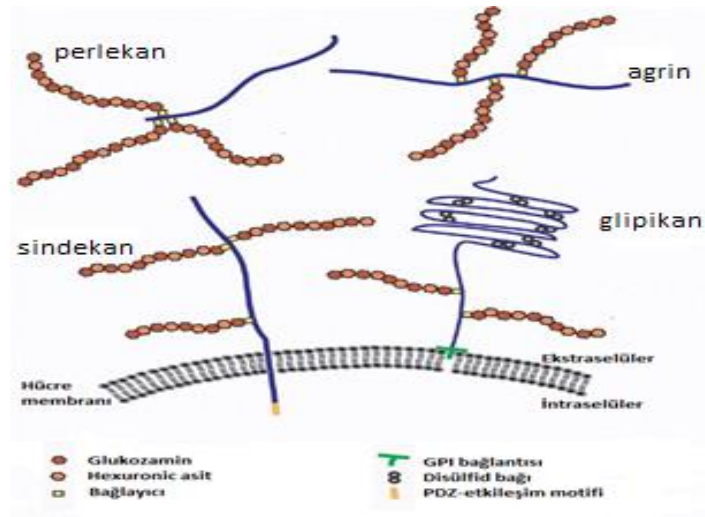
$\alpha\beta8$ integrin, Jackson ve arkadaşları (2004) şap virüsüne duyarlı olmayan SW480 hücrelerini insan $\beta8$ 'i ile transfekte ettikten sonra hücrelerin $\alpha\beta8$ ifade etmeye başladığını ve şap virüsüne duyarlı hale geldiğini göstermişlerdir. Böylece, $\alpha\beta8$ integrin, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ ve $\alpha\beta6$ 'dan sonra dördüncü şap virüsü hücrel reseptörü olarak doğrulanmıştır. Bu integrinin, şap virüsünün birincil proliferasyon bölgesi olan memelilerin solunum yolu epitelyal bazal hücrelerinde ifade edildiğinin gösterilmesi, şap virüsünün doku tropizmini ve patogenezini etkileyebileceğini de göstermiştir (Wang vd., 2015).

2.6.2. Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPGs)

Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPGs), genel olarak bir veya daha fazla kovalent olarak bağlanmış heparan sülfat (HS) zinciri içeren glikozaminoglikan (GAG)'ların bir türü olan glikoproteinlerdir. Hücreler konumlarına göre üç gruba ayrılan nispeten küçük bir HSPG seti hazırlar; membrana bağlı sindekanlar, glipikanlar, ekstraselüler matriksle etkileşimde olan perlekan ve agrin gibi (Şekil 2.9). Sindekan, bir C-terminal PDZ (postsynaptic density protein, disc-large, zonulin-1)-etkileşimli motif içeren kısa bir korunmuş sitoplazmik alana sahip, tek geçişli transmembran proteindir. HS yan zincirleri, korunmuş serin rezidülerindeki çekirdek proteinin hücre dışı alanına bağlanır. Glipikan çekirdek proteini, korunmuş disülfid bağlarıyla stabilize edilen bir globüler domainden oluşur ve bir GPI (Glycosylphosphatidylinositol) bağlantısı ile hücre yüzeyine bağlanır.

Sindekanın aksine, glipikandaki ana HS bağlantı bölgeleri membranın proksimaline yerleşmiştir. Perlekan ve agrin, birkaç HS bağlanma bölgesi içeren büyük multidomain proteinleridir. Her ikisi de alternatif ekleme ile üretilen ve birçok dokudaki bazal membranlarda çoklu izoformlar olarak bulunurlar (Rhiner ve Hengartner, 2006).

HSPG'ler hücre göçünde, salgı veziküllerinde bulunan serglisin salgılanmasından sonra çeşitli biyolojik aktivitelerin düzenlenmesinde, sitokinleri, kemokinleri, büyüme faktörlerini ve morfojenleri bağlayarak proteolize karşı korunmada birçok sisteme katılır ve görev alırlar. Ayrıca, proteazlar ve proteaz inhibitörleri için reseptör görevi görebilirler. Membran HSPG'leri, hücre-ekstra selüler matrisi bağlanmasını, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücre hareketliliğini kolaylaştırmak için integrinler ve diğer hücre adezyon reseptörleri ile işbirliği yaparlar ve sinyalizasyon reaksiyonlarının süresini değiştirirler (Sarrazin vd., 2011).



Şekil 2. 9. Hücre yüzeyi ve hücre dışı HSPG'ler (Rhiner ve Hengartner, 2006)

Küçük bir HSPG ailesi olan sindekanlardan sindekan-1, yaygın olarak epitel ve plazma hücrelerinde, sindekan-2 fibroblast ve düz kas hücreleri gibi mezenkimal hücrelerde, sindekan-3 nöronal dokularda ve kas-iskelet sistemi dokularında ifade edilir. Sindekan-4 ise diğerlerinin aksine birçok hücre tipinde bol miktarda bulunur. Sindekanlar, integrinler ve birkaç transmembran molekülü ile de etkileşime girerler. Hücrede bol miktarda bulunan yüzey molekülü olan heparan sülfatların, şap virüsünün hücreye olan afinitesini artıracak ve böylece reovirüsler için önerilen, hücre yüzeyine tutunmayı kuvvetlendirici mekanizmaya

benzer şekilde, bir integrin reseptörüyle karşılaşan virüs partikülünün şansını artırabilme olasılığı mevcuttur. Başka bir olasılık ise, HS proteoglikanlar ve integrin reseptörleri arasında doğrudan etkileşimin olabileceğidir. Yapışma molekülleri, vitronektin ve fibronektinin, integrin ve heparan sülfatların ortak eğilimleri olduğu da bilinmektedir ve iki reseptör molekülü arasında, belki de integrin aktivasyonunu içeren bir etkileşim olabilir. Üçüncü bir olasılık da, heparan sülfat proteoglikanların integrinler olmadan şap virüsünün hücre içine alınması için yeterli olabileceğidir (Stewart vd., 2003). Ancak, bu olasılıkların aydınlatılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla birlikte, HSPGs ailesinden hem sindekan-1 hem de sindekan-4'ün birkaç integrin heterodimeriyle doğrudan veya dolaylı etkileşimleri olduğu gösterilmiştir (Afratis vd., 2017). Ayrıca, Shi ve arkadaşları (2013) tarafından sindekan-1'in, bir RNA virüsü olan hepatit C virüsü için temel reseptör olduğu gösterilmiştir.

Fizyolojik koşullar altında, HS karbon zincirindeki N-sülfat grubu veya O-sülfat grubu, şeker zincirine birçok negatif yük sağlar. Bu sülfatlanmış polisakkarit dizi yapısı, HSPG'lere sadece anyonik özellikleri ve yüksek yoğunluklu negatif yükleri değil, aynı zamanda virüsler dahil diğer hücre dışı maddelerle etkileşime girme kabiliyetini de sağlar (Bernfield vd., 1999). Jackson ve arkadaşları (1996) şap virüsü ile enfekte hücrelerin heparin ile bloke edilebildiğini ve heparin ile muamale edilmiş hücrelerin şap virüsü enfeksiyonundan sonra plak oluşumunu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları O tipi şap virüsünün hücrelere girmesinin karmaşık bir işlem olduğunu ve hücre yüzeyi ile ilk temasın heparan sülfat aracılığıyla yapıldığını da göstermektedir. Hücre kültürüne adapte şap virüslerinin heparan sülfat affiniteleri integrine göre daha yüksektir (Sa-Carvalho vd., 1997). Hatta bazı suşlar RGD motifi ve integrin bağlanması olmaksızın direkt olarak heparan sülfat yoluyla bağlanabilirler (Baranowski ve ark., 2000). Şap virüsü kapsit proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3'te yer alan dokuz amino asidin öncelikle sülfatlanmış glikozil gruplarıyla etkileşimde olduğu belirlenmiştir (Fry vd., 1999, Fry vd., 2005).

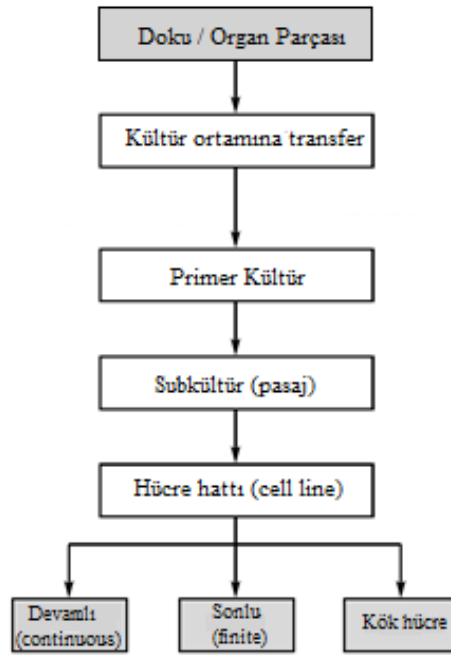
Transmembran proteoglikanların sindekan ailesi, adezyon oluşumunda hem erken hem de geç olayları düzenlemek için integrinlerle işbirliği yapmakla birlikte, şap virüsü tipleri farklı tipte reseptörler kullanabildiği için integrinler ve heparan sülfatlar arasındaki fonksiyonel ilişkiyi gösteren kanıtlarda henüz tam değildir (Roper vd., 2012). Birçok

çalışma heparan sülfatın, şap virüsü için yedek bir reseptör veya virüs enfeksiyonundan sonra hücrelere giriş için alternatif bir yol olabileceğini göstermiştir (Wang vd., 2015)

2.7. Hücre kültürlerinin kurulumu ve tanımlanmaları

Bütün iyi bilimsel uygulamalar için yüksek standartların korunması, üretilen sonuçların tekrarlanabilirliği, güvenilirliği, kabulü ve uygun maksimum seviyede uygulanmasını sağlamak esastır (Coecke vd., 2005). Memeli hücre kültürleri de biyolojik çalışmalarda temel bir araç olup, önemli bir deneysel süreçtir (Masters, 2000). Hücre kültürü, kendiliğinden göç, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılan hücrelerin *in vitro* ortamda yaşatılması ve çoğaltılmasıdır (Hayflick ve Moorehead, 1961; Freshney, 2010). *In vivo* ortam dışına çıkan hücre popülasyonlarının, hücresel fonksiyonlarına maksimum seviyede devam edebilmesi için ait olduğu organizmadaki koşulların mümkün olan en iyi koşullarda oluşturulması gerekir.

Spesifik organlardan veya dokulardan alınan parçaların aseptik koşullarda büyütülerek oluşturulan bu ilk kültürler birincil ya da primer kültür denir. Primer kültürler heterojen hücre popülasyonlarına sahip olup, standardizasyonları ve sürdürülebilirlikleri zordur. *In vitro* hücre ve doku sistemlerinin farklı tiplerini tanımlayan yayınlanmış çeşitli sınıflandırmalar olmasına karşın bu sınıflandırmalar yaygın olarak 3 tip altında toplanır (Şekil 2.10) (Coecke vd., 2005).



Şekil 2. 10. *In vitro* sistemlerdeki hücre hattı tipleri ve ilişkileri (Coecke vd., 2005).

Devamlı hücre hatları, ya kanserli doku orjinli ya da sonlu hücre hatlarının kendiliğinden veya dışardan müdahalelerle immortalize edilerek sonsuz üreme yeteneği kazandırılan hücre hatlarıdır. Bu hücrelerin fonksiyonel özelliklerini, mümkün olduğu kadar primer hücre kültürlerine yakın oranda göstermeleri ve sürdürebilmeleri beklenir. Ancak devamlı hücre hatlarının uzun süre pasajlanabilmeleri bir taraftan avantaj sağlarken diğer taraftan ilerleyen bu pasajlar hücrelerin genotipik ve fenotipik varyasyonlara, dejenerasyonlara, farklılaşmalara ve ayrıca genetik sürüklenme ile aynı zamanda kültürlerde heterojenliğe de neden olabilirler (Kaur ve Dufour, 2012). Devamlı hücre hatlarının primer hücre kültürlerine göre hassasiyetlerinin az olması, bazı avantajlarına rağmen diğer birçok dezavantajlarının da olması, primer kültürlerin güçlükleri de düşünüldüğünde amacına göre sonlu hücre hatları avantajlı hale gelebilir.

Normal, somatik hücreler sınırlı bir ömüre sahiptir ve tahmin edilebilir bir sayıda hücre bölünmesinden sonra yaşlanmaya başlarlar (Hahn, 2002; Hayflick ve Moorehead, 1961). *In vitro* ortama alındığında, bir defadan fazla pasajlanabilen ve bu süreler boyunca orjinindeki karyotip karakteristiğini koruyabilen ancak ölümsüz olmayan bu hücreler Hayflick ve Moorehead (1961) tarafından hücre suşları (cell strains) olarak tanımlanmıştır. Ama günümüzde bu hücreler için yaygın olarak sonlu (sınırlı ömüre sahip) hücre hatları

tanımı kullanılmaktadır. Sonlu hücre hatlarında devamlı hücre hatları gibi hücre alterasyonları ya da Hayflick'in tanımıyla transformasyon görülmez ya da çok nadirdir. Sonlu hücre hatları diploit hücreler olup belirli bir yaşam süresine sahiptirler. Hayflick ve Moorhead *in vitro* kültür ortamında, 25 adet insan fetal fibroblast hücreleri ile aktif çoğalma döneminden sonra ki dönemle (bu yaklaşık bir yıldan az sürmüştür) yaptıkları çalışmada, jenerasyon sürelerinin uzadığını, mitotik aktivitenin kademeli olarak düştüğü, ortamda hücrelerin parçalarının biriktiği, genel olarak dejenerasyona uğradıklarını ve yaşlanmış hücrelerin metabolik olarak aktif kalırken çoğalmadıklarını ve en sonunda da öldüklerini göstermişlerdir (Hayflick ve Moorehead, 1961, 1965). Böylece bu çalışma ile *in vitro* ortamdaki sınırlı yaşam süresine sahip diploit hücrelerin yaşlanması açıklanmıştır. Bu bağlamda, her hücre grubunun kendine özgü bir maksimum bölünme ya da katlanma sınırı vardır ve *in vitro* ortamda bu sınır "Hayflick Sınırı" olarak adlandırılmış ve genelde de bu sınır ortalama 40-60 bölünme olarak öngörülmüştür (Hayflick ve Moorehead, 1961; Shay ve Wright, 2000).

In vitro olarak belirli bir ömüre sahip sonlu hücre hatları, hücre bankalarında iyi karakterize edilmiş, stabil ve kalite kontrollerine sahip stoklar olarak muhafaza edilebilirler. Bununla birlikte, yaşlanmaya yaklaştıkça değişiklikler meydana gelebilir ve bu nedenle deneysel araştırmalarla belirlenen, tanımlanmış popülasyon ikiye katlanma sınırlarının aşılmasına dikkat edilmelidir (Bal-Price ve Coecke, 2011). Hücre yaşlanma birbirinden bağımsız iki mekanizma tarafından tetiklenir. Birincisinde, iki tümör baskılayıcı genin (p19ARF/p53 ve p16INK4a/Rb) kontrol ettiği iki yolak tarafından hücre siklusunun durdurulmasının uyarılmasıdır. İkincisi ise, kromozom replikasyonundaki son replikasyon problemi nedeniyle telomerlerin kritik kısalmasıdır (Jin vd., 2005).

Sonlu hücre hatlarının, ömürleri sınırlı olmasına rağmen iyi ve yoğun bir hücre bankalması yapılarak hem uzun süre kullanılabilme imkanının sağlanması hem de devamlı hücre hatlarına göre orijin açısından primer kültüre yakınlıkları nedeniyle hassasiyetlerinin de devamlı hücre hatlarından daha fazla olabileceği düşünüldüğünde, şap hastalığı ve diğer viral hayvan hastalıkları için de iyi bir alternatif hücre hattı olabilirler.

2.8. Hücre Kültürlerinin Karakterizasyonu

Hücre kültürü kökenli biyolojik ve biyoteknolojik ürünlerin üretimi, hücre kültürü kullanılarak yapılan araştırma ve geliştirme çalışmalarında, iyi bankalanmış yani güvenlik testleri ve karakterizasyonu tam yapılmış hücreler, bütün bu çalışmalarda, güvenliğin, kalitenin sağlanmasının, doğrulanmış bilimsel verilerin eldesi süreçlerinin temel kısmını oluşturur. Yeni bir hücre hattı, birincil bir kültürden veya mevcut bir hücre hattından türetildiğinde gelecekteki değerini tahmin etmek zordur. Genellikle, sadece bir kullanım ve subkültürasyon periyodundan sonra, hücre hattının gerçek önemi ortaya çıkar ve bu noktada orijin detaylarına ihtiyaç duyulur. Ancak, o zamana kadar geçmişe dönük bilgi toplamak için de çok geçtir (Kaplan ve Hukku, 1998; Freshney, 2010). Bu nedenle iyi tanımlanmış ve kontaminasyondan arı bir hücre hattı ile çalışmanın avantajları ve güvenliği tartışılmazdır. Ancak, çoğu araştırmacı bilim insanı tarafından bu konu pek takdir görmez. Yıllar boyunca, çok sayıda hücre hattının, kısmen zayıf teknikler ve yetersiz doğrulama protokolleri nedeniyle yanlış tanımlandığı gösterilmiştir (Reid, 2014). Hücre hattı yanlış tanımlaması ile ilgili problemler on yıllardır bilinmekle birlikte, günümüzde yanlış bilinen hücre hatları ile yapılan çalışmalara ait ~32.755 makale dolaşımdadır ve bunlar yanlış hücreler de dahil olmak üzere uyarı veya düzeltme yapmadan kalmaktadırlar (Horbach ve Halfman, 2017). Bir hücre hattının karakterizasyonu, sadece işlevselliğinin belirlenmesinde değil aynı zamanda orijinalliğini kanıtlamak için de hayatidir (Freshmey, 2010). Son yıllarda başka bir hücreyle kontamine ve yanlış tanımlanmış hücre hatları büyüyen bir problem olmaya devam etmektedir. Aslında günümüzde hücre hatlarının tanımlanmasında DNA profili testleri kolay ve ucuz hale gelmiştir. Artık verilerin doğrulanması için oluşturulmuş DNA veri bankaları da mevcuttur.

Karakterizasyon işlemleri kültürün başlangıç aşamasında yapılır ve stoğa alındıktan sonra kültür devam ettirilerek çalışma stokları hazırlanır. Aksi takdirde, bunlar dikkate alınmadan; kontaminasyon riski, karakteristikle ilgili kayıplar (yüzey antijenleri, monoklonal antikor salgılaması ve vb), stabil olmayan karyotipe sahip hücrelerdeki genetik sapmalar, sınırlı ömüre sahip diploit hücrelerde bu sınırın aşıldığındaki kayıplar, diğer hücrelerle olan çapraz kontaminasyonlar, çalışanın demoralizasyonu ve maliyet kaybı varlığında yapılan çalışmaların ne güvelliğinden ne kalitesinden ne de doğruluğundan

bahsetmek mümkün değildir. Hücre kültürlerinde karakterizasyonun gerekliliği Freshney (2010) tarafından bazı temel unsurlar altında toplanmıştır;

- Hücre hattının tür menşeinin doğrulanması,
- Çapraz kontaminasyonların olup olmadığının kontrol edilmesi,
- Doku orjininin doğrulanması,
- Hücre hattının tipinin (sonlu ya da sonsuz) belirlenmesi,
- Hücre hattı genetik kararsızlıklar ve fenotipik varyasyonlara eğimlilik gösterip göstermemesi,
- Aynı orijinli bir grup içindeki belirli hücre hatlarının tanımlanması (seçilen hücre suşlarının veya hibrit hücre hatlarının o hücre hattına veya hücre suşuna özgü özelliklerin gösterilmesini) gerektirir.

Sağlıklı bir hücre bankalama ve karakterizasyonunda kullanılan testlerin amacı yukarıdaki nedenlerin ortadan kaldırılması, üretim ve araştırma çalışmaları için kullanılan hücrenin kimliğinin, saflığının, doku orjininin, üreme özelliklerinin ve uygunluğunun onaylanmasıdır. Bu özelliklerin tanımlanması için yaygın olarak, DNA barkodlama, karyotip, transkriptom analizi, immünohistokimyasal metotlar, hücre morfolojisinin tanımlanması, büyüme eğrisi, popülasyon ikilenme zamanı ve benzeri testler uygulanmaktadır.

2.8.1. Mikrobiyal ve viral kontaminatlar yönünden güvenlik

Başarılı bir hücre kültürü çalışması, tamamen titiz aseptik tekniklerin uygulanmasına bağlıdır. Hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda çeşitli kontaminantlarla karşılaşmak mümkündür. Genel de kontaminasyonlar bakteri, mantar, maya, mikoplazma gibi mikrobiyal kontaminasyonlar, viral veya priona bağlı kontaminantlar veya yabancı hücre kontaminasyonu şeklinde olabilir. Hücre kültürlerinde kontaminasyon saptanması durumunda en uygun işlem kültürün imhasıdır. Ayrıca, kullanılan tüm besi ortamı ve diğer materyaller kontaminasyon kaynağının saptanması amacıyla kontrol edilmeli ve çalışma ortamı da dezenfekte edilmelidir. Çok önemli, çok değerli, yeri doldurulamayacak bir kültürde kontaminasyon saptandığında ise eradikasyon zorunlu hale gelebilir. Bu durumda antibiyotik uygulaması yapılmalıdır. Bu amaçla bakteri kontaminasyonlarında ampisilin, gentamisin, kanamisin, neomisin, penisilin, polimiksin B, streptomisin ve tetrasiklin; fungal

kontaminasyonlarda, amfoterisin B, ketakonazol ve nistatin; mikoplazma kontaminasyonlarında ise siprofilaksasin, BM-siklin gibi antibiyotikler ve mikoplazma uzaklaştırma ajanları kullanılabilir maddelerdir. Kontamine kültürler 10-14 gün kadar seçilen antibiyotik ile muamele edilir. Daha sonra kültürler sterilite testi uygulanır ve sonuca göre işlem tekrarlanır veya sonlandırılır. Kontaminasyonların giderilmesinin ardından pasajlar antibiyotiksiz besi ortamları kullanılarak sürdürülmelidir. Sterilite testlerinde genel prensip olarak hücre hattı serumu, besi ortamına ve ortam koşullarına adaptasyonu açısından antibiyotik kullanmaksızın üç kez pasajlanır ve bakteri, mantar, maya ve mikoplazma ajanı yönünden testler tekrar yapılır. (Freshney, 2010).

Mikoplazma kontaminasyonu kolayca tespit edilemez ve böylece yaygınlaşmaya devam eder. Dünya çapında test edilen kültürlerin en az %20'si mikoplazma ile kontamine edilmiştir. Dolayısıyla bu kontaminasyonlar geçersiz kılınmadığı takdirde araştırmaları tehlikeye atarlar. Doğrudan tespit yöntemleri, direkt kültür ile üretme, DNA floresan boyama (Hoechst 33258 veya DAPI)'dır. Diğer dolaylı yöntemler, DNA hibridizasyonu, ELISA tabanlı ticari kitler, immünofloresans, otoradyografi ve spesifik biyokimyasal analizler ve PCR tekniği tespit için kullanılmaktadır (Reid vd., 2001)

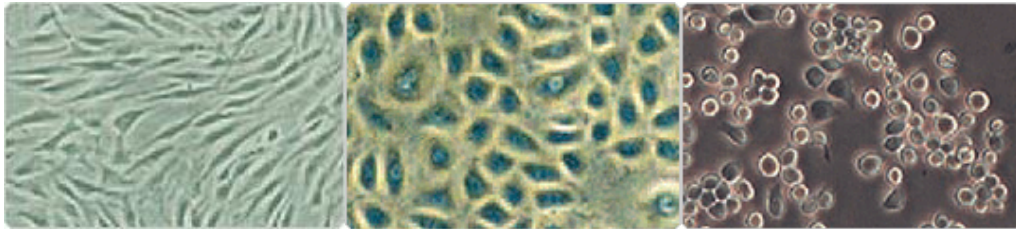
Farklı hücrelerle olan çapraz kontaminasyonlar, zayıf teknik kullanımı da dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı ortaya çıkabilir. Filtresiz pipetler, besin ortamlarının ve reaktiflerin farklı hücre hatları arasında ortak kullanımı, destekleyici ve stimülatör olarak kullanılan, mitotik olarak inaktif besleyici başka hücrelerin tam olarak inaktif olmamış olmasından dolayı taşınabilecek diğer hücreler ya da kontaminantlar sayılabilir. Ayrıca, pasajlama ve dondurmalar sırasındaki yanlış etiketlemeler ile kültürleri karıştırılabilir ve böylece bir hücre hattı başka bir hücre hattı olarak kaydedilmiş olabilir. Kültür şişelerinin etiketlenmesi sırasındaki basit hatalar, yayınlanmış bir makalede hücre hattı adının kesilmesi veya tipografik hatalar, başka bir araştırmacının devam eden deneysel çalışma için aynı hücre hattını kullanmaya çalıştığı olaydan sonraki yıllar boyunca önemli bir karışıklığa da yol açabilmektedir. Ne yazık ki, hücre soyları genellikle başlangıçta çapraz kontamine olurlar ve kaynak da genellikle yine laboratuvarıdır. Çapraz kontaminasyonlarda tedavi yöntemi olarak hücre tekrar klonlanarak saf hale getirilebilir (Capes-Davis vd., 2010).

Viral ajanlar yönünden sterilite testleri ise genelde hücre hattı 5-7 gün süren uzun süreli inkübasyonları içeren 3 seri kör pasajdan sonra şüpheli numunelere PCR,

immünfloresan, immünperoksidaz vb. testleri uygulanarak yapılır. Aranacak viral kontaminatlar konakçı grubuna göre değişebilir (ICH guidelines Q5D, 1997; Schiff, 2005; Freshney, 2010). Virüs kontaminasyonu saptanan kültürün kullanımı elzem ise öncelikle spesifik antikolarla muamale edilerek viral ajan nötralize edilerek (virüs tipine ve çalışmanın hedefine göre) kullanılabilir. Ancak hücre kültüründe prion kontaminasyonları mevcut ise kültür imha edilir (Freshney, 2010).

2.8.2. Hücre morfolojisi

Karakterize edilen hücrelerin şekli ve morfolojisinin incelenmesi, bir çok hücre dizisinin benzer ölçü ve şekle sahip olmasından dolayı çok kalitatif olmasına rağmen en kolay ve direkt metottur. Kültürdeki memeli hücreleri, morfolojik açıdan temelde 3 kategori de altında toplanır. Fibroblast benzeri (fibroblastik), epitel benzeri ve lenfoblast benzeri (Şekil 2.11). Ancak farklı kültürel koşullara cevapta, hücre morfolojisinin esnekliği ile ilgili olarak bir takım eksiklikler olabilir. Mesela, bütün bir yüzeyi kaplamış epitelyal hücrelerin merkezde olanları genellikle daha düzenli, poligonal ve sınırları daha belirgin iken, bir kümenin dış sınırında bulunan epitelyal hücreler daha düzensiz, mesafeli ve hatta hücreler transforme ise kümeden uzaklaşarak fibroblast benzeri bir görünüm alabilirler.



Şekil 2. 11. Hücre morfoloji tipleri. A) Fibroblastik B) Epitelyal C) Lenfoblastik
(<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasic>)

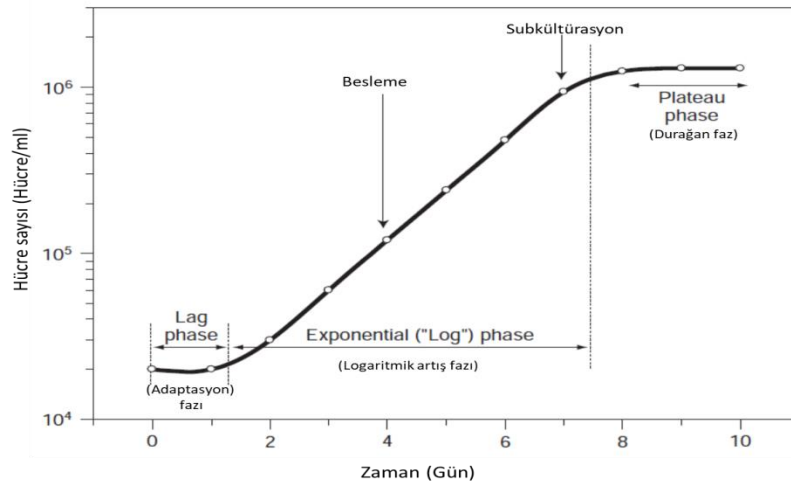
Fibroblastik ve epitelyal terimleri hücre kültüründe genel anlamda ve sıklıkla da hücrelerin orjininden ziyade görüntüleri ile ilintili olarak kullanılan bir tanımdır. Fibroblastik hücreler olarak adlandırılan, bipolar ve multipolar göç hücrelerinin uzunluğundan iki kat daha büyüktür ve bir yüzeye tutunarak çoğalırlar. Epitelyal hücreler ise poligonal, daha düzenli boyutlara ve sıkı bağlantılara sahiptir ve fibroblast benzeri hücreler gibi bunlar da bir yüzeye tutunarak çoğalırlar. Lenfoblastik hücreler ise sferik şekilde ve

genellikle bir yüzeye tutunmadan ya da zayıf bağlarla tutunarak çoğalan hücrelerdir. Hücreler geçirdikleri bir çok kültürasyon işleminden sonra boyutlarında küçülmeler meydana gelebilir. Eğer hücre şekli ve morfolojisi değişiyorsa hücrenin kalitesinin de sorgulanması gerekir. Sağlıksız ve yaşlanan hücrelerde granüller oluşur ve bu granüllerde daha sonra çekirdek çevresinde vakuol oluşumunda rol alırlar. Hücrelerin boyanarak incelenmesi, hücre morfolojisini gözlemlemek ve hücreleri tanımlamak için kullanılan en kolay ve en direkt tekniklerdendir. Hücre kültürlerinde hücre morfolojisini ve canlılığının saptanmasında yaygın olarak kullanılan boyalara, tripan mavisi, kristal viyole, Giemsa, metilen mavisi, nötral kırmızısı sayılabilir (Freshney, 2010).

2.8.3. Hücre büyüme kinetiği

Hücre büyüme zamanı, kültürün tutarlılığını izlemek ve alt kültür için en iyi zamanı, optimum seyreltmeyi ve farklı hücre yoğunluklarında tahmini kaplama verimini bilmek için çok önemli bir unsurdur. Bu nedenle rutin bakımda önemli olduğu kadar hücreleri karakterize etmek için de kullanılan parametrelerden biridir. Büyüme zamanı doğru ilerleyen bir kavramdır. Bir hücre hattının kullanıldığı sürece büyüme miktarı kayıt edilmeli ve güncelleştirilmelidir. Hücreler, bir hücre popülasyonunun büyüme miktarı ile bağlantılı olarak replikasyon için zamanın belirli bir kısmına karakteristik olarak ihtiyaç duyarlar. İlerleyen aşamalar hem büyüme zamanı hem de kültüre edilmiş bir hücre popülasyonunun büyüme miktarını hesaplamak için takip edilebilir. Sonlu hücre hatları için pasaj sayısı, kültür başlatıldığından itibaren kabaca nüfusun iki katına çıkma seviyesine eşittir ve subkültürasyon oranı genellikle 1:2 dir. Böylece pasaj sayısı ile nesil sayısının artışı doğru orantılı olarak sağlanmış olur ve bu da hücre hattının sonlandığı pasaj oranını doğru tespit edilebilme imkanı sağlar. Sürekli hücre hatlarında ise çoğalma daha hızlı olduğu için bölünme oranları da daha yüksektir, buna bağlı olarak pasaj oranları da daha yüksek olacağı için pasaj sayısı ve nesil sayısı doğru orantılı olarak ilerlemeyebilir (ECACC, 2019).

Hücre kültüründeki popülasyonun ikiye katlanma zamanı, hücre soyuna, klonlama ile elde edilmişse klonal varyasyonlara ve kültür koşullarına bağlıdır. Ancak aynı şartlar altında yetişen, kökeni aynı ve tek bir hücre popülasyonundan oluşan hatların tutarlılık göstermeleri gerekir.



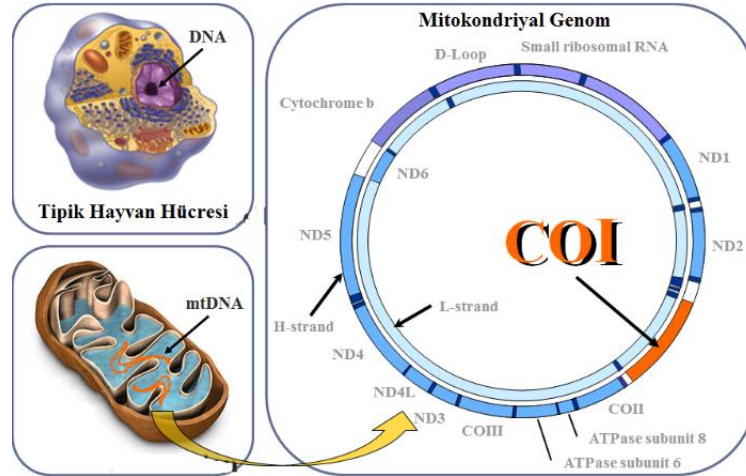
Şekil 2.12. Büyüme eğrisi ve fazları (Freshney, 2010)

Bir hücre kültür döngüsünün standart büyüme kinetiği gecikme ya da diğer deyişle adaptasyon (lag) fazı ile başlar. Bu fazda, hücrelerin pasajlama işlemleri sonrası toparlanması, hücre iskeletlerinin yeniden yapılanması, bağlanabilmesi için gerekli matriksin salgılanması ve substrat üzerinde yayılması için gereken süredir ve hücrelerde çoğalma gözlenmez. Adaptasyon fazını hücre sayısının artış gösterdiği logaritmik/üstel (log) faz takip eder. Ardından, hücre sayısının artmasına bağlı olarak kültür ortamındaki yetersizlikler nedeniyle hücreler büyümenin sifıra yaklaştığı durağan faza girerler ve sonunda süreç hücrelerin gerilemesi ve ölümüne doğru ilerler (Şekil 2.12). Hücre hattının popülasyon ikilenme zamanı (PDT=population doubling time), bir hücre popülasyonunun, lineer büyüme sürecinde, üstel fazda iki katına çıkması için geçen ortalama süredir ve $PDT = 1 / [(3,32 \times (\log C_1 - \log C_0)) / 24]$ formülüne göre üstel fazdan hesaplanır (Freshney, 2010). Kanser kökenli devamlı hücre hatlarında PDT 12-15 saat arasında olabilirken, sonlu (diploit) hücre hatlarında PDT 20-70 saat arasında değişebilir (Phipps vd., 2007; Geraghty vd., 2014).

2.8.4. DNA barkodlama

DNA barkodlama, türlere özgü DNA profillerini ortaya çıkaran bir yöntemdir. DNA barkodlamanın amacı, yaşam tarihlerinin herhangi bir aşamasında, organizmaların küçük bir kısmından izole edilmiş genetik materyallerin şablon olarak kullanılarak, metazoalar üzerinde evrensel olarak büyütülmüş tek bir genin dizilmesi ile örnek türlerin belirlenmesidir. Diğer bir deyişle, genomik DNA'nın kısa ve standart bir fragmanının

kullanılarak organizmaların tanımlanmasını sağlayan taksonomik bir yöntem olarak da ifade edilebilir. Teorik olarak, tüm türler kendi benzersiz barkod dizileriyle veya çok benzer dizilerin sıkı bir kümesi ile tanımlanır (Ward vd., 2005). Yöntemin gerçek yaygınlığı 2003 yılında Hebert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla artmıştır. Yaptıkları çalışma, sürdürülebilir bir tanımlama kabiliyetine sahip olmanın tek ihtimalinin “DNA sekanslarını takson “barkod” olarak kullanan sistemlerin kurulmasına bağlı olduğu” düşüncesine dayandırılmış ve bunun için de mitokondriyal sitokrom C oksidaz 1 geninin (CO1) hayvanlar için küresel bir biyo-tanıma sisteminin çekirdeği olarak hizmet edebileceğini göstermişlerdir (Şekil 2.13) (Hebert vd., 2003a). Mitokondriyal genom introndan yoksun, haploit yapıda sınırlı rekombinasyon sergilemesi ve maternal kalıtıma sahip olması nedeniyle nükleer genoma kıyasla DNA barkodlama çalışmalarında daha çok tercih edilir. Ayrıca, her hücrede birkaç mitokondri ve her bir mitokondride nispeten bol miktarda DNA kopyası bulunmaktadır (1 ila 1000 kopya). Bu nedenle, çalışılacak doku örneği sınırlı olsa bile, başarılı bir PCR için yeterli miktarda mitokondriyal DNA elde etmek mümkündür (Hebert vd., 2003a; Blaxter 2004). Ayrıca, DNA dizilerinin kullanılmasının temelinde, dizinin tür içerisindeki farklılık seviyesinin türler arasındaki farklılık seviyesinden daha düşük olduğu varsayımının bulunmasıdır (Keskin ve Atar, 2013). Bu da gen dizisinin evrim sürecindeki değişme oranıyla bağlantılıdır. Bu oran aynı tür içerisinde oldukça yavaş olmasına rağmen, farklı türler arasındaki farklılaşma için yeterince hızlı olmasıyla açıklanabilir (Rach vd.,2017). Bu nedenle, CO1 geninin standart barkod geni olarak seçilmesindeki asıl neden, birden fazla tür için göstermiş olduğu belirgin ayırım gücü ve tür içi ile türler arasındaki uzaklığın çakışmadığı tipik varyasyon modeli olmasıdır (Keskin ve Atar, 2013). Başlangıçta, mitokondriyal sitokrom oksidaz alt birim 1'i kodlayan *cox1* geninin, hayvan DNA barkodlaması için spesifik bir mitokondriyal marker olduğu önerilmiştir. Sonrasında araştırmacılar, geniş bir hayvan türü yelpazesi için büyütülmüş ve bir çift evrensel primerle dizilebilen genin 5'ucu yakınında ~648 nükleotid dizisi tanımlamışlardır. İdeal bir barkod belirtecinin amplifikasyonu ve hizalanması da kolay olmalıdır. Dolayısıyla CO1 geni bu bakımdan da son derece uygundur. Böylece, tanımlanamayan türlerin DNA dizileri ile DNA barkod veri tabanlarındaki DNA dizilerinin eşleştirilmesi yöntemiyle bu türlerin tanımlanmasını sağlayacak evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır. Tamamlanmış mitokondriyal DNA genomlarının dizileri halka açıktır. Böylece diziler, yayınlanmış bir mtDNA genomuna sahip herhangi bir türün amplifikasyonu ve sekansı için kullanılabilir (Nicole vd., 2012).



Şekil 2.13. Mitokondriyal genom ve COI geninin pozisyonu (Trivedi vd., 2016).

2004 yılında türlerin DNA barkodlanmasında standart ve ortak bir protokol oluşturulması ve geniş kapsamlı DNA barkod kütüphanesinin oluşturulması amacıyla ‘Yaşamın Barkodlanması Konsorsiyumu’ (Consortium for the Barcode of Life “CBOL”) kurulmuştur. Bunu takiben, 26 ülkenin katılımıyla, tüm ökaryotların DNA barkod kütüphanesinin otomatik olarak tanımlanmasını hedefleyen “Uluslararası Yaşamın Barkodlanması (IBOL; International Barcode of Life)” adı altında bir işbirliği başlatılmıştır. DNA barkodlamanın potansiyel kullanıcıları sadece taksonomistler değildir. Yöntem ile hücre izoenzim analizlerindeki gibi hücre kültürlerindeki çapraz kontaminasyonların varlığı da ortaya konabilmektedir. Bu yöntem adli bilimler, biyoteknoloji, gıda endüstrisi, hayvan besleme, genetik çeşitlilik ve tür ayrımı gibi birçok alanda kullanılabilecek bir araç olarak literatürdeki yerini almıştır (Ward vd., 2005).

2.8.5. Karyotip

Kromozom içeriği veya karyotip, hücre hatlarını tanımlamak ve bunların türetildiği tür ve cinsiyetle ilişkilendirmek için en karakteristik ve en iyi tanımlanmış eski ama hâlâ geçerliliği olan temel yöntemlerden biridir. Kurulumu biraz daha zor olsa da nispeten basit ve ucuzdur. Ancak değerlendirme ve yorumlama iyi bir tecrübe ister, özellikle de tümör orjinli hücre hatlarının sitogenetik analiz için hazırlanmaları zor olabilir ve tipik olarak heteroploid olmaları, yorumlamayı zorlaştırabilir. Bu nedenle de operatörün deneyimi başarı için önemlidir. Günümüzde insan, at, fare ve diğer memelilerin karyotiplerine ve sıçan

ideogramına rahatlıkla ulaşılabilir. Kromozom analizi normal ve transforme edilmiş hücreler de ayırt edebilir, çünkü kromozom sayısı, normal hücrelerde daha karardır. Aynı türden köken alan, diziden diziye ya da aynı diziyi içeren hücreden hücreye yaygın karyotipik varyasyonlar olabilir (Capes-Davis vd., 2010; Freshney, 2010). Karyotip ile kromozomların boyutunu, şeklini ve sayısını belirlemek ve değerlendirmek oldukça kolay olup görüntülemeledeki ilerlemeler, yeni moleküler problemler ve otomasyonla birlikte, bu prosedürün verimliliği büyük ölçüde artmıştır (Khatun vd., 2011). Kromozomal sapmaları tespit etmek için kullanılan klasik Giemsa boyama ve klasik bantlama yöntemleri olan, G-bantlama (Giemsa), Q-bantlama (Quinacrine), R-bantlama (Q ve G bantının tersi), C-bantlama (yapısal heterokromatin)'dir. Tripsin ve giemsa boyasının kullanıldığı G-bantlama tekniği dünya çapında en çok kabul görenidir (Udroiu ve Sgura 2017). Bantlama düzeni, iyi bilinen sayısal sapmalara ek olarak, yer değiştirme, ters çevirme, silmeler ve kopyalamalar gibi çeşitli yapısal sapmaların tespit edilmesini sağlamıştır (Smeets vd., 2004). Metafaz preparasyonları çok zor olmayan ve kısa sürede sonuçlanabilen testler olması nedeni ile hem pratik hem de hücre kültürünün mevcut durumunun tespiti açısından oldukça faydalıdır. Böylece bir laboratuvarındaki kültüre edilmiş hücrelerin iyi bilinen karyotipi, pasajlar ile hücre hattındaki değişebilen farklılıkları ve benzerlikleri kısa sürede gösterebilir. Kromozom bantlama teknikleri, evcil hayvanların kromozomları hakkındaki bilgileri arttırmış olup, farklı türler arasında karşılaştırmalı kromozom bantlama çalışmaları, homolojileri veya farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır. Bu çalışmalar, çok önemli türlerin standart karyotiplerini elde etmek için temel oluşturmuştur (Iannuzzi, 2007).

Sığır otozomlarının tanımlanması ve sınıflandırılması her zaman sitogenetikçiler için ciddi bir problem teşkil etmiştir. 1980'de gerçekleştirilen Okuma Konferansı (Reading Conference), sığırın standart bantlı karyotipini, önceki çalışmalara ve inek GTG bantlı standart karyotipinin temeli olan Lin ve arkadaşlarının rapor ettiği orijinal çalışmaya dayanarak düzenlemesi, atılan ilk önemli adımdır. Bu konferansta bildirilen G bantlı sığır karyotipi, neredeyse tüm otozomların kolayca tanımlanmasına izin veren daha iyi bir bantlama deseni çözünürlüğü göstermiştir (Iannuzzi, 1996).

2.8.6. Transkriptom analizi

Transkriptom, bir hücrede bulunan bütün transkriptlerin çeşidinin ve miktarının eş zamanlı olarak incelenmesidir. Bir örnekte bulunan RNA miktarına bağlı olarak, genlerin seçilmiş bir alt grubunun veya tamamının ekspresyon düzeyini, tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP), insersiyonları, delesyonları, translokasyonları ve kodlanmayan RNA'ları incelemek mümkündür. Böylece transkriptom analizi ile hücre içerisindeki dinamik işleyişin eş zamanlı ve paralel olarak incelenmesi de mümkündür. Biyoinformatik analizler sayesinde elde edilen veriler değerlendirilerek RNA dünyası aydınlatılabilmektedir (Sarman vd., 2015). Tür tanımlamasında, azınlıktaki ve karışık kaynaklardan gelen türlerin belirlenmesinde güçlüklerle karşılaşılabilir. Bu güçlükler için Yeni Nesil Dizileme tekniği (Next Generation Sequencing =NGS) çözüm olanakları sağlamaktadır. Bu yeni teknolojiler, örneğin Neandertal ve Yünlü Mamut genomlarının yazılması gibi büyük genom dizileme projeleri için kullanılmıştır. Türlerin tanımlanması için yapılan uygulamalarda, Coghlan ve arkadaşları kısa süre önce geleneksel Çin ilaçlarındaki bitki ve hayvanların tanımlanması için yeni nesil bir derin dizileme teknolojisini kullanarak düşük maliyetli ve verimli bir yöntem sunmuşlardır (Tilmar vd., 2013). Çeşitli özelliklere sahip yeni nesil dizilemenin çoklu platformları, genlerin tanımlanması, ekzon, varyantlar, transkriptler ve küçük RNA'lar gibi özel uygulama için açık avantajlara sahiptir (Tripathi vd., 2016).

RNA dizileme (RNA sekanslama), DNA dizileme ile benzer prensiplere sahip olmasına rağmen, örnek hazırlama aşamasında ve biyoinformatik analizlerde farklılıklar içermektedir. Ökaryotik hücresel RNA, %80 ribozomal RNA (rRNA)' dan oluşmaktadır. Ekspresyon analizinde rol alan RNA'ları belirlemek için total RNA'dan rRNA'yı uzaklaştırmak gerekmektedir. Uzaklaştırma işlemi uygun kitler kullanılarak ya da enzimatik degradasyon ile yapılabilir. RNA dizilemede RNA, önce daha stabil olan komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir, rastgele fragmente edildikten sonra DNA yeni NGS teknolojisi kullanılarak dizilenir. Dizileme sonucu elde edilen bu fragmentler referans genom ile karşılaştırılarak biyoinformatik yöntemlerle analiz edilir (Sarman vd., 2015).

2.8.7. Doku orijinin immünohistokimya ile tanımlanması

Omurgalı dokuları geleneksel olarak iki ana kategoriye ayrılırlar. Birincisi, az miktarda hücre içi destek proteinleri içeren ektodermal veya endodermal kökenli epitel dokular ve ikincisi ise önemli miktarda hücre dışı proteinler içeren (örneğin glikozaminoglikanlar, kollajen lifleri, vb.) mezodermal kökenli mezenkimal (bağ) dokulardır. Ancak, bu iki kategori arasındaki fark, bazı ders kitaplarının bildirdiği kadar keskin değildir ve keratinize dokular gibi bazı dokular bu şemaya tam olarak uymamaktadır. Tüm dokular, hücrelerin yanı sıra hücreler tarafından üretilen hücreler arası veya hücre dışı maddelerden de oluşur. Hücreler arası veya hücre dışı maddeler dokunun özelliklerini belirlerler (Bragulla ve Homberger, 2009). Hücre kültürlerinin doku orjinlerinin belirlenmesinde faydalanılan alanlardan olan immünohistokimyasal yöntemlerde de dokulara özgü proteinler kullanılır.

İmmünohistokimya (ICC), hücrelerin histolojik orjinini tanımlamak için ilgili doku intermediyer filamentine özgü monoklonal antikorlar aracılığıyla yapılan yöntemlerdendir. Hücre iskeleti elemanlarından olan intermediyer filamentler dokudan dokuya farklılık gösterir. Epitel hücrelerinin intermediyer filamentleri genellikle sitokeratinlerin spesifik kombinasyonları oluşturur. Fibroblast hücrelerinde ise başta vimentin ve kollajen tip 1 olmak üzere bir kaç intermediyer filamentleri mevcuttur (Burry, 2010). ICC, proteinlerin ve moleküllerin benzersiz şekilde algılanmasını sağlayan spesifik reaktifler olan antikorları kullanır. ICC, antikorun görünür bir etiketle etiketlendiği spesifik bir antijen-antikor etkileşimi yoluyla, bir doku bileşeninin *in situ* olarak tanımlanmasıdır. Antikorların kullanılması özel yöntemler, etiketler ve kontroller gerektirir. Bu nedenle de immünohistokimya deneylerini yapabilmek için temel biyoloji bilgisi gerekir. İmmünohistokimya, antikorların proteinlerdeki benzersiz amino asit dizilerine yüksek oranda spesifik bağlanma gücünü kullanır. Belki de antikorları kullanmanın en heyecan verici kısmı, yeni antikorların ihtiyaç duyulduğunda üretilmesi ve böylece yeni reaktifler için sürekli bir kaynak sağlanıyor olmasıdır. Antikorların hücrelerdeki yerini belirlemek, etiketlerin mevcudiyetine dayanır. Zaman geçtikçe immünohistokimya, yeni etiket gelişimine ve gelişmiş etiketleme yöntemlerine cevap vermeye devam etmektedir (Burry, 2010). Günümüzde yaygın olarak daha hassas, çok yönlü ve dolaylı yöntem olarak tanıtılan bu gelişmiş immünohistokimya metodu kullanılmaktadır. Bu dolaylı yöntemde, antijene bağlanan

spesifik antikor, bir florofor veya bir enzim ile etiketlenmiş başka bir antikor olan ikincil bir reaktif ile tespit edilir. İmmünoboyamadan toplanabilen bilgiler, yalnızca ilgili bir proteinin belirli bir hücre veya doku bölgesinde mevcut olup olmadığı ile sınırlı değildir. Prensip olarak, bir proteinin ömrü boyunca geçirdiği işlemlerin neredeyse tamamı (proteinin alt hücrel lokalizasyonunda değişiklikler, ekspresyon ve/veya lokalizasyon paternlerindeki gelişimsel veya patolojik değişiklikler, diğer proteinlerle birleşme veya ayrılma, hatta glikozilasyon ve fosforilasyon, translasyon sonrası modifikasyonlar gibi) antikor kullanımı ile ICC aracılığıyla keşfedilebilir (Bocksteins vd., 2012).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sığır fötüsü

Bu tez çalışmasında kullanılan sığır fötüsü, 5 Şubat 2014'te 28914 sayılı "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik (HEYDEK)" esaslarına ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu tarafından verilen (EK-A), etik kurul raporu çerçevesinde veteriner hekim kontrolündeki mezbahadan temin edilmiş ve bu esaslara göre çalışılmıştır. Mezbahadan alınan yaklaşık 5 aylık sığır fötüsü 10x antibiyotikli [(Amfoterisin B (ampB)+streptomisin/penisilin+siprofloksasin)] soğuk 4°C PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tampon solüsyonu, pH 7,2) içine konularak yine soğuk zincirde laboratuvara taşınmıştır.

3.1.2. Kontrol grubu hücre hatları

Virüs çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılan orjini BHK21/C13 olan BHK 21 An₃₁ hücre hattı, sterilite testlerinde kullanılan Vero (Afrika Yeşil Maymunu böbrek hücresi) hücre hattı ve MDBK (Sığır böbrek hücresi) hücre hattı, Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre Bankası'ndan (HÜKÜK) temin edilmiştir. İmmünoboyamalarda kullanılan epitelyal hücre hattı KYSE 410 (insan özofangial skuamöz hücreli karsinoma) ve fibroblastik hücre hattı COLO-849 (insan meatastatik malign melanoma), TÜBİTAK 2214A bursu kapsamında karakterizasyon çalışmalarının yürütüldüğü The Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)'den temin edilmiştir. DNA barkodlamada kontrol grubu olarak kullanılan MDBK (sığır böbrek epitel hücresi), 3T3 (fare embriyo fibroblasthücresi) ve FLK-BLV-044 (koyun embriyonal böbrek hücresi) hücre hatları da yine aynı şekilde DSMZ'den temin edilmiştir.

3.1.3. Şap virüsleri

Bu çalışmada kullanılan A TUR/11, OTUR/07 ve Asia1/11 tipi şap virüsleri Ankara Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Virüs Bankası'ndan sağlanmıştır. Virüsler önceden BHK 21 An₃₁ hücre hattına adaptasyonu, hücre hassasiyet ve sterilite testleri yapılarak, Virüs Bankası stoklarında bulunan ve rutinde kullanılan laboratuvar suşlarından seçilmiştir.

3.1.4. Saha materyalleri

Saha materyali örnekleri, şap hastalığı geçiren hayvanların dokularından (ağız, dil, ayaktan alınan epitel dokusu, kalp, salya) alınarak Şap Enstitü'süne gönderilen örneklerden oluşmaktadır. Bu örnekler Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Tip Tayini Laboratuvar'ı tarafından kantitatif RT-PCR ile test edilip pozitif bulunup, serotiplendirmesi yapılmış ama BHK 21 hücre kültüründe negatif bulunanlar arasından 20 adet olarak seçilmiştir. Örneklere ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Şap virüsü içeren saha materyalleri bilgi tablosu

Saha materyali no	Hayvan nevi	Doku	Virüs serotipi (qRT-PCR ile direk saha materyalinden)
1	Sığır	Epitel	A
2	Sığır	Epitel	A
3	Sığır	Epitel	A
4	Sığır	Epitel	O
5	Sığır	Salya	O
6	Sığır	Epitel	A
7	Sığır	Epitel	O
8	Kuzu	Kalp	O
9	Oğlak	Kalp	O
10	Sığır	Epitel	O
11	Sığır	Epitel	O
12	Sığır	Epitel	O
13	Sığır	Epitel	A
14	Sığır	Epitel	A
15	Sığır	Epitel	O
16	Sığır	Epitel	O
17	Sığır	Kalp	O
18	Sığır	Epitel	A
19	Sığır	Epitel	A
20	Sığır	Epitel	A

3.1.5. Besi ortamları

DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12, Hyclone, ABD):

Primer kültür besisi ortamında bazı katkı maddeleri ve %10 serumun ilavesiyle epitelyal hücre hattında ve fibroblast hücre hattının ilk aşamalarında kullanılmıştır.

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Multicell, ABD): Epitelyal ve fibroblast

hücrelerin ayrıştırılmasında ve bazı testlerde kullanılmıştır.

EMEM (Eagle's minimum essential medium, Multicell, ABD): Fibroblast hücre hattının

devam kültürlerinde % 10 serum ilaveli kullanılmıştır.

GMEM (Glasgow minimum essential medium, Applichem, Almanya): Kontrol grubu olan

BHK 21 hücreleri için % 10 serum ilaveli kullanılmıştır.

3.1.6. Serum

Hücrelerin izolasyonunda ve kültürasyonunda, bakteri, mantar, maya, virüs ve mikoplazma ajanları yönünden sterilite testleri ile üretme özellikleri yönünden de hücre kültüründe testleri yapılmış ve gama ışınları ile sterilize edilmiş ABD orijinli fetal sığır serumu (FBS) (Merck, ABD) kullanılmıştır.

3.1.7. Antikorlar

İmmünoboyamada, epitelyal hücrelere özgü sitokeratinler (CK) ve fibroblast hücrelere özgü vimentin monoklonal antikorları ve sekonder antikorlar ticari olarak kullanılmıştır.

Primer antikorlar; CK-8 klon C43 (SM3079P, Acris, ABD)

CK-18 klon C04 (Ab668, Abcam, İngiltere)

Vimentin klon V9 (M0725, Dako, ABD)

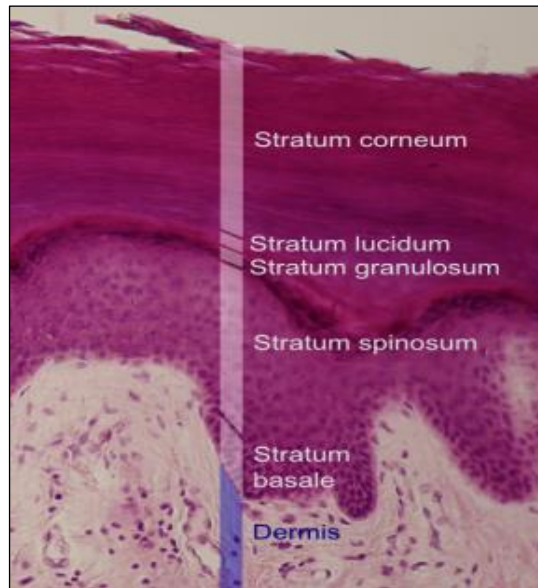
Sekonder antikorlar; Goat anti-mouse IgG FITC konjuge (Dako, ABD)

Goat anti-mouse IgG TRITC konjuge (Southern Biotech, ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer kültürün kurulumu

Mezbahadan veteriner hekim kontrolünde alınan yaklaşık 5 aylık sığır fötüsü 10x antibiyotikli (ampB+strep/pen+siproflaksasin) 4 °C, Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen, fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH 7.2) içine konularak, soğuk zincirde laboratuvara taşınmıştır. Fötüs, güvenli laboratuvar koşullarında 5x antibiyotikli PBS ile yıkanmış ve dili çıkarılarak yine 5x antibiyotikli (ampB+strep/pen+siproflaksasin) PBS'e konularak 30 dakika 4 °C'de bekletilmiştir. Dil biyogüvenlik kabini içine alınarak tekrar 2 defa 5x antibiyotikli PBS ile yıkanmış ve dilin üst tabakası (stratum corneum) çok ince kesitler alınarak soyulmuş ve uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1). Alt tabakalardan ortalama 5 mm²'lik kesitler alınarak, ince parçalar halinde kıyılmıştır (Cartwright vd., 1957). Kıyılan doku parçaları antibiyotikli PBS içine alınarak 2-3 defa yıkanmıştır.



Şekil 3. 1. Epitel dokunun tabakaları (Eroschenko, 2001)

Dispaz enzimi (Sigma, Almanya) 1,2 mg/ml ve kollejenaz I enzimi (Sigma, ABD) 0,4 mg/ml olacak şekilde, Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS içinde hazırlanmıştır. Doku parçaları 100 mg doku parçası/ml olacak şekilde bu enzim solüsyonuna konularak 37 °C'de manyetik çubuklu cam erlende, 350-400 rpm de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası doku parçaları süzülerek sıvı kısım 1000 rpm, 4 °C’de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak içeriği aşağıdaki şekilde önceden hazırlanan primer hücre kültürü besin ortamına alınarak 4 °C’ye kaldırılmıştır.

Primer hücre kültürü besin ortamı (Desmarets vd., 2013; Jeon ve Hwang, 2014)

% 10 FBS (Sigma, ABD)

% 90 DMEM F/12 besin ortamı (Hyclone, ABD)

10 ng/ml epitelyal büyüme faktörü (EGF) (Sigma, ABD)

5 µg/ml insülin (Sigma, ABD)

100 nM/ml transferrin (Sigma, ABD)

100 U/ml penisilin(Sigma, ABD)

100 µg/ml streptomisin(Sigma, ABD)

2.5 µg/ml amfoterisinB (Sigma, ABD)

Doku parçaları üzerine tekrar enzim solüsyonu konularak yine 350-400 rpm de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası doku parçaları süzülerek sıvı kısım 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilip 4 °C’deki hücre süspansiyonu ile birleştirilerek homojenize edilmiş ve numune alınarak hücre sayımı yapılmıştır (Desmarets vd., 2013; Jeon ve Hwang, 2014). Hücre sayımı, 0,9 ml hücre süspansiyonu üzerine 0,1 ml %0,4’lük tripan mavisi solüsyonu (Sigma, ABD) ilave edilmiş ve hemositometre (Bürker, Almanya) kullanılarak ışık mikroskopunda (Olympus CH, Japonya) sayım yapılmış ve sayım sırasında hücre canlılığı da kontrol edilmiştir (Feshney, 2010). Sayımı yapılan hücrelerden 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanarak T25 hücre kültürü üretme kaplarına taksim edilerek 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra hücreler doku kültürü mikroskopunda (Olympos CK 40, Japonya) incelenmiş ve besi ortamları değiştirilmiştir.

3.2.2. Subkültüvasyon ve fibroblast ve epitel hücrelerinin ayrıştırılması

Primer kültürdeki aktif ve yüzeyi %90-95 oranında kaplamış hücreler, önce kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS solüsyonundan kültür kabındaki hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde konulup, dikkatli şekilde yıkanıp PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra da tripsin enzimini içeren tripsin/EDTA (%0,250) solüsyonu (Sigma, ABD) ile yıkanarak

tripsin solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Kültür kaplarına tripsin/EDTA solüsyonundan 0,5 ml konularak tripsinizasyon işlemi tamamlanıp 37 °C inkübatörde yaklaşık 5-10 dakika inkübasyona bırakılıp, bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlenmiştir. Yüzeyden ayrılan hücreler taze primer kültür besi ortamı içine toplanarak homojenize edilmiş ve pasaj oranı 2.8.3' de açıklandığı şekilde, diploit hücre kültürü olduğu gözetilerek 1:2 oranında (bir kültür kabından iki kültür kabı olacak şekilde) 25 cm² yüzeyli kültür kaplarına aktararak subkültüvasyon işlemi tamamlanmıştır.

Primer kültürün ikinci jenerasyonundaki hücrelerin üremeleri mikroskopta incelenmiş, fibroblast hücreler ve epitel hücre odakları gözlenip, hücrelerin yüzeyi kaplama oranı %70'e ulaştıktan sonra fibroblast ve epitel hücrelerin ayrıştırılması Jeon ve Hwang (2014) ve Pal ve Grover (1983)'in uyguladığı metoda göre yapılmıştır. Hücreler, antibiyotik (100 µg/ml) ve fungizon (5µg/ml) içeren PBS ile üç kez yıkandıktan sonra, kültür kaplarına 1 ml %0,05 Na₂EDDA (disodium edetate disodium dihydrate) eklenmiştir. 3-5 dakika sonra mikroskopta incelenip fibroblastlar yüzeyden ayrılmaya başladığında, epitel hücrelerinin ayrılmasından hemen önce kültür kabına biraz kuvvetlice vurularak, fibroblast hücrelerinin iyice ayrılması sağlanmıştır. Epitel hücreleri morfolojik olarak küçülmeye başladığında, %20 FBS'li DMEM besi ortamından 5 ml kültür kabına ilave edilerek fibroblast hücreleri toplanarak santrifüj tüpüne alınmış, 800 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra %10 serumlu EMEM besi ortamı içeren yeni kültür kaplarına transfer edilmiştir. Eski kültür kabında kalan hücreler tekrar % 20 FBS'li DMEM ile 2 defa yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra, 5 ml %10 FBS'li DMEM ilave edilerek, hücreler 8 saat süreyle 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra fibroblastların tamamen uzaklaştırılması için Na₂EDDA ile ikinci bir işlem uygulanmıştır. Hücreler bir kez 4 ml PBS ile yıkandıktan sonra 1 ml %0,01 Na₂EDDA ilave edilmiş ve Na₂EDDA eklendikten sonra 2-3 dakika boyunca mikroskopta hücreler gözlenmiştir. Fibroblast hücreleri ayrılmaya başladığında, epitel hücrelerinin yüzeyden ayrılmasına izin vermeyecek şekilde, kültür kabına dışardan orta derecede birkaç defa vurulmuştur. Epitel hücreleri küçülmeye başladığında da Na₂EDDA çözeltisi kültür kabından uzaklaştırılarak %20 FBS'li DMEM ile 3 defa yıkama yapılmıştır. Yıkamalar sonrasında kültür kabına %10 FBS ve 10 ng/ml EGF içeren DMEM/F12 besi ortamı konularak hücreler 37 °C'de CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Drewa vd., 2006; Jeon ve Hwang, 2014).

Pasajlamalar sırasında yukarıda da bahsedildiği şekilde diploit hücre olması nedeniyle pasaj ve nesil sayılarının paralel ilerlemesi için pasaj ölçeklerinde 1:2 oranı gözetilmiştir. Epitel ve fibroblast hücreleri 5. pasaja kadar pasajlanmış ve ileriki çalışmalarda kullanmak üzere hücreler aşağıdaki şekilde dondurularak stoklanmıştır.

Hücrelerin dondurulması: Hücrenin bilinen pasaj oranı gözönüne alınarak her ampulde bir T25 kültür kabına yetecek miktarda hücre olacak şekilde hesap yapılmıştır. Her 1,8 ml'lik ampul için de 1 ml dondurma vasatı (%10 DMSO (Applichem, Almanya) + %90 FBS) hazırlanmış ve 4 °C'ye kaldırılmıştır. Dondurulacak olan kültür kabındaki hücreler 3.9.2'de olduğu şekilde tripsinize edilerek 37 °C inkübatörde yaklaşık 5-10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlenmiştir. Ayrılan hücreler taze primer kültür besi ortamı içine toplanarak 800 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, hücre peletine tüpün dışından parmak ucu ile vurularak peletin çözünmesi sağlanmış ve hücre peleti dondurma vasatı ile birleştirilip, homojenize edilmiştir. Önceden üzerlerine cama yazar kalemle hücre bilgileri (isim, pasaj no, dondurma tarihi) yazılmış ve buz üzerindeki sehpaye dizilmiş olan ampullere taksim edilmiş ve ceketli bölümünde izopropil alkol olan ve 4 °C'de muhafaza edilen taşıyıcı kutuya yerleştirilerek derin dondurucuya (-80 °C) kaldırılmıştır. Hücreli dondurma vasatının arta kalanından mikrobiyolojik sterilite kontrolü için 2 çift TSB (tryptic soy broth) ve bir çift FTM (fluid thioglycollate medium) besiyerlerine 0,5 ml/10 ml tüp olacak şekilde ekim yapılmıştır. TSB'nin bir çifti 35 ± 2°C, bir çifti 22.5 ± 2.5°C ve FTM'nin bir çifti de 35 ± 2°C'ye kaldırılarak 14 gün boyunca kontaminasyon göstergesi olan bulanıklığın olup olmadığı kontrol edilmiştir. Böylece hücre hatlarının bakteri, mantar ve maya kontaminasyonları yönünden sterilite testleri de tamamlanmıştır. 14 gün sonra ekimlerde herhangi bir üreme olmadığı gözlenmiş ve derin dondurucudaki (-80 °C) hücreler sıvı azotun buhar fazında çalışan saklama tankına transfer edilmiştir. Ayrıca, bu sterilite testi çalışma bitimine kadar her subkültürde, hücre dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında da tekrarlanmıştır (Şap Enstitüsü Protokolü, 2014; European Pharmacopoeia 9th, 2.6.1).

İzolasyonu yapılan bu hücrelerin adlandırılmasında, epitelyal hücreler FBTEC (fetal bovine tongue epithelial cells: sığır fötüsü dil epitel hücreleri) olarak, fibroblast hücrelerde

FBTFC (fetal bovine fibroblast cells: sığır fötüsü dil fibroblast hücreleri) olarak adlandırılmıştır.

3.2.3. Hücre hatlarının mikoplazma ve viral kontaminatlar yönünden sterilite testleri

3.2.3.1. Mikoplazma ajanları yönünden sterilite testi

Hücre hatlarının mikoplazma ajanları yönünden sterilite testi indirek hücre kültüründe floresan çekirdek boyama ve PCR olarak iki yöntemle gerçekleştirilmiştir. Floresan çekirdek boyama DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) boyası (Sigma, ABD) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır (Freshney, 2010; Şap Enstitüsü Protokolü, 2014).

Floresan çekirdek boyamada kullanılan yüzeye bağımlı Vero hücre hattı 75 cm² yüzeyli (T75) hücre kültür kabına kadar antibiyotiksiz olarak çoğaltılmıştır. 4 adet T25 kültür kabı için 3-4 x10⁵ hücre/ml/5 ml hücre olacak şekilde antibiyotiksiz hücre süspansiyonu hazırlanmış ve hücrelerin yüzeye tutunması için 37 °C, %5 CO₂'li etüvde iki saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutunduğu gözlendikten sonra FBTEC ve FBTFC hücrelerinin 48 ya da 72 saatlik kültür ortamından alınan numuneler Vero hücre kültürü kaplarına 1 ml olarak inoküle edilmiş, yine aynı oranda pozitif kontrol numunesi de ilgili kültür kabına inoküle edilmiştir. Negatif kontrol kültür kabına hiç bir şey inoküle edilmemiştir. Hücreler 37 °C, %5 CO₂'li etüvde %90 yüzeyi kaplayıncaya kadar (yaklaşık 2-3 gün) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler yine yukarıda anlatıldığı şekilde pasajlanarak subkültüre edilmiş ve bu işlem 2 defa daha tekrarlanarak hücrelerin toplamda 3-4 seri olmak üzere pasajları yapılmıştır. 3. veya 4. pasajdan sonra, test numunesi içeren hücreler, pozitif kontrol bulunan hücreler ile negatif kontrol hücrelerinden T25 kültür kabında başlangıç yoğunluğu 4-5x10⁴ hücre/ml/5ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmış ve 37 °C, CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültür kaplarındaki besi ortamları boşaltılıp, her bir kültür kabına fiksasyon için, 3 ml Carnoy's fiksatif (3:1, metanol: asetik asit) damla damla ilave edilmiştir. Hücreler 3 dk oda sıcaklığında bekletilip fiksatifi boşaltılarak kaplar oda sıcaklığında veya etüvde kurumaya bırakılmıştır. DAPI çalışma solüsyonundan (100 µg/ml PBS içinde) (Sigma, ABD) ve her bir kültür kabına 3 ml olacak şekilde yavaşça konulup 10-

15 dk ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme sonrası, boya solüsyonları boşaltılarak ve 37°C'de 30 dk kuruması için bekletildikten sonra floresan mikroskopta incelenmiştir.

Mikoplazma ajanının PCR ile aranması, Hot Start PCR yöntemi kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır (Uphoff ve Drexler, 2014) .

FBTEC ve FBTEC kültürlerinin süpernatantları alınarak RTP DNA/RNA Virüs Mini Kit (Strattec Molecular, Almanya) protokolüne göre DNA izolasyonları yapılmış ve PCR amplifikasyonu için PCR karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının mikoplazma ajanı testinde PCR amplifikasyonu için karışım

Bileşen	Miktar (µl)
dH ₂ O	188
PCR tampon (10X)	25
MgCl ₂ (15 mM)	10
dNTPs (5mM)	5
Myco 5' primer mix (5mM)	5
Myco 3' primer mix (5mM)	5
Hot Start Taq polymerase (IU)	2
Toplam	240

Hazırlanan PCR karışımından, numunelerden ve kontrollerden Çizelge 3.3'e göre bütün PCR tüplerine taksim edilmiştir.

Çizelge 3. 3. Mikoplazma testi için PCR numunelerini hazırlama tablosu

1. FBTEC	2. FBTEC + İnternal Kontrol	3. FBTEC	4. FBTEC + İnternal Kontrol
24 µl PCR karışımı	24 µl PCR karışımı	24 µl PCR karışımı	24 µl PCR karışımı
1 µl FBTEC ekstraksiyonu	1 µl FBTEC ekstraksiyonu	1 µl FBTEC ekstraksiyonu	1 µl FBTEC ekstraksiyonu
	1 µl internal kont.		1 µl internal kont.
5. İnternal Kontrol	6. Pozitif Kontrol	7. İnternal Kontrol + Positive control	8. dH₂O
24 µl PCR karışımı	24 µl PCR karışımı	24 µl PCR karışımı	24 µl PCR karışımı
1 µl internal kont.	1 µl pozitif kont.	1 µl internal kont.	1 µl dH ₂ O
		1 µl pozitif kont.	

Tüpler ısısız döngü cihazında (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem, ABD), 96°C’ de 2 dakikayı takiben 35 döngü (94 °C’de 4 sn → 65 °C’de 8 sn →7 °C’de 16 sn) olarak inkübe edilmiştir. Daha önceden hazırlanan ve elektroforetik sisteme (Biorad, ABD) transfer edilerek, donması sağlanan %1.3’lük agaroz jelle, 2µl yükleme tamponu (R0611, 6x DNA loading, Thermo Scientific, ABD) +10 µl PCR ürünü olacak şekilde PCR ürünleri Çizelge 3.2’deki sıralamaya göre yüklenmiştir. İlk başlara da 5µg/ml’lik 100bp protein merdiveni (SM0321, Gene ruler, Thermoscientific, ABD) 6 µl olarak yüklenmiştir. 35 dk 80 volt ve 44 mA de yürütülerek jel görüntüleme cihazında (Azure Biosystem C200, ABD) görüntülenmiştir.

3.2.3.2. Viral kontaminantlar yönünden sterilite testi

Hücre hatlarında viral kontaminantlar olarak, enstitü üretim koşullarında risk oluşturabilecek ve genellikle serum kaynaklı olan Bovine viral diarrhoea virüsü (BVDV), Minute virüs of mouse (MVM) ve Bovine parvo virüs tip-3 (BPV3) virüslerinin varlığı ya da yokluğu aranmıştır. BVDV aranması immün floresan antikor (İFAT) tekniği ile, MVM ve BPV3 aranması PCR tekniği ile yapılmıştır (Şap Enstitüsü Protokol, 2014; Code of Federal Regulations 9CFR 113.47- 113.53).

Bovine viral diarrhoea virüsünün (BVDV) immünfloresan antikor tekniği (İFAT) ile aranması

Bir adet T75 FBTEC ve bir adet T75 FBTFC hücreleri derin dondurucuda (-20 °C) dondurulduktan sonra 37 °C’de çözündürüldü. Bu dondurma ve çözündürme işlemi bir defa daha tekrarlanmış ve kültür kaplarındaki hücreli ortam santrifüj tüplerine transfer edilerek 2000 rpm de santrifüj edilip, süpernatantlar test edilecek numune olarak 4 °C’ye kaldırılmıştır.

Viral ajanlar yönünden negatif olduğu bilinen MDBK monolayer hücre kültürü %10 FBS’li DMEM besin ortamı ile T75 hücre kültür kabına kadar antibiyotiksiz olarak çoğaltıldıktan sonra 3 adet T75 kültür kabı için 5×10^3 hücre/ml/25 ml hücre olacak şekilde %5 FBS’li DMEM besin ortamı ile hazırlanmış ve %5 CO₂’li ve 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 37 °C’ye kaldırılan FBTEC ve FBTFC numunelerinden MDBK hücre kültürü kaplarına total hacmin %20-25’ini oluşturacak şekilde 4 °C’deki

süpernatant numunelerinin inokülasyonu yapılmış, kontrol grubuna da MDBK hücrelerinin aynı şekilde hazırlanan numunesinden inokülasyon yapılarak 37 °C’de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bütün flasklar derin dondurusuda (-20 °C) 2 defa dondur-çözdür ve 2000 devirde 5 dk santrifüj edilip numuneler yine önceden hazırlanan MDBK hücrelerine inoküle edilerek 37 °C’de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon ve dondur-çözdür işlemleri 3-4 defa tekrarlanarak, numuneler 4 °C’ye kaldırılmıştır.

MDBK hücrelerinden 3×10^3 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. 96 gözlü kültür kabına her numune için 8 göz olacak şekilde 100 µl/göz olarak taksim edilmiş ve 2 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir numune için 2 göze 20 µl/göz olarak 4 °C’deki numunelerden, negatif ve pozitif kontrol gözlerine de aynı şekilde 20 µl/göz konularak yine 5-7 gün 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Boyama kit protokolüne (CJ-F-BVD-10ml, VMRD, ABD) göre gerçekleştirilerek, floresan mikroskopta (Olympus IX71, Japonya) 450-480nm/515nm dalga boylarında incelenmiştir.

MVM ve BPV3 viral kontaminatlarının PCR tekniği ile aranması

DNA ekstraksiyonu; test edilecek hücreler eppendorf tüpte 4 °C’de 72 g (800 devir/dk)’de 5 dk santrifüj edilerek, pelete zarar verilmeden süpernatant pipetle çekilip atılmıştır. Üzerine 100 µl steril DNase/RNase ari su eklendikten sonra. 96 °C’de 3 dk ısı tablasında bekletilip, karıştırılıp 12000 devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak, DNA ekstraksiyonu PCR kiti (MYco-Ez PCR kiti, Biological industries, ABD) protokolüne göre tamamlanmıştır. PCR amplifikasyonu hazırlanan karışımdan, numunelerden ve kontrollerden bütün PCR tüplerine taksim edilmiştir (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının viral ajan testinde PCR amplifikasyonu için karışım

Bileşen	Miktar (µl)
DEPC su	400
PCR tamponu (10X)	50
MgCl ₂ (4 mM)	40
dNTPs (0.5 mM)	5
DNA Tag polimeraz	5
Primer mix (10 pmol)	1
Toplam	501

Çizelge 3. 5. MVM ve BPV3 aranmasında PCR amplifikasyonu numunelerinin hazırlanma çizelgesi

1. FBTEC	2. FBTFC	3. Negatif kontrol	4. Sistem kontrol	5. BPV3 pozitif kontrol	6. MVM pozitif kontrol
16 µl PCR karışımı	16 µl PCR karışımı	16 µl PCR karışımı	16 µl PCR karışımı	16 µl PCR karışımı	16 µl PCR karışımı
2 µl FBTEC ekstraksiyonu	2 µl FBTFC ekstraksiyonu	1 µl Negatif kontrol	2 µl sistem kontrol	2 µl BPV3 poz.kont.	2 µl MVM Poz. kont.

Tüpler ısısal döngü cihazında (Eppendorf, Germany), 94 °C de 30 sn ve takiben 35 döngü (94 °C’de 30 sn → 60 °C de 120 sn →72 °C’de 60 sn) devamında 94 °C’de 30 sn → 60 °C’de 120 sn ve → 72 °C’de 5 dk inkübe edilmiştir. 60 °C’ de hazırlanan etidium bromür (2 µl/30 ml) ilave edilen %2’lik agaroz jelli elektroforetik sisteme (Biorad, ABD) transfer edilmiştir. Agaroz jel donduktan sonra PCR ürünleri 2µl yükleme tamponu (R0611, 6x DNA Loading, Thermo Scientific, ABD) + 10 µl PCR ürünü olacak şekilde, ilk kuyucuklara da protein merdiveni (SM0321, Gene ruler 100 bp, plus DNA ladder ThermoScientific, ABD) 6 µl olarak yüklenmiştir. 30-35 dak. 140-150 volta yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 1500, Kodak, ABD) görüntülenmiştir.

3.2.4. Hücre hatlarının morfolojileri

Hücreler saflaştırıldıktan (epitel/fibroblast ayrıldıktan) sonra, fibroblast ve epitelyal görünümlü hücrelerin morfolojileri faz kontrastlı doku kültürü (Olympus IX71, Japonya) mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.2.5. Hücre büyüme kinetiği

Hücrelerin büyüme kinetiği için günlük büyüme eğrisi ve buna bağıntılı popülasyon ikilenme zamanının hesaplanması yapılmıştır (Freshney, 2010; Somal vd., 2016). Bu amaçla, FBTFC ve FBTEC hücrelerinden 5×10^4 hücre/ml veya 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Her bir hücre için hücre kültürü 7 adet petriye (35 mm^2) 2 ml/petri olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonu taksim edilmiş ve petriler $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ve %5 CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra her bir hücre grubundan birer petri alınarak içindeki vasatları boşaltılmış, hücreler 1 ml kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkanmıştır. Her petriye hücrelerin yüzeyden ayrılması için 1 ml tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek (Multicell, Almanya) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye kaldırılmış, 5-10 dakika sonra hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskopta gözlenmiş ve hücre sayımları yapılarak başlangıç sayıları belirlenmiştir. 6 gün boyunca aynı saatte aynı şekilde hücre sayımları yapılmıştır. Hücre sayıları zamana bağlı olarak grafiğe aktarılmış ve popülasyon ikilenme zamanı da aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{PDT: } 1/[(3,32 \times (\log C_1 - \log C_0))/24]$$

3.2.6. DNA barkodlama

DNA barkodlama testi, genomik DNA'nın hazırlanması, konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi, CO1 amplifikasyonu, PCR ürünün elektroforetik sistemde kontrolü ve pürifiye edilmesi, sekans ve kapiller elektroforez basamaklarından oluşmaktadır (Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007, BOLD: The Barcode of Life Data System (www.Barcodinglife.org), Molecular Ecology Notes, 2007; 7(3): 355–364); Ivanova vd., 2007, Ivanova vd., 2012).

Genomik DNA'nın hazırlanması, konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi; hücreler tripsinize edilerek miliresinde 100.000-1.000.000 hücre olacak şekilde 2 ml hücre süspansiyonu hazırlanıp, santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peletini 200 µl PBS+200 µl guanidine HCL ile homojenize ederek, genomik DNA hazırlama kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, İsviçre) talimatlarına göre genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. %1,2'lik agaroz jel olan elektroforetik sisteme (Biorad, ABD) 3µl yükleme tamponu (R0611, 6X DNA loading, Thermo Scientific, ABD)+10 µl genomik DNA olacak şekilde numuneler yüklenmiştir. 1 kb'lık protein merdiveni (SM1331, Gene ruler, Thermo Scientific, ABD) 10µl olarak yüklenerek, 110 voltta 30 dakika yürütülüp görüntüleme cihazında (Azure Biosystem C200, ABD) uygunluğu görüntülenmiştir. Genomik DNA'ların konsantrasyonlarının uygunluğu, protein ya da fenol kontaminasyonlarının varlığı ya da yokluğu için ölçümler de fotometrik ölçüm cihazında (Nanodrop 3300 fluorospectrometer, Thermo Scientific, ABD) yapılmıştır. Konsantrasyonlar uygun bulunmuş olup, FBTEC için 43 ng, FBTEC için 93 ng ölçülmüştür.

CO1 bölgesinin PCR amplifikasyonu için karışım Çizelge 3.6'ya göre hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı 100µl'lik eppendorf tüplere 25 µl olarak taksim edilip üzerlerine 1µl genomik DNA ilave edilmiştir. Tüpler ısıl döngü cihazına yüklenerek (C1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad, ABD) Mamm CO1 programı [(94 °C'de 2 dk → 5 döngü (94 °C'de 30 sn., 50 °C'de 40 sn., 72 °C'de 1 dk) → ilave 35 döngü (94 °C'de 30 sn., 55 °C'de 40 sn., 72 °C'de 1 dk) final uzama 72 °C'de 10 dk ve 10 °C'de ∞)] seçilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası PCR ürünü elektroforetik sistemde birinci basamaktaki şekilde kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.6. DNA barkodlama CO1 PCR amplifikasyonu için karışım

Bileşen	Miktar (µl)
dH ₂ O	117
PZR tamponu	15
dNTPs (2.5 mM)	6
Taq polimerase Mix	0.78
Primer mix	6
LepF1_t1 (F/R 5µM)	
VF1_t1 (F/R 5µM)	
VF1d_t1 (F/R 5µM)	
VF1i_t1 (F/R 15µM)	
Toplam	144.78

PCR ürününün pürifiye edilmesi için Taq polimeraz ve CO1 ürünü dışında olabilecek ürünlerin inaktivasyonu için Illustra Exostar Kit (Illustra exostar kit, GE Healthcare, ABD) kullanılmıştır. 5µl CO1 PCR ürünü ve 2µl Illustra Exostar pipet ile küçük 100µl'lik eppendorf tüplerde karıştırılarak eppendorf tüpler ısısız döngü cihazına (C1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad, ABD) yerleştirilmiştir. Illustra Exostar programı seçilerek (37 °C'de 15 dk → 80 °C'de 10 dk → 8 °C'de ∞) inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası 4 °C'ye kaldırılmıştır. Sekans ve kapiller elektroforez için SP6 promoter primer PCR karışımı Çizelge 3.7'ye göre hazırlanmıştır. Bu karışımdan her bir numune için AB Applied Biosystem Sequencing cihazı için özel 96 gözlü plakanın ilgili her bir gözüne 9 µl olarak taksim edilmiştir. İlgili gözlerle 4 °C'deki CO1 PCR ürününden 1µl ilave edilerek, plaka 3-4 sn santrifüj edilip, özel kaplayıcı ile kaplanarak sekans cihazına (Applied Biosystem Sequencing, Veriti 96 well Thermal Cycle, ABD) yerleştirilmiştir.

Çizelge 3. 7. DNA barkodlama sekans ve kapiller elektroforez için SP6 promoter primer PCR karışım

Bileşen	Miktar (µl)
dH2O	25
Sekans tamponu	10
Big Dye Terminator V1.1 (dNTPs colors)	3.75
SP6 Primer (10 pmol/µl)	6.5
Toplam	45.25

Seçilen ısısız döngü programı [(96 °C'de 1 dk → 96 °C'de 30 sn (25 döngü) → 50 °C'de 10 sn → 60 °C'de 4 dk → 4 °C'de ∞)] uygulanarak, plaka bir gece 4 °C'de bekletilmiş ve üzerindeki kaplayıcı kaldırılmıştır. Daha sonra 10µl+Agencourt Clean SEQ (Beckman Coulter, ABD)+42µl etanol (%85'lik) ilave edilip, plaka 96 gözlü magnet plaka üzerine yerleştirilmiş ve 3 dk beklemeye bırakılmıştır. Etanol pipetle uzaklaştırılıp tüpün çeperinde kahverengi boya çökmeleri gözlenmiştir. 100µl etanol (%85) tekrar ilave edilerek magnet plaka üzerinde yine 3 dk bekletilmiştir. Sonrasında etanol tamamiyle uzaklaştırılarak plaka 25-30 sn santrifüj edilmiştir. Plaka genetik analiz cihazının (3500 XL AB Genetic Analyser, ABI, ABD) özel plastik kaplayıcısı ile kaplanarak, cihaza yerleştirilip, plaka kayıt bilgileri cihaza yüklenerek program başlatılmıştır.

Sekans sonuçlarından elde edilen ~658 bp'lik FASTA formatındaki DNA dizisi, hücre hatlarının kimlik türünün CO1 dizi homolojisini belirlemek için Chromas programı aracılığıyla, http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_IdentificationRequest web sitesine yüklenerek tür orijini doğrulaması ve türler arası bir çapraz kontaminasyonun olup olmadığının doğrulaması yapılmıştır.

3.2.7. Karyotip ve tripsin G-bantlama (GTG)

FBTEC ve FBTEC karyotipi için giemsa boyaması ve GTG kullanılmıştır. Karyotip ve tripsin GTG için MacLeod ve arkadaşlarının 2007'deki protokolleri modifiye edilerek uygulanmıştır. Hücre hatlarının karyotipleri ve Giemsa bantlamaları FBTEC ve FBTEC'in 5. pasajlarından yapılmıştır. Ayrıca, FBTEC hücre hattı için 60. Pasajda karyotip tekrarlanmıştır.

FBTEC ve FBTEC hücrelerinin her birinden 2 adet 150 cm² kültür kabı hazırlanmıştır. Aktif üreme fazında ve yüzeyi kaplamış olan hücrelere 4 µg/ml konsantrasyonu olan colcemid solüsyonundan (N-deacetyl-N-methylcolchicine; Invitrogen, Karlsruhe, Almanya) 400µl içinde 40ml besin ortamı olan her bir 150 cm² kültür kabına ilave edilerek 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kültür kaplarına hafif vurarak kalkmış olan hücreler, besin ortamı ile birlikte alıp 50 ml'lik santrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Kültür kaplarının yüzeyi PBS ile yıkanıp, tripsin/EDTA ile muamale edilip, 37 °C'de hücreler yüzeyden ayrılıncaya kadar (5-10 dk) bekletilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücreler toplanarak yine 50 ml'lik santrifüj tüplerine transfer edilip bütün santrifüj tüpleri 5 dk 1200 rpm de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde peletin dökülmesine izin vermeden uzaklaştırılıp, hücre peletleri 20 ml PBS ile homojenize edilmiş ve 4 adet tüpe 5 ml olarak taksim edilmiştir. Akabinde 5 dk 1200 rpm de santrifüj edilerek, süpernatant yine dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan hipotonik solüsyon konsantrasyonlarından her tüpe 3 ml konulup çizelge 3.8'de belirtilen sürelerde inkübe edilmiştir.

Çizelge 3. 8. Hipotonik solüsyon konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri tablosu

Tüpler	Hipotonik solüsyon		İnkübasyon	
	Potasyum Klorür 0,075 Molar	Sodyum sitrat %1,2	Sıcaklık	Süre
1.tüp	/		Oda sıcaklığı	5 dk
2.tüp	20	1	Oda sıcaklığı	5 dk
3.tüp	1	1	Oda sıcaklığı	5 dk
4.tüp	1	1	Oda sıcaklığı	1 dk

İnkübasyon sonrası 5 dk 1200 rpm de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılarak pelet homejenize edilmiş ve tekrar soğuk fiksatif (3 hacim metanol: 1 hacim asetik asit) ile yavaşça doldurulup, buz icinde 30 dk ardından 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletip, 5 dk 1200 rpm de santrifüj edilmiştir. Yine süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp, oda sıcaklığındaki fiksatifle tüpler doldurulmuş ve bir gece için 4 °C'ye kaldırılmıştır. Tüpler 15-20 dk oda sıcaklığında bekletilip, 5 dk 1200 rpm de santrifüj edilmiş ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Oda sıcaklığındaki fiksatifle tüpler tekrar doldurulmuş ve bu işlem 2 defa daha tekrarlanmıştır. İkinci santrifüjü takiben süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra 1-3 ml (bulanıklığa göre ayarlandı, çok berrak olmayan, opak görünümlü) oda sıcaklığındaki fiksatiften ilave edilmiştir.

Daha önceden hazırlanıp derin dondurucuda (-20 °C) olan lamlar (lamlar iyonsuz sıcak deterjanda bir gece yıkamaya bırakılmış, sonra iki defa deiyonize suda yıkayıp kurutulmuş ve bir gece %70'lik etanolde bekletilmiştir. Partikül bırakmayan bir bezle lamlar iyice kurulanmış ve kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir) çıkartılarak ve yine derin dondurucuda (-20 °C) olan buz aküsü üzerine yerleştirilmiştir. Lamlar üzerine bir pastör pipeti ile hücre süspansiyonundan alarak 30 cm yukarıdan aralıklı iki damla damlatılarak, preparatın hücreli yüzeyini yavaşça alevden geçirip, önce 5-6 sn yatay, sonra dikey pozisyonda kurumaya bırakılmıştır. 4-5 dk sonra faz kontrast mikroskopta incelenerek, metafaz plaklarının yoğun, kaliteli ve iyi dağılım gösterdiği tüpler bir tüpte birleştirilmiş, 5 dk 1200 rpm de santrifüj edilerek, süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Oda sıcaklığındaki fiksatifle tüpler yine doldurulup santrifüj edilmiş ve bu işlem 2 defa daha tekrarlanmıştır. İkinci santrifüjü takiben süpernatantlar uzaklandıktan sonra 1-3 ml (yine bulanıklığa göre ayarlandı, çok berrak olmayan, opak görünümlü) oda sıcaklığındaki fiksatiften ilave edilmiştir. Takiben derin dondurucudan (-20 °C) 8 adet lam çıkartılarak ve yine derin dondurucuda (-20 °C) olan buz aküsü üzerine yerleştirilmiştir. Bir

pastör pipeti ile hücre süspansiyonundan alarak, lamlar üzerine 30 cm yukarıdan aralıklı iki damla damlatılarak, preparatın hücreli yüzeyini yavaşca alevden geçirip, önce 5-6 sn yatay, sonra dikey pozisyonda kurumaya bırakılmış ve daha sonra 8 preparat bir gece 60 °C fırında kurumaya bırakılmıştır. Tripsin G-bantlama (GTG) için Sorenson tamponları hazırlanmıştır.

Sorenson tampon A: 1/15 M KH_2PO_4 (9.07 g/L)

Sorenson tampon B: 1/15 M Na_2HPO_4 (11.866 g/L)

Hazırlanan Sorenson tamponlarla üç farklı içerikte ve ortamda solüsyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3. 9. Tripsin G-Bantlama için solüsyonlar.

Jar A (37 °C sıcak su banyosunda)	Jar B (Buz içinde)	Jar C (Oda sıcaklığında)
70 ml Sorenson tamponu, pH 7.2 (30 ml tampon A+40 ml tampon B) + icine 200 µl tripsin (1:250) ilave edilerek 30 dakika bekletildi	60 ml Sorenson tamponu (30 ml tampon A + 30 ml tampon B), pH 6.8	100 ml Sorenson tamponu (50 ml tampon A + 50 ml tampon B + 5 ml Giemsa , solüsyonu, pH 6.8 (filtre kağıdından geçirilmiştir).

Fırında bir gece bekletilen preparatlardan bir tanesi jar A içine yarısına kadar daldırılıp 10 sn bekletilmiş, sonra diğer yarısı da daldırılmış yine 10 sn bekletilmiştir. Tripsin aktivitesini durdurmak için preparat jar B ye daldırılmış ve bir iki defa tampon içinde sağa sola hareket ettirildikten sonra jar C'ye transfer edilmiş ve 15 dk bekletilmiştir. Deiyonize su bulunan kapta sallayarak yıkanıp, preparat iki adet havlu kağıdı arasına koyarak ıslaklıkları alınmış ve 10 dk kurumaya bırakılmıştır.

Preparat mikroskopta incelenmiş, tripsin oranı değerlendirilmiş ve 6 preparata yukardaki şekilde 15 sn, 18 sn, 20 sn, 25 sn, 30 sn, 35 sn tripsin uygulaması yapılmış, bir adet preparata da tripsin uygulaması yapılmadan bütün preparatlar Giemsa boyası ile boyanmıştır. Preparatlar mikroskopta incelenerek (Zeiss Axiskop 2 plus, Almanya), FBTEC ve FBTEFC hücre hatlarının her birinin karyogramı için 50 adet metafaz plağı

sayılmış, kromozom dizilimi (Zeiss Axio, Almanya ve GenASIs Karyotyping imaging program) yapılmıştır.

3.2.8. İmmünoboyama

Çalışmada, primer antikorlar olarak, iki adet sitokeratin filamentine özgü ve bir adet vimentin filamentine özgü monoklonal antikor kullanılmıştır (Çizelge 3.10). Sekonder antikorlar olarak sitokeratinlerin boyamasında yeşil florokrom isaretili (Fluorescein isothiocyanate=FITC) antikor ve vimentinin boyanmasında da kırmızı florokrom isaretili (tetramethylrhodamine=TRITC) antikor kullanılmıştır.

Çizelge 3. 10. İmmünoboyamada kullanılan primer antikorlar.

Antikor adı	İzotipi	Stok konsantrasyonu	Dilüsyon oranı	Reaktivitesi
CK8 (klonC43)	Mouse IgG	1 mg/ml	1:50	İnsan, domuz, sığır, koyun, tavşan
CK18 (klon C04)	Mouse IgG	1 mg/ml	1:50	İnsan, sığır, fare, sıçan, koyun, keçi, at, hamster, kedi, köpek, domuz, maymun
Vimentin (klonV9)	Mouse IgG	250 µg/ml	1:100	İnsan, sıçan, maymun, sığır, koyun, tavşan

Boyama metodu olarak antikor-protein ilişkilerine dayanan ve immünohistokimyasal yöntemlerden olan immünoboyama yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre çekirdeklerinin boyamasında mavi floresan ışığa veren DAPI kullanılmış ve immünoboyama protokolü de aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

Aktif üreme fazındaki FBTEC ve kontrol grubu olan KYSE 410, FBTEC ve kontrol grubu olan COLO-849 hücrelerinden, mililitresinde 100.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 8 kuyucuklu cam lamın (Chamber Slide 154534, Lab-Tek II, Thermo Fisher Scientific) her bir gözüne 200µl taksim edilerek 24 saat 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler yavaşça 400 µl PBS ile yıkanarak, 400µl %4 paraformaldehit (PBS içinde) ile 15 dk 37 °C de fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası, paraform aldehit uzaklaştırılarak hücreler PBS ile 2 defa beşer dakika olmak üzere yıkanmıştır. 400µl permeabilizasyon solüsyonu [(0,1 M Tris

Cl (pH 7,4)+50 mM EDTA (pH 8)+%0,5 TritonX-100)] konularak 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve 400µl PBS ile yine 2 defa beşer dakika olmak üzere yıkanmıştır. 400µl %1 FBS içeren PBS konulup bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Primer antikolar üreticinin önerdiği konsantrasyonda PBS içinde %1 FBS+%0,1 Tween 20 (Sigma Aldrich P1379) ile Çizelge 3.10'daki oranlarda dilüe edilerek 400 µl ilgili kuyucuklara konulmuş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, içinde %1 FBS bulunan 400µl PBS ile 15 dk bekletilerek yıkama yapılmış ve bu işlem üç defa tekrarlanmıştır. *goat anti-mouse* IgG FITC konjuge (Dako, ABD) ve *goat anti-mouse* IgG TRITC (Southern Biotech, ABD) konjuge olan sekonder antikolar 1/100 oranında, %1 FBS+%0,1 Tween 20 içeren PBS ile dilüe edilmiş ve 400µl ilgili kuyucuklara konularak oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben 400µl PBS ile iki defa 15'er dakika olmak üzere yıkama yapılmıştır. Floresan mikroskopta boyama kontrol edilerek, her göze 3-4µl kapatma solüsyonu olan ve DAPI içeren Vectashield *mounting medium*' dan (Vector Laboratories, İngiltere) koyarak preparat lamel ile kapatılmış ve floresan mikroskopta (Zeiss Axiovert 40 CFL, Almanya) inceleme ve görüntülemeleri yapılmıştır.

3.2.9. Transkriptom analizi (RNA dizileme= RNAseq)

Transkriptom analizi yeni nesil dizileme (NGS) ile gerçekleştirilmiştir. NGS'nin çoklu platformları ve sistemleri, muazzam paralel ve aynı anda genom (DNAseq) veya transkriptom sıralama (RNAseq) kullanarak genler, ekzomlar, varyantlar, transkriptler ve küçük RNA'ların tanımlanması gibi spesifik uygulamalar için avantajlara sahiptir (Tripathi, 2016). RNAseq, standart gen mikro-arrayları kullanılarak saptanamayacak kadar düşük seviyelerde ifade edilen transkriptlerin tanımlanması için yüksek bir duyarlılıkla transkript bolluğuna dayalı diferansiyel gen ekspresyon profillerinin analizine izin veren bir yöntemdir (Werner, 2010). FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının transkriptom analizleri aşağıdaki protokole göre uygulanmıştır.

Total RNA izolasyonu; Bir ila 5 milyon hücre QIAzol Lysis reaktifi (Qiagen, Almanya) ile muamele edilmiş ve miRNeasy kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA 20µl RNaz içermeyen su ile yıkanarak karşılık gelen konsantrasyon, nanodrop spektrofotometre (NanoDrop2000, Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiş ve final konsantrasyonu 100 ng/ml

olacak şekilde hazırlanmıştır. Protokolün sonraki aşamaları GMAK departmanı, HZI (Helmholtz Enfeksiyon Araştırma Merkezi; Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Brunswick, Almanya)'den hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiş olup merkez tarafından verilen protokol aşağıda bildirilmiştir.

RNA örneklerinin kalitesi (28S/18S oranı) ve bütünlüğü (RNA integrity number, RIN değeri) Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (ABD) ile ölçülmüş ve RNA konsantrasyonu Qubit ile belirlenmiştir. Numunelerin RIN değeri ≥ 8 ölçülmüş ve RNA sekans analizi için uygun görülmüştür. cDNA kütüphanesi, RNA ScriptSeqv2 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/count.html>) ve örnek başına 48-50 milyon okuma yapabilen (1x51 döngü, tek uçlu çalışma) yeni nesil dizileme cihazı (Illumina Hiseq 2500, Illumina, ABD) ile dizilemeler yapılarak oluşturulmuştur. Verilerin işlenmesinde ve biyoinformatik analizlerde, okunan değerlerin fastq-mcf (ea-utils 1.1.2-686) ile düzenlenmesi yapılmış, gen ifadesi analizi için STAR (2.5.3a) ile Ensembl sığır referans genomuna (87_bt) hizalanmış ve SAMTool (0.1.19) ile dönüştürülmüştür. Sayma Htseq sayısı Phyton komut dosyası ile yapılarak, veri işleme ve analiz R/Biyoinformatik (3.3.2/3.5) negatif binominal veri dağılımı DESeq2 ile hesaplanmıştır. Farklı olarak ifade edilen genler için en az 2 kat filtreleme yapılmış ve FDR (false discovery rate) değerleri hesaplanmış, düzeltilmiş p anlamlılık değerleri elde edilmiştir (p < 0.05). Sekans verilerinin normalizasyonu da sığır yumurtalık epitelinden elde edilen RNAseq veri setleri kullanılarak yapılmıştır ((E.GEOD-74612; Maillo ve diğerleri, 2015).

3.2.10. Şap virüsü hücresel reseptörlerinin kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile tayini.

RNAseq verilerini teyit etmek amacıyla, FMDV'nin hücresel reseptör ifadeleri qRT-PCR ile de çalışılmıştır. qRT-PCR duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği yüksektir. PCR sonrası ürünlere ikincil bir analiz işlemi gerektirmez, böylece yüksek verimlilik ile düşük kontaminasyon riski sağlar. Bu nedenle bu test bir hedef dizinin veya genin miktarını belirlemek için basit ve inceleme imkanı sağlayan bir yöntemdir. Primerler *Bos taurus*'un Çizelge 3.11'de isimleri ve ensembl numaraları verilen genler için <http://www.ensembl.org> web sitesindeki gen transkriptlerinden, DNA bağlama boyası olarak EvaGreen'in kullanıldığı, SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-rad, ABD) kit özellikleri göz önüne

alınarak aşağıda belirtilen kriterler doğrultusunda <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> sitesi kullanılarak tasarlanmıştır ve kriterler olarak;

- Primer uzunluğunun mümkün olduğunca 18-25 bazı geçmemesine,
- Ürün uzunluğu mümkün olduğunca 100-150 baz çiftini geçmemesine,
- Primerin GC (guanin, sitozin) içerik oranı mümkün olduğunca % 30-80 (ideali %40-60) geçmemesine
- Aynı nükleotidlerin üçten fazlasının yanyana gelmemesine,
- Primerin 5' ya da 3' ucunda daha fazla guanin ya da sitozinlerden kaçınılmasına,
- 3' ucunda da timinlerden kaçınılmasına
- Primerlerin saç tokası (hairpin) yapıları ve self-dimerizasyon oluşturmasından kaçınılmasına dikkat edilmiştir.
- Tm (bağlanma sıcaklığı) değeri ise PCR programının Ta (açılan DNA zincirlerine bağlanma sıcaklığı)'sına bağlı ($T_m = T_a + 2$ °C) olarak dikkate alınmış ve ΔT_m forward & reverse ≤ 4 °C ayarlanmıştır.

Tasarımı yapılan primerlerin, genomda nerelere isabet edebileceğini yani BLAST (t) doğrulaması <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> web sitesinden yapılmış ve sentezlenmesi ticari bir firmadan (Eurofins Genomics, Ebersberg, Almanya) hizmet alımı olarak yapılmıştır.

Çizelge 3. 11. qRT-PCR için şap virüsü hücresele reseptörleri primer dizileri.

Gen adı ve Ensembl no	Forward primer	Reverse primer	Ürün büyüklüğü
H2AFY (endojenik kontrol) ENSBTAT00000021436.4	GTG GAA GCT GTC CTG GAA CTC	AGG CCA TGG CCT GCA CTG AC	80 bp
ITGAV (Integrin alpha V) ENSBTAT00000026553.5	GTG TGA GGA GCT GAT CGC ATA TC	CTG TCG ACT AAC ATT GGC AGG AG	166 bp
ITGB1 (Integrin beta 1) ENSBTAT00000056716.1	ACG GCA ACG GGA CCT TCG AG	GTA GGC ATC CAT GTC TTC GCT G	110 bp
ITGB3 (Integrin beta 3) ENSBTAT00000013173.3	GAA GCA GAG TGT GTC ACG GAA C	AC CAG CAA GTG GGA GGC ATC	117 bp
ITGB6 (Integrin beta 6) ENSBTAT00000011972.2	GCA ATT AIG CAA GCT GCT GTG TGT	GAT GCC TGC CAG TTT GCT GTC	123 bp
ITGB8 (Integrin beta 8) ENSBTAT0000004833.4	GAT GCT ATG CTT CAG GCA GCT G	ATC TGT CAT CAC CAG CAG CAA TC	84 bp
HSPG (heparan sulfat proteoglycan) ENSBTAT00000022744.4	CCA GAA CTT GGA CCA GAA TTG CC	CCG GAT GTT GAT GAG TAC GGA TG	124 bp
SDC1 (Syndecan 1, subfamily of HSPGs) ENSBTAT00000014810.4	CGA AGA TCA GGA TGG CTC TGG	GCC GTG GCT GTG GTC GTC A	135 bp

Primerlerin etkinlik ve özgüllüğünün kontrolü: Primerlerin özgüllüğü ve etkinliği, standart bir eğri yoluyla verimliliği belirlemek amacıyla FBTEC ve sığır orjinli böbrek epitel hücresinde (MDBK) yapılmıştır. Hücrelerden 3.9.9'daki gibi total RNA izolasyonları hazırlanmış ve aşağıdaki şekilde ters transkriptaz ile hazırlanan cDNA'ların bir seyreltme serisi (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 1.25 ng, 0.625 ng, 0.3125 ng) kullanılarak aşağıdaki kantitatif polimeraz zincir reaksiyonuna göre test edilmiştir. Etkinlik ve özgüllük değerlendirmesi de erime ve standart eğrilere göre yapılmış, 10 ng cDNA konsantrasyonu uygun bulunmuş ve bu primerlerle FBTEC ve FBTEC hücrelerindeki şap virüsü hücresele reseptörlerinin ifadeleri yine aşağıdaki şekilde qRT-PCR ile çalışılmıştır.

Ters transkripsiyon: FBTEC ve FBTEC hücrelerinin RNA izolatları olarak, mRNAseq de kullanılan aynı RNA örnekleri (3.9.9'daki total RNA izolasyonu) kullanılmıştır. Bir µg total RNA'dan cDNA sentezi Superscript II First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen, Almanya) ve random heksamer primerler kullanılarak yapılmıştır. cDNA sentezi için 1 µg total RNA, RNaz içermeyen 10 µl su ile karıştırılmış, 2 µl random heksamer primerleri (100 µM) eklenerek tekrar karıştırılmış ve 10 dk süreyle ısıl döngü cihazında 70 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından tüpler, önce buz üzerinde soğutulmuş ve ana karışımdan (4 µl first strand tampon+2 µl DTT (0,1 M) + 1 µl dNTPs (10 mM her birinden) +1 µl SuperScript RT II) 8 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Sonrasında ısıl döngü cihazında belirlenen ısıl döngü programı (42 °C→60 dk; 65 °C→10 dk; 4 °C→sabitlenme) gerçekleştirilmiştir.

Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR); Görelî transkript nicelendirmesi için floresan DNA bağlama boyası EVAGreen kullanılmıştır. Bu boya çift sarmal DNA'ya bağlanabilen ancak tek zincirli DNA'ya bağlanamayan, eş zamanlı PCR reaksiyonlarında ucuzluğu ve hassasiyeti sebebi ile çok tercih edilen bir boyadır. Çift sarmal DNA'ya bağlandığı zaman floresan ışımaya başlar ve bu ışımaya etidyum bromitten çok daha güçlüdür. EVAGreen, çift sarmallı DNA'ya bağlandığında bu DNA kompleksi ve EVAGreen boyası mavi ışığı ($\lambda_{max} = 500 \text{ nm}$) emer ve yeşil ışık ($\lambda_{max} = 530 \text{ nm}$) yayar. Bu nedenle, PCR üstel fazı esnasında döngü başına artan floresan, transkriptin başlangıç miktarının nicelleştirilmesi için kullanılabilir. PCR reaksiyonu ve aynı anda floresan algılaması için Applied Biosystems 7500 Hızlı Real-Time PCR (ABI 7500, ABD) Sistemi kullanılmıştır. Şap virüsü hücresel reseptörlerinin gen ifadelerinin saptanması amacıyla her bir reseptör için 20 μl 'lik reaksiyon karışımı [(10 μl SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-rad, ABD)+1 μl forward primer +1 μl revers primer +5 μl cDNA (10ng/ml)+3 μl dH₂O)] hazırlanmıştır. Bu karışımlar 96 gözlü plakada ilgili gözlere taksim edilerek Applied Biosystems 7500 Hızlı Real-Time PCR cihazına yerleştirilmiş ve seçilen ısıl döngü programında [(95 °C' de 2 dk → 95 °C'de 3sn, 60 °C'de 25 sn (40 döngü)] amplifikasyonları yapılmıştır. Spesifik olmayan PCR ürünlerini tanımlamak için her bir PCR çalışmasından sonra bir erime eğrisi çıkartılmış ve her analiz üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifadesi, SDS 2,4 ve RQ Yöneticisi 1.2.1 (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak endojenik kontrole göre değerlendirilmiştir. Hedeflenen gen transkriptler, ΔCT metodu (Rao vd., 2013) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, floresan belirli bir eşik değere ulaştığında döngü eşiği (Cycle of threshold=CT), ilgili genlerin değerleri, endojenik kontrolün CT değerlerine göre normalize edilmiştir.

$$\Delta \text{CT} = \text{Hedef gen CT} - \text{endojenik kontrol CT}$$

Döngülerin sayısı, numunede tespit edilen ve katlanarak artan DNA miktarı ile ilişkilidir, dolayısıyla görelî n kat değişiklikleri (RQ) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır;

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} (\text{numune 1}) - \Delta\text{CT} (\text{numune 2})$$

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

3.2.11. Şap virüsü laboratuvar suşlarının FBTEC ve FBTEC hücre hatlarında enfektivite süresi tayini

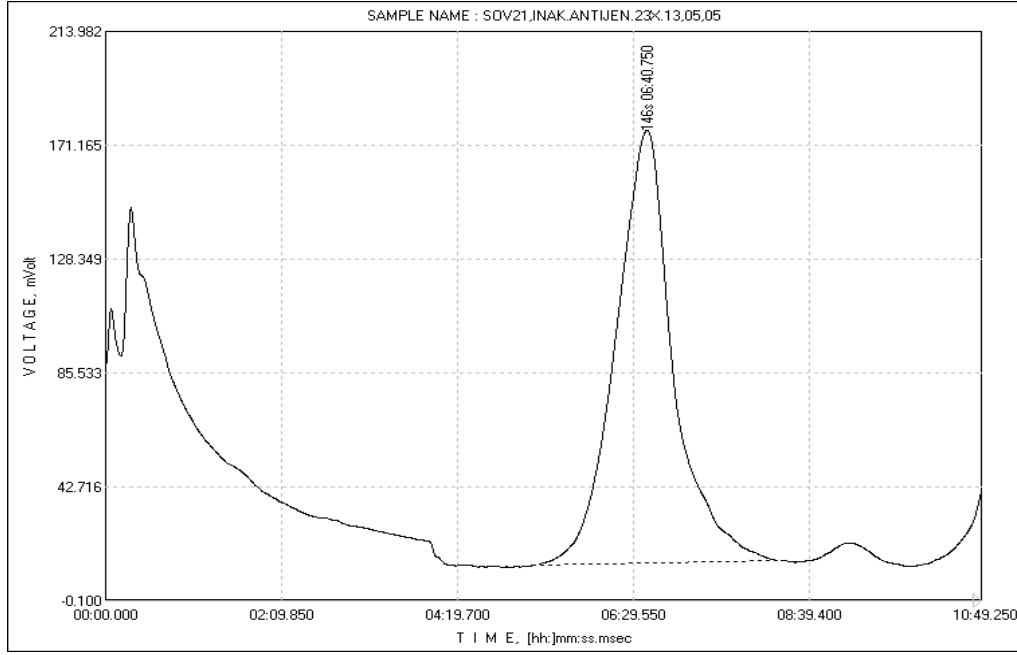
Virüs çalışmalarında, hücre hatlarının pasaj aralığı FBTEC için 5-10, FBTEC için 5-20 ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ için de pasaj 20 kullanılmış ve testler üç defa tekrar edilmiştir. Hücrelerin hazırlanmasında FBTEC için %10 FBS'li DMEM/F12, FBTEC için %10 FBS'li EMEM ve BHK 21 An₃₁ için %10 FBS'li GMEM besi ortamları kullanılmıştır.

FBTEC, FBTEC ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücreleri T25 hücre üretme kaplarına hazırlanmıştır. Hücreler 48 saat sonra %90 oranında kültür kabı yüzeyini tek tabaka olarak kapladıklarında, daha önceden enfektivite titreleri belirlenmiş olan ve materyal bölümünde isimleri belirtilen şap virüsü tiplerinden 0,5ml/T25 olarak inokülasyonları yapılmış ve 37 °C'de bir saat adsorpsiyona bırakılmıştır. Akabinde üzerlerine serumsuz GMEM besi ortamı ilave edilerek, ilk 6 saatten sonra mikroskopik olarak sitopatojenik etki (CPE) oluşumları ve görsel olarak pH takipleri yapılmaya başlanmıştır. 17.saatten itibaren %90 ve %100 CPE gösteren hücreler derin dondurucuya (-20 °C) kaldırılmaya başlanmış ve 20 saat sonunda bütün hücreler derin dondurucuya (-20 °C) kaldırılarak, çalışma süreleri kayıt altına alınmıştır. Derin dondurucuya (-20 °C) kaldırılan virüslü hücre kültürleri çözündürülüp, bir defa daha dondur-çözdür yapıldıktan sonra santrifüj edilerek süpernatantlar alınıp, şap virüsü antijenik bölgesi olan 146S partikül ölçümleri yapılmaya kadar tekrar (-20 °C)'ye kaldırılmıştır (Şap Enstitüsü Protokolü, 2014).

3.2.12. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarından elde edilen şap virüsü laboratuvar suşlarının 146S antijenik partikül miktarlarının tayini

Tam bir şap virüsü ultrasantrifüjlemede 146S sedimentasyon sabiti değerine sahiptir. 146S partikül miktarının belirlenmesinde Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde (2014) belirtilen sukroz yoğunluk gradient santrifügasyon yöntemi ve sürekli akış UV spektrofotometre metodu kullanılmıştır. Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre merkezkaç kuvveti yardımı ile ayrılması prensibine dayanan bu yöntemde, gradient oluşturmada %45'lik (ağırlık/hacim) ve %15'lik (ağırlık/hacim) sakkaroz çözeltileri kullanılmıştır. Tüp içerisinde oluşturulan sakkaroz gradientlerinin üzerine 0,5 ml virüs süspansiyonu eklenmiş ve ultrasantrifüjde 41000 devir/dakika ve 4 °C'de 2 saat yapılan santrifüjleme işlemi

sonucunda 146S proteinlerinin belli bir gradient bölgesinde toplanması sağlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra tüpün altı delinmiş ve belirli bir hızda %60'lık (ağırlık/hacim) sakkaroz çözeltisi ile gradientler optik okuyucuya gönderilmiştir. Spektrofotometrede 254 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılarak, elde edilen pik alanından 146S partikülü derişimi hesaplanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. 146S tayini absorbans grafiği.

3.2.13. FBTFC ve FBTEC hücre hatlarından şap şap virüsü laboratuvar suşlarının plak test ile enfektivite titrelerinin tayini

FBTFC ve FBTEC ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücrelerinde şap aşısı virüslerinin plak oluşturma etkinliği Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde (2014) belirtilen plak test yöntemiyle belirlenmiştir. Enfektivite, bir virionun tek tabaka oluşturmuş hücre kültürüne verildiğinde tek bir hücreye girmesi, çoğaldıktan sonra etrafındaki hücreleri de enfekte ederek bir üreme zonu oluşturması esasına dayanır. Üreyen virüslerin tek tabaka hücre kültüründe uzak mesafelerdeki hücreleri enfekte etmemesi için tek tabaka hücre kültürü besleyici bir agar ile örtülür. Her plak (sitopatojenik odak) bir enfektivite virüs partikülü tarafından oluşturulur. Enfektif virüs partikülü sayısı plak oluşturan ünite (pfu) olarak ifade edilir. Plak oluşumu virüslerin antijenik karakterleri ile ilgilidir. Virüs üremesi

sonunda plak zonunda bulunan hücreler canlılıklarını yitirirler, fakat çevrede bulunan virüsün üremediği hücreler hala canlıdır. Bu durumda plak oluşmuş tek tabaka hücre kültürleri vital bir boya ile boyandığında boya almayan plak zonları rahatlıkla görünebilir (Bachrach vd., 1957; Ustaçelebi, 1992).

Enfektivite titresi tespit edilecek virüs örneklerinin 10^{-1} ile 10^{-6} pfu/ml arasında on katlı dilüsyonları yapılarak her dilüsyondan, %90 yüzeyi kaplamış tek tabaka FBTEC ve FBTEC ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücresi içeren 6 gözlü tek kullanımlık steril hücre kültürü tabletlerine 0,1ml/göz ekimleri yapılmıştır. Tabletler %5 CO₂'li inkübatörde 1 saat adsorbsiyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, 121 °C'de 30 dk otoklavlanarak steril edilen %1.3'lük gum örtme besiyeri ½ oranında pH'sı yükseltilmiş TPB içermeyen 2x GMEM besiyeri ile karıştırılarak her göze 2 ml konulup, tabletler 48 saat yine %5 CO₂'li 37 °C inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresi sonunda tabletlerdeki besiyeri dökülerek PBS içinde %2,5'lik kristal viyole boya solüsyonundan (%20 formol ve %2,5 kristal viyole) her göze 2 ml konulmuştur. 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, boya dökülerek, dikkatlice çeşme suyu ile yıkanıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Plakların değerlendirilmesi, sayılabilen plakların bulunduğu son gözlerdeki plakların sayılması ile yapılarak, plak sayısının ortalaması alınmış ve aşağıdaki formülde yerine konularak, enfektivite titresi pfu/ml olarak hesaplanmıştır (Bachrach vd., 1957; Sütçü, 1986; Şap Enstitüsü protokol, 2014).

$$\text{Enfektivite titresi} = \frac{\text{Plakların sayıldığı dilüsyon} \times \text{Ortalama plak sayısının logaritması}}{\text{İnokülasyon hacmi}}$$

3.2.14. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının şap virüsünün saha izolatlarına karşı duyarlılık testi

Sahadan şap hastalığı şüphesiyle Şap Enstitüsü'ne gelen marazi maddelerden, çoklu qRT-PCR ile çalışılıp pozitif bulunan ve tiplendirmesi yapılan ama BHK 21 An₃₁ hücre hattında negatif bulunan 20 adet saha materyali seçilmiştir. Bu numuneler homojenizasyon yöntemi ile aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (Sütçü, 1985; Şap Enstitüsü protokol, 2014).

Biyogüvenlik kabininde içinde gliserin ve 0,04 M PBS bulunan homojenizatör tüplerine 500 mg saha materyali numunesi konulmuş ve homojenizatörde 3 dk 8000 devirde homojenize edilerek 4 °C de 3500 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 4 °C ye kaldırılmıştır. FBTFC ve FBTEC hücre hatları ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattından 24 gözlü hücre üretme tabletlerine ekimler yapılarak %5 CO₂'li inkübatörde 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonra %90 oranında kültür kabı yüzeyini tek tabaka olarak kapladıklarında besin ortamları boşaltılmış ve yüzeyleri serum ve TPB içermeyen GMEM besin ortamı ile yıkanmıştır. Önceden hazırlanıp 4 °C de muhafaza edilen 20 farklı saha materyalinin steril numunelerinin her birinden bir göze olmak üzere 20 göze 100 µl/göz olarak inokülasyonları yapılmıştır. Ayrıca, 3 göze pozitif kontrol olarak şap virüsünün laboratuvar suşları (ATUR/11, OTUR/07, Asia/11) ve bir göze de negatif kontrol olarak herhangi bir inokülasyon yapılmamıştır. Tabletler %5 CO₂'li inkübatörde 37 °C'de adsorbsiyon için bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Adsorbsiyon sonrası gözlere serumsuz GMEM besi ortamı konularak tekrar inkübatöre kaldırılarak CPE takibi yapılmıştır. Paton ve arkadaşlarının (2012) şap hastalığı yönünden şüpheli hayvanların örneklerinin ekildiği hücre kültürlerinin 48 saat boyunca CPE yönünden izlenmesi, CPE gözlenmediği durumlarda, kültürlerin dondurulup çözülerek yeniden taze kültürlerle ekilerek, tekrar 48 saat boyunca izlenmesi şeklindeki önerileri dikkate alınmıştır. Bu bağlamda, 48 saat sonra kültür kapları derin dondurucuda (-20 °C)' de dondurulup, 37 °C'de çözdürülmüş ve bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Numuneler ependorf tüplere aktarılarak 3000 devirde santrifüj edilmiş, süpernatantlardan tekrar önceden hazırlanan hücrelere yine aynı şekilde inokülasyonlar yapılarak, yukarıdaki işlemler aynı şekilde tekrarlanmış, böylece saha materyali örneklerinin 2 defa kör pasajları yapılarak, numuneler 4 °C'ye kaldırılmıştır.

FBTFC ve FBTEC hücre hatları ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hatlarından bu defa ikişer adet 24 gözlü hücre üretme tabletlerine ekimler yapılmıştır ve %5 CO₂'li inkübatörde 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, kültürlerin besin ortamları boşaltılarak yüzeyleri serum ve TPB içermeyen GMEM besin ortamı ile yıkanmıştır. İkinci hücre pasajından toplanan ve 4 °C' ye kaldırılan saha numunelerinden ve kontrol aşısı suşlarından hücrelere 100 µl/göz olarak inokülasyonları yapılarak bir saat 37 °C'de adsorbsiyona bırakılmıştır. Çift olan kültür kaplarından bir seriye, plak test metodunun gum örtme besiyeri ve kristal viyoletilerle boyama işlemi yapılmıştır. Diğer

eşkültür tablete serisine, serum ve TPB içermeyen GMEM besin ortamı 1 ml/göz olarak taksim edilmiş, CPE ve pH takipleri yapılmıştır. %90 CPE oluşan gözlerdeki numuneler ependorf tüplere alınıp -20 °C'ye kaldırılmıştır. 48 saat sonra da kültür kaplarının tamamı -20 °C'ye kaldırılarak dondurulmuş, 37 °C' de çözündürülmüş ve bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Bütün numuneler ependorf tüplere aktarılarak 3000 devirde santrifüj edilmiş ve süpernatantlar tekrar yeni ependorf tüplere transfer edilerek qRT-PCR testi yapılmaya kadar -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.15. Hücre pasajları yapılan saha materyallerinde çoklu qRT-PCR ile şap virüsü serotiplerinin belirlenmesi

Daha önce üç defa hücre pasajı yapılan ve derin dondurucuya kaldırılan 20 adet saha materyaline ait numuneler çözündürülerek Şap Entitüsü protokolü'ne (2014) göre serotiplendirmeleri aşağıda açıklandığı şekilde qRT-PCR ile yapılmıştır.

RNA izolasyonları için, QIAamp Viral RNA mini Kit Plus (Qiagen, Almanya) talimatına göre numuneler hazırlanıp, Qiagen QIAcube ekstraksiyon robotu cihazına (Qiagen, Almanya) yüklenmiş ve 1,5 saat sonunda hazır olan RNA ekstraktları -20 °C'ye kaldırılmıştır. Mpx-qRT-PCR ile de şap virüsü varlığı aranarak varsa tiplendirmeleri aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Her serotip (A, O, Asia-1) için 3 çift ve genel olarak şap hastalığının var ya da yok olarak ortaya konması için de gerekli universal primerler olmak üzere toplamda 4 çift primer ve 4 adet prob kullanılmıştır (Çizelge 3.12) (Çizelge 3.13). Bunlar, Şap Enstitüsü'nde kullanılan primer setleri ve problemlerinden temin edilerek Şap Enstitüsü SOP'lerine göre çalışılmıştır.

Çizelge 3. 12. Mpx-qRT-PCR ile şap virüsü tip tayini için primer seti.

Adı	Dizisi	Serotipi
Q-A-NEP-F	TCCCACACATGTTATTGAC	A
Q-A-NEP-R	GACCACAATCTCCAAGTC	A
RT-O-F-1	GCCTGACTGATTCTTATG	O
RT-O-R-2	GCTCTCTTTTGGTTGATAG	O
RT-As-F-1	TTCGGAGAAGTACCCTTTG	Asia1
RT-As-R-1	GCCAGGAGGGACGTAAGC	Asia1
RT-Uni3d-F	GGGACCAATACAGGAGAAG	Üniversel
RT-Uni3d-R	AACGCAGGTAAAGTGATC	Üniversel

Çizelge 3. 13. Mpx-q-RT-PCR ile şap virüsü tip tayini için prob seti.

Adı	Dizisi	Serotipi
Q-A-NEP-P1	TCCCACACATGTTATTGAC	A
RT-O-P-2	ACCAGCAGGCATCCTCCGTT	O
RT-As-P-1	AACTCTGGTGACCGMCTGCT	Asia1
RT-Uni3d-P	ATCTCCGTGGCAGGACTCGC	Üniversel

Çizelge 3. 14. Mpx-q-RT-PCR örnek primer ve prob derişimleri.

Primer Adı	Derişimi (pmol/µl)	Almacak Miktar (µl)
Q-A-NEP-F	100	10
Q-A-NEP-R	100	10
RT-O-F-1	100	10
RT-O-R-2	100	10
RT-As-F-1	100	10
RT-As-R-1	100	10
RT-Uni3d-F	100	10
RT-Uni3d-R	100	10
Su(DEPC)	-	20
TOPLAM	10	100
Su(DEPC)	-	900
TOPLAM	1	1000

Reaksiyon karışımı kit prokolüne göre (AccuPower® Dual-Hotstart RT-qPCR PreMix, ABD) hazırlanmıştır. Karışımlar yine biyogüvenlik kabini içinde birleştirilmiş ve her bir örnek için işaretlenmiş karışım içeren tüplere farklı biyogüvenlik kabini içerisinde 1 µl RNA aktarılmıştır (Çizelge 3.14). Santrifüjde kısa bir süre yüksek devirde karıştırılarak, real time-PCR cihazında, ısıl döngü programı [(50 °C'de 10 dk (ters transkripsiyon) → 95 °C'de 5 dk (bir döngü) → 95 °C'de 30 sn ve 55 °C'de 35 sn (40 döngü)] seçilmiştir. Kit protokolü tek aşamalı olduğu (cDNA hazırlanması basamağı olan ters transkripsiyon ve

devamında amplifikasyonu) için ısısız döngü cihazında tek program üzerinden cihaz “Bioneer Real Time PCR” kullanma talimatına uygun olarak çalıştırılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde CT değeri 35 ve üzeri olanlar negatif olarak değerlendirilmiştir

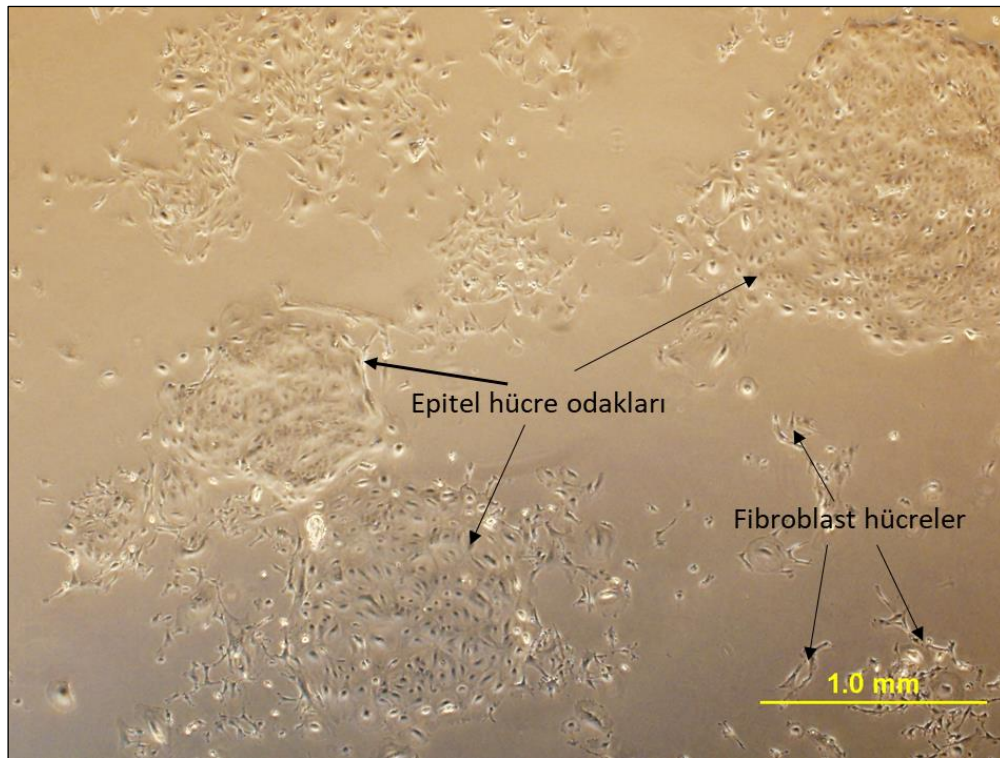
3.2.16. İstatiksel Değerlendirmeler

Çalışmamız da sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılmış ve elde edilen verilere “Repeated Measures ANOVA” ve ileri değerlendirmeler için ise “Post Hoc Tukey” testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Tüm istatistiksel uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $p < 0,05$ önem derecesinde anlamlı olarak kabul edilmiştir. p değerleri 0.05 üzerinde olan değerler ise anlamlı olarak fark göstermemiş kabul edilmiştir.

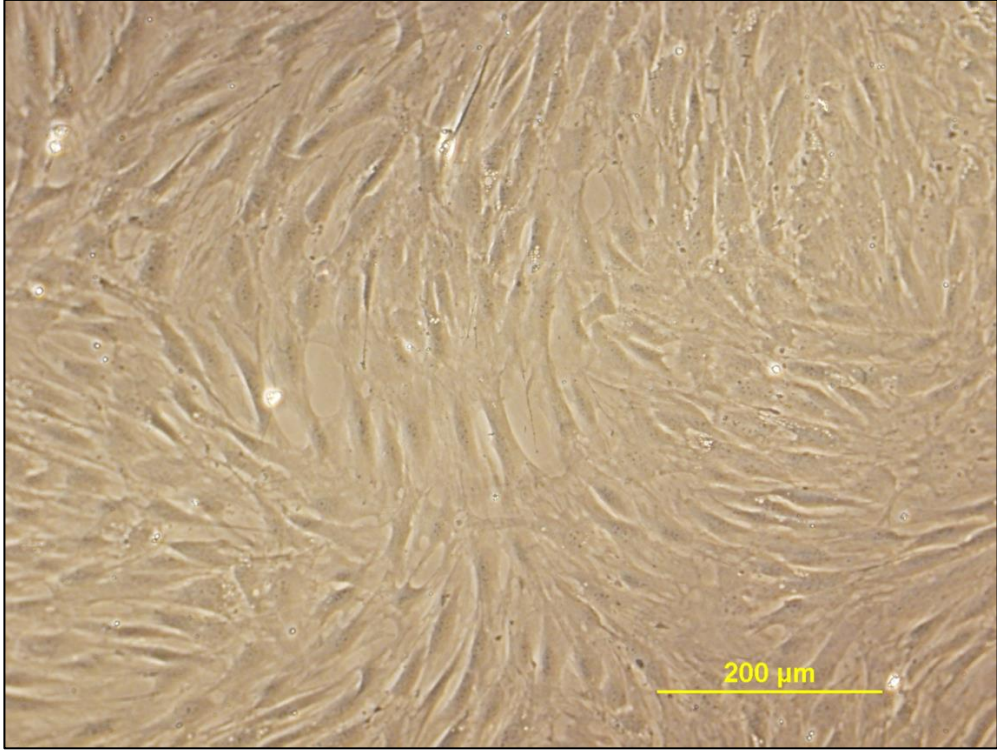
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Epitelyal ve Fibroblast Hücrelerinin Sığır Fötüsü Dili Primer Kültüründen Saflaştırılması Sonuçları

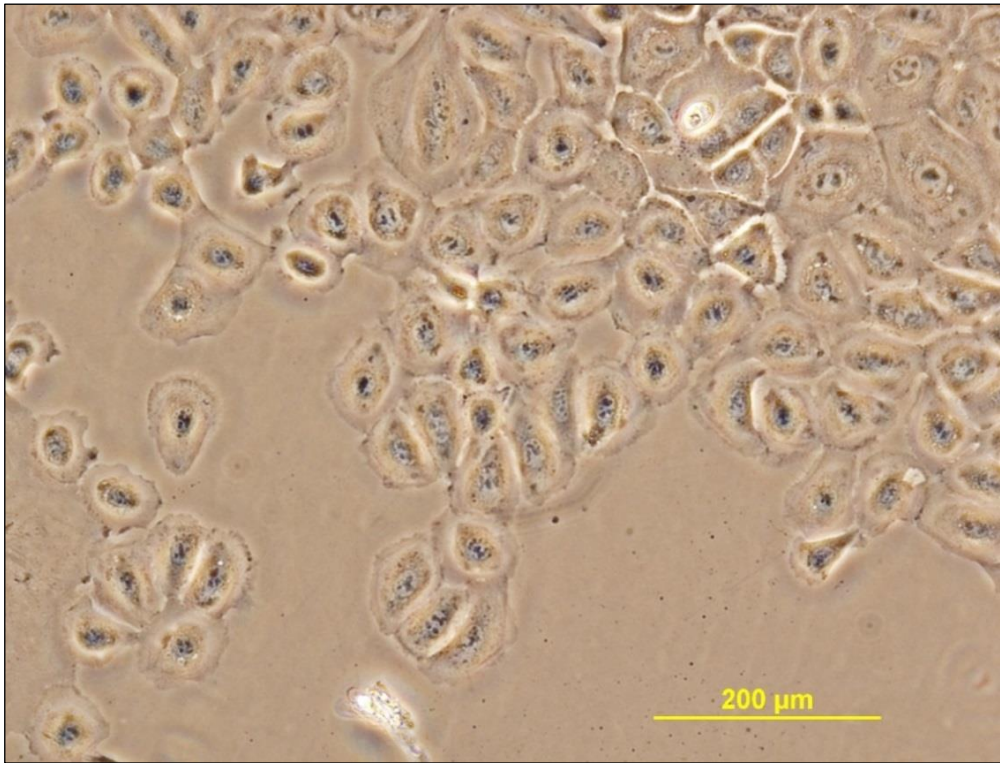
Fetal dokulardan elde edilen kültürler erişkin dokulardan elde edilenlere göre daha hızlı çoğalırlar. Hayflick 1965’de, fetal ve yetişkin akciğerinden elde edilen kültürlerle yaptığı çalışmada erişkin akciğerinden hazırlanan kültürlerin daha kısa ömürlü olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda, bu çalışmada da yetişkin sığır dili yerine fetal sığırın dili seçilmiştir. *In vitro* ortamda ve aseptik koşullar altında fetal sığırın dilinden hazırlanan primer kültürden (Şekil 4.1), epitelyal (Şekil 4.2) ve fibroblast (Şekil 4.3) hücrelerin ayrıştırılması Jeon ve Hwang’ın (2014) uyguladığı metoda göre gerçekleştirilmiş ve doku kültürü mikroskobu ile morfolojileri görüntülenmiştir.



Şekil 4. 1. Sığır fötüsü dili primer kültürü pasaj 0’ın doku kültürü mikoskobu görüntüsü.



Şekil 4. 2. Sığır fötüsü dili fibroblast hücrelerinin 5.pasajı doku kültürü mikroskobu görüntüsü.

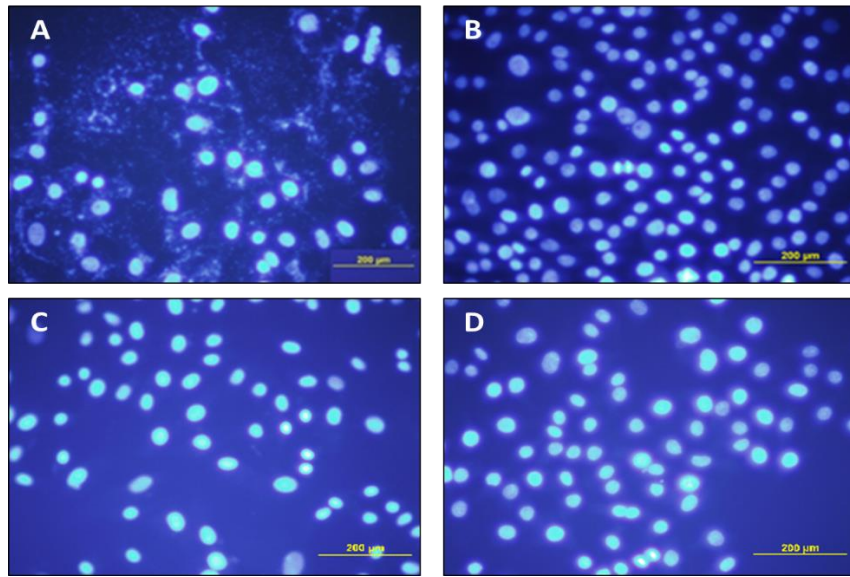


Şekil 4. 3. Sığır fötüsü dili epitel hücrelerinin 5.pasajı doku kültürü mikroskobu görüntüsü.

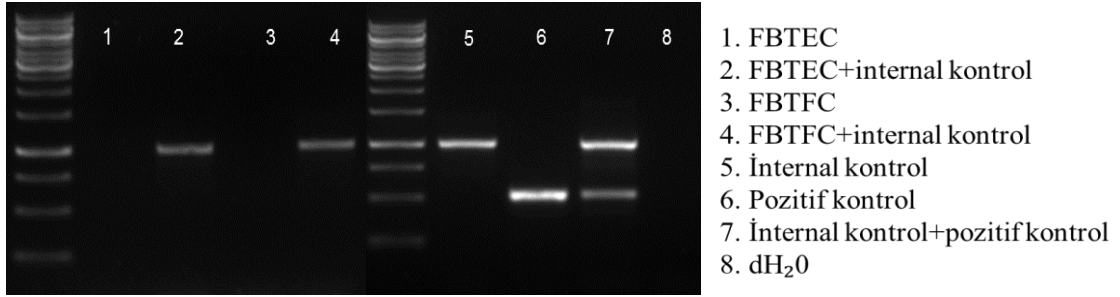
Hücre saflaştırması ile elde edilen hücreler morfoloji bakımından Freshney'in (2010) tanımı ile uyumluluk göstermektedir. Fibroblastik hücreler, bipolar ve multipolar görünümlü, uzunluğu eninden iki kat daha büyüktür. Epitelyal hücrelerin ise poligonal ve daha düzenli boyutlarda olduğu görülmüştür. Morfolojilerinin tanımlanmasından sonra çalışmada kısa adları kullanılmak üzere hücreler adlandırılmıştır. Adlandırma da İngilizce açık isimlerinin baş harflerinin kodlaması şeklinde yapılmıştır. Epitelyal hücreler FBTEC (Fetal Bovine Tongue Epithelial Cells: Sığır fötüsü dil epitel hücreleri), fibroblastik hücrelerde FBTFC (Fetal Bovine Fibroblast Cells: Sığır fötüsü dil fibroblast hücreleri) olarak adlandırılmıştır.

4.2. Hücre Hatlarının Mikoplazmal ve Viral Kontaminatları Yönünden Sterilite Test Sonuçları

FBTEC ve FBTFC hücre hatlarında güvenlik yönünden, bakteri, mantar ve maya için her subkültürde, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında FTM ve TSB bakteriyolojik besiyerlerine yapılan ekimlerde herhangi bir üreme tespit edilmemiştir. Mikoplazma ajanı aranması için hem DAPI floresan çekirdek boyama hem de PCR metodu uygulanmış ve her ikisinde de hücre hatları negatif bulunmuştur (Şekil 4.4) (Şekil 4.5).

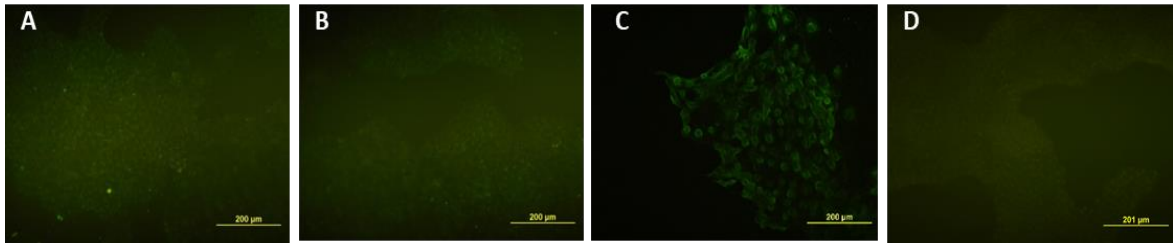


Şekil 4. 4. Hücre hatlarının mikoplazma ajanı için DAPI floresan çekirdek boyaması floresan mikroskop görüntüsü. A) Mikoplazma pozitif kontrol B) Mikoplazma negatif kontrol C) FBTEC hücre hattı D) FBTFC hücre hattı.

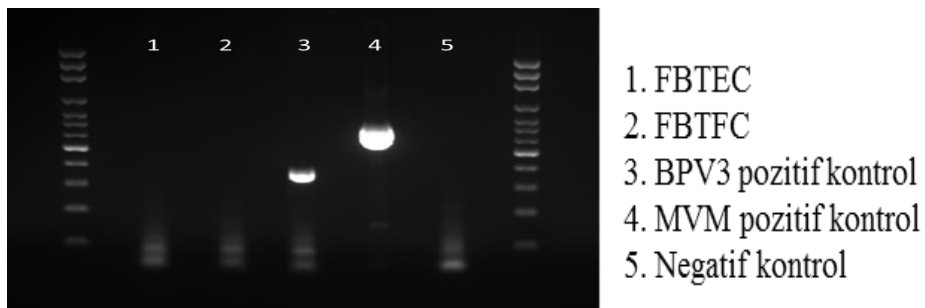


Şekil 4. 5. Hücre hatlarının mikoplazma ajanı yönünden PCR testi sonuçları.

Hücre hatlarına viral ajanlar yönünden sterilite testleri, BVD için İFAT (Şekil 4.6), MVM ve BPV3 için PCR metodu ile yapılmış ve hücre hatları her üç viral ajan yönünden de negatif bulunmuştur (Şekil 4.7).



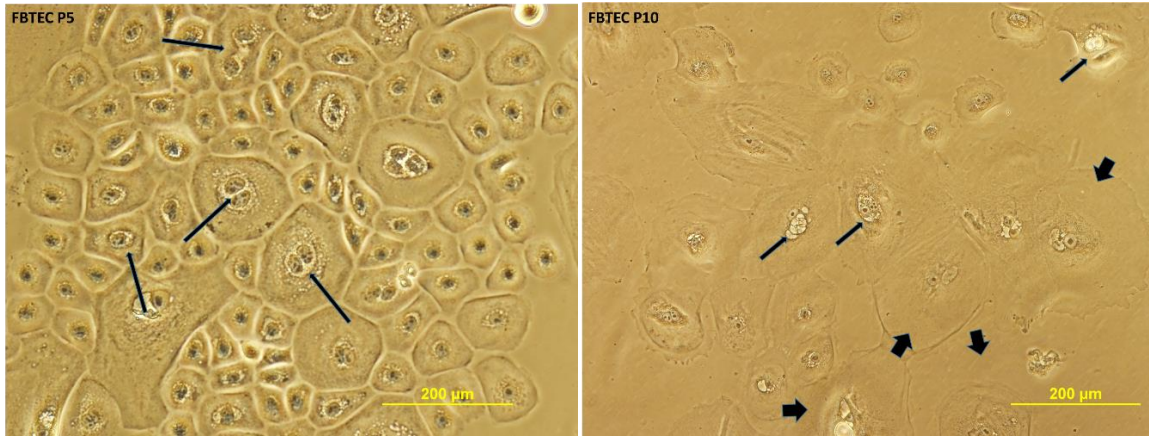
Şekil 4. 6. Hücre hatlarının BVD viral ajanı yönünden IFAT floresan mikroskop görüntüsü. A) FBTEC hücre hattı B) FBTFC hücre hattı C) BVDV pozitif kontrol D) BVDV negatif kontrol.



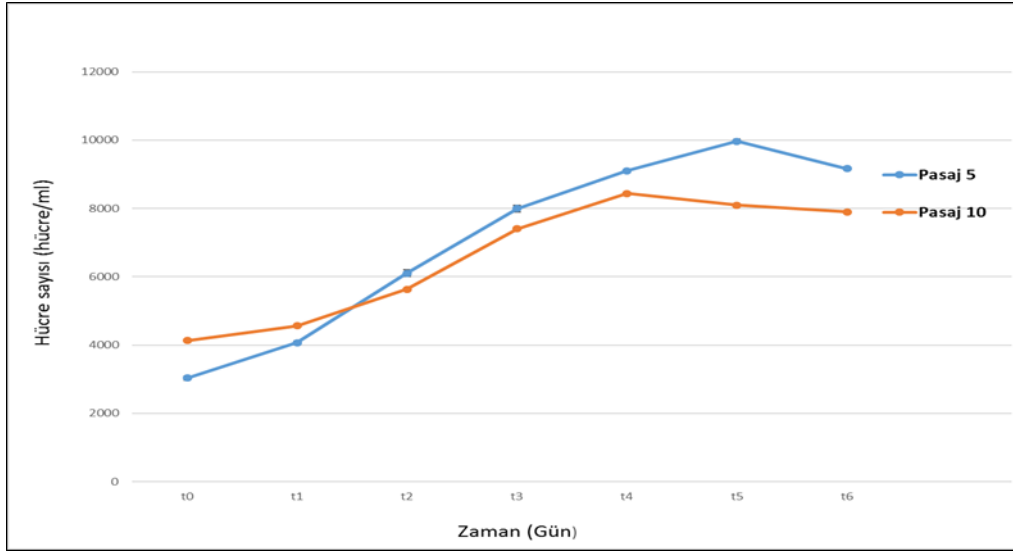
Şekil 4. 7. Hücre hatlarının BPV3 ve MVM viral ajanları yönünden PCR testi sonuçları.

4.3. Hücre Büyüme Kinetiği Sonuçları

FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının büyüme kinetikleri olarak büyüme eğrileri yapılmış ve büyüme eğrisine bağlı olarak popülasyon ikilenme zamanları hesaplanmıştır. FBTEC hücre hattında 10. pasajdan itibaren Şekil 4.8’de de görüldüğü gibi hücrelerde dejenerasyon başlamış ve çoğalma yavaşladığı için hücre pasajları ilerletilememiş, bu nedenle büyüme eğrisi ve popülasyon ikilenme zamanları 5. ve 10. pasajda yapılabilmıştır (Şekil 4.9) (Şekil 4.10). Hayflick ve Morhead’in (1963) sonlu hücre hatlarının yaşı ya da katlanma sayısı olarak tanımladıkları Hayflick sınırının FBTEC hücre hattı için 10 olduğu görülmüştür. FBTEC hücre hattının hem 5.pasaj hem de 10. pasajından yapılan büyüme eğrisinde, Freshney’in de (2010) tanımladığı gibi normal bir büyüme eğrisinde olması beklenen üç fazda (adaptasyon fazı, logaritmik artış fazı ve durağan faz) görülmüştür. FBTEC hücre hattının popülasyon ikilenme zamanı ise kültürün katlanma sayısı ya da yaşı ile doğru orantılı olarak bulunmuş ve hücrelerin 5.pasajında 41.03 saat olan popülasyon ikilenme zamanı, 10.pasajda hücrelerin yaşlanması, dejenerasyonu ve yavaş çoğalması ile doğru orantılı olarak daha da uzayarak 61.02 saat olmuştur.

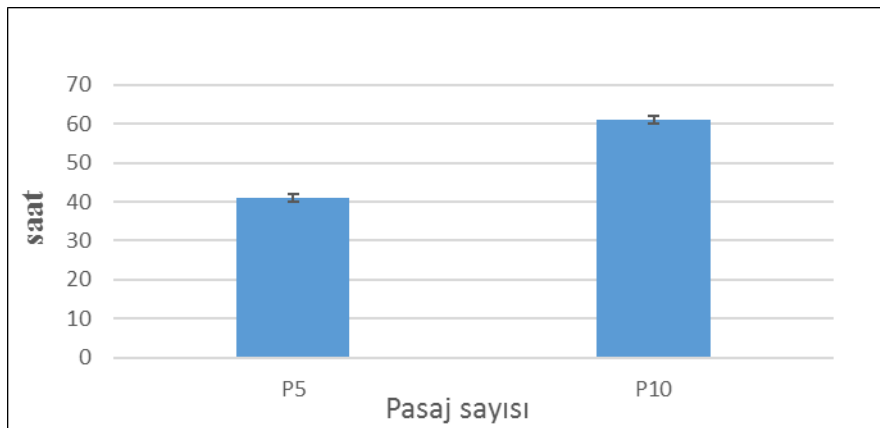


Şekil 4.8. FBTEC hücre hattı doku kültürü mikroskop görüntüsü; hücre pasajı 5’de hücreler sağlıklı görüntüye sahip olup, (→) mitoz aşamasında hücreler mevcuttur. Hücre pasajı 10’da ise hücrelerde (→) dejenerasyon, silikleşme, yaşlanma ve devleşmiş hücreler, (→) hücrelerde granülizasyon, dejenerasyon ve yoğunlaşmalar mevcuttur.



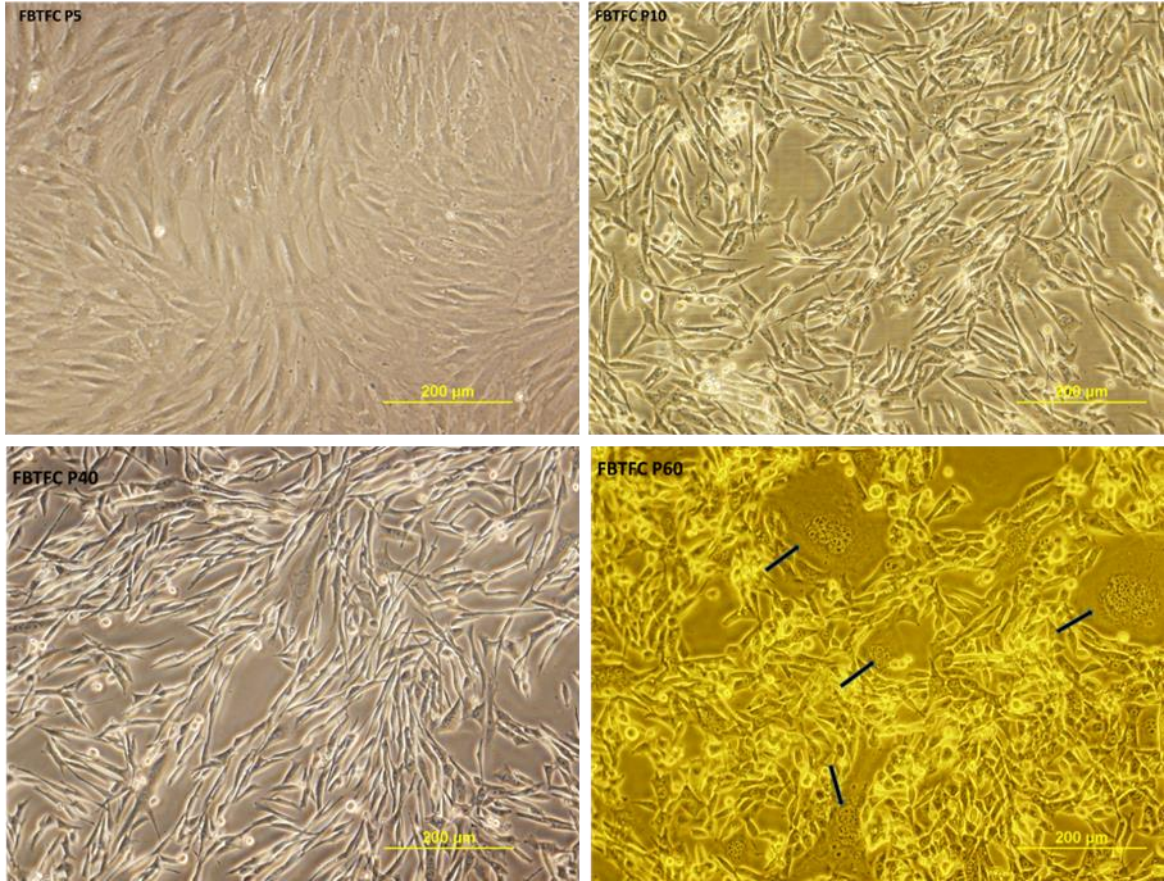
Şekil 4. 9. FBTEC hücre hattının pasajlara göre büyüme eğrileri ($p < 0.05$).

FBTEC hücre hattının pasaj 5 ve pasaj 10 için çıkartılan büyüme eğrilerinin ve popülasyon ikiye katlanma zamanlarının istatistiksel değerlendirmesinde, pasaj 5 ($M=7061$, $SD=2570$) ve 10'nu ($M=6595$, $SD=1693$) büyüme eğrileri yönünden karşılaştırdığımızda ($F=5.002$, $p < 0.05$) aralarında anlamlı fark bulunmuştur. Hücrelerde 5. pasajdan sonra üremede yavaşlama ve yaşlanma başlamış, büyüme grafiğinde Şekil 4.9'da görüldüğü gibi 10.pasajda hücrelerin çoğalma hızı ve sayısı pasaj 5'e göre daha düşüktür. Popülasyon ikilenme zamanlarını karşılaştırdığımızda ise, büyüme eğrisi sonuçları gibi pasajlar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Pasaj 10'un ikilenme zamanı ($M=61.02$ $sd=1.57$) pasaj 5'in ikilenme zamanından ($M=41.03$ $SD=0.83$) ($t=-19.53$, $p < 0.05$) daha uzun olup, hücrelerin bölünme süreleri uzamıştır (Şekil 4.10) .



Şekil 4. 10. FBTEC hücre hattının popülasyon ikilenme zamanı ($p < 0.05$).

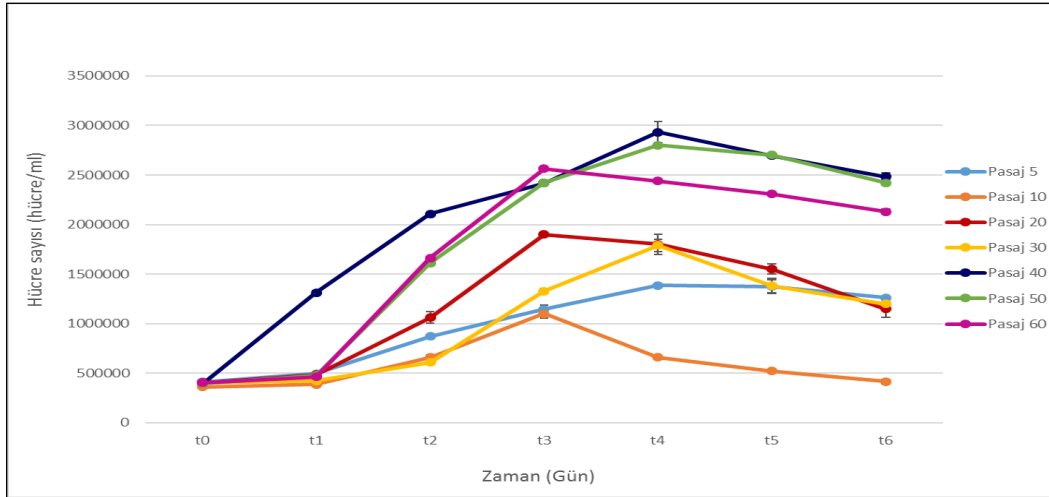
FBTFC hücre hattı ile 60 pasaj yapılmış, morfolojide belirgin dejenerasyonlar görülmemiştir (Şekil 4.11). Ancak 10.pasajdan itibaren morfoloji daha fibroblastik bir yapı kazanmış ve ayrıca 60. pasajdan itibaren hücre çoğalmasındaki yavaşlama ile birlikte hücrelerde yaşlanma ve granülizasyonlar da görülmüştür (Şekil 4.11) (Şekil 4.12).



Şekil 4. 11. FBTFC hücre hattının doku kültürü mikroskobu görüntüsü; Hücre pasaj 5, 10 ve 40'da hücreler sağlıklı görünüp, 10. pasajdan sonra morfolojileri daha tipik fibroblast yapıya dönmüştür. Ancak pasaj 60'da hücrelerde (—→) devleşme ve granülleşmeler başlamıştır.

FBTFC hücre hattında her 10 pasajda bir Şekil 4.12'deki büyüme eğrileri çıkartılmış ve yine büyüme eğrilerine bağlı olarak popülasyon ikilenme zamanları hesaplanarak grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.13). FBTFC hücre hattının 5. pasajında ve sonrasında her 10 pasajda bir yapılan büyüme eğrilerinde de yine Freshney'in (2010) tanımladığı normal büyüme eğrisindeki üç faz (adaptasyon fazı, logaritmik artış faiz ve durağan faz) görülmüştür. FBTFC hücre hattı FBTEC hücre hattına göre daha hızlı çoğaldığı için bulunduğu kültür kabında daha kısa sürede doygunluk hacmine ulaşmış ve büyüme eğrisinde genelde 4. ya da

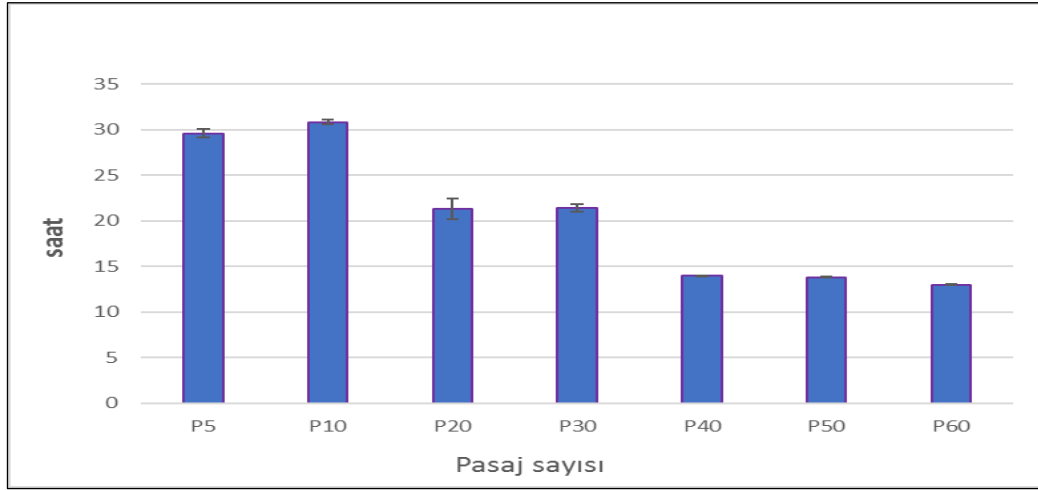
5. günden sonra hücre ölümlerine bağlı olarak canlı hücre sayısında olağan düşüşler görülmüştür. 20. pasajda hücre çoğalması hızlanmış, 40. pasajda artarak devam etmiş, bununla doğru orantılı olarak popülasyon ikilenme zamanının da kısaldığı gözlenmiştir. 30. pasajdan itibaren kültür ortamında süspansen kültüre adaptasyonun ipuçlarını verebilecek olan, süspansen olarak üreyen canlı hücre popülasyonları gözlenmiştir. Son üç onlu basamaktaki pasaj olan pasaj 40. 50. ve 60. pasajlarda da popülasyon ikiye katlanma zamanının ortalama 13 saat olduğu görülmüştür. Ancak 60. pasajda hücre sayılarında azalmalar olmakla birlikte popülasyon ikilenme zamanının hala 13 saat olduğu görülmüştür (Şekil 4.12). Buna ortamdaki canlı ama süspansen olarak çoğalan hücre sayısının da katkısı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4. 12. FBTFc hücre hattının pasajlara göre büyüme eğrileri ($p < 0.05$).

FBTFc hücre hattının, büyüme eğrilerinin istatistiksel değerlendirmeleri 3 grup altında (1.grup; hücre pasajı 5-10, 2.grup; hücre pasajı 20-30, 3.grup; hücre pasajı 40-50-60) toplanarak 24 saatte bir alınan numuneler ile büyüme eğrileri karşılaştırılmıştır. Repeated measures ANOVA ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, 1. Grup ($M=7.42 \times 10^5$, $SD=3.9 \times 10^5$), 2. Grup ($M=1.12 \times 10^6$, $SD=5.6 \times 10^5$) ve 3.grup ($M=1.94 \times 10^6$, $SD=9.1 \times 10^5$) arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($F=210.56$ $p < 0.05$). Grupları kendi aralarında eşleştirerek karşılaştırdığımızda ise her grubun birbirinden farklı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu farklılığın yanı sıra 3 grubun ikilenme zamanlarını da ANOVA ile karşılaştırdığımızda, gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($F=1219.39$, $P < 0.05$). Aralarındaki farklar Post Hoc Tukey HSD testi ile incelendiğinde ise 3. grup ($M=13.60$,

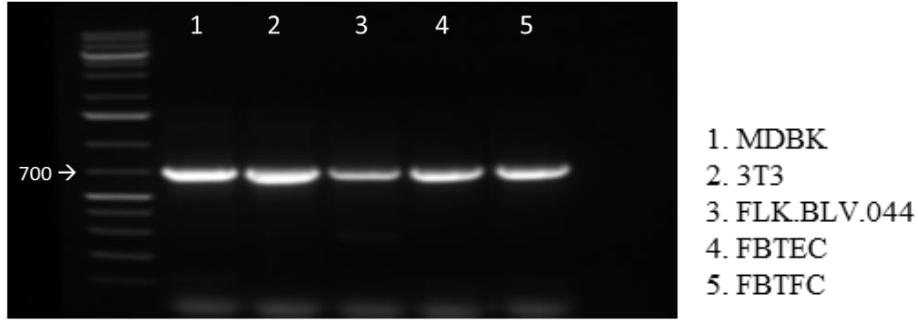
SD=0.45) diğ er iki gruptan (1. grup için M=30.25 SD=0.75, $p<0.05$; 2. grup için M=21.39, SD=0.78, $p<0.05$) daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde 2. grup da 1. gruptan daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4. 13. FBTEC hücre hattının popülasyon ikiye katlanma zamanı ($P<0,05$).

4.4. DNA Barkodlama İle Hücre Hatlarının Tür Orijini ve Saflığı Sonuçları

Mitokondriyal CO1 geninin hayvanlar için küresel bir biyo-tanım sistemine çekirdeği olarak hizmet edebileceği Hebert ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Hemen hemen bütün hayvan grupları için bu genin yaklaşık 658 baz çiftlik aynı gen bölgesini kullanan DNA barkodlama, hayvan hücre hatlarının türünü tespit etmede oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Hebert vd., 2003a). Yaklaşık bir milyondan genomik DNA ekstraksiyonu hazırlanmış ve CO1 geninin 658 bp'lik korunmuş gen bölgesi için seçilen primer dizileri ile PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Kontrol grubu olarak, fare, koyun ve sığır hücre hatları kullanılmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek hedef büyüklük olan 658 bp bandında ampliconlar görüntülenmiştir (Şekil 4.14). FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının bant büyüklükleri kontrol gruplarında da olduğu gibi literatürle uyumlu olarak 658 bp olduğu saptanmıştır (Hebert vd., 2003a; Ivanova vd., 2012).



Şekil 4. 14. PCR sonucu elde edilen CO1 geninin 658 bp'lik korunmuş gen bölgesi ampikonların jel elektroforezdeki 658 bp bandındaki görüntüleri.

PCR ürünlerinin sekans sonuçlarının elektroferogramlarında nükleotid dizilerinin oldukça belirgin, tabanda pik kirliliklerinin olmadığı, temiz görünümde ve çapraz kontaminasyonun göstergesi olan herhangi farklı pik kirliliklerinin de olmadığı görülmüştür. Her iki hücre hattının elektroferogramları ekte sunulmuştur (EK-B ve EK-C). Sekans sonuçlarının FASTA formatları da (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) BOLD (The Barcode of Life Data System (www.Barcodinglife.org) sistemine yüklenerek kimlik doğrulaması yapılmıştır (Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007, BOLD: The Barcode of Life Data System (www.Barcodinglife.org), Molecular Ecology Notes, 2007). FBTEC hücre hattı karşılaştırılan 100 örnekte %100'ü ile *Bos taurus* uyumlu olduğu, FBTEC hücre hattının da karşılaştırılan 100 örnekte %99'u ile *Bos taurus* uyumlu olduğu onaylanmıştır. Bu sonuçlar ile her iki hücre hattının da sığır kökenli olduğu doğrulanmış ve sonuçlar DNA barkodlamada akredite olan DSMZ tarafından da sertifikalandırılmıştır (EK-D ve EK-E).

```

5'- CCAACAAAGATTGGTACCCTTTATCTACTATTTGGRGCTTGGGCCGGTATARTAGGAACA
GCTMTWAGCCTTCTAATTCGCGCTGAATTAGGCCAACCCGGAACCTGCTCGGAGACGAC
CAAATCTACAACGTAGTTGAACCGCACACGCATTGTAATAATCTTCTCATAGTAATA
CCAATCATAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTTCCCTAATAATTGGTGCTCCCGAT
ATAGCATTCCCGAATAAATAATAAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCATTCTACTA
CTCCTCGCATCCTCTATAGTTGAAGCTGGGGCAGGAACAGGCTGAACCGTGTACCCCTCC
TTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTCTTTACAC
TTAGCAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCCATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATA
AAGCCCCCGCAATGTCACAATACCAAACCCCTCTGTTCTGATGATCCGTAATAATTACC
GCCGTACTACTACTCTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATCACAATGCTATTAACA
GACCGGAACCTAAATACAACCTTCTTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCCCTATTCTATAT
CAACACTTATTCTGATTYTYGGMCAYYCASMMRITYACCCTATAGTGAGTSRKAYKAAAY
TAAAT-3'

```

Şekil 4. 15. FBTEC hücre hattı mitokondriyal DNA CO1 geninin 658 bp'lik bölgesinin sekansı.


```

5'-AGGAGWTTGGTACCCTTTACTACTATTTGGTGCTTGGGCCGGTAYAGTAGGAACAGCTC
TAAGCCTTCTAATTCGCGCTGAATTAGGCCAACCCGGAACCTGCTCGGAGACGACCAA
TCTACAACGTAGTTGTAACCGCACACGCATTTGTAATAATCTTTCATAGTAATACCAA
TCATAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTTCCCTAATAATTGGTGCTCCCGATATAG
CATTTCCCGAATAAATAATAAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCATTCTACTACTCC
TCGCATCCTCTATAGTTGAAGCTGGGGCAGGAACAGGCTGAACCGTGTACCCTCCCTTAG
CAGGCAACCTAGCCCATGCAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTTTTACACTTAG
CAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCCATCACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAGC
CCCCGCAATGTCACAATACCAAACCCCTCTGTTTCGTATGATCCGTAATAATTACCGCCG
TACTACTACTACTCTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATACAATGCTATTAACAGACC
GGAACCTAAATACAACCTTCTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCCTATTCTATATCAAC
ACTTATTCTGATTTTTTGGACAYCCAGAAGTYACCTATAGTGAGTCGTRTWAAMTAAA-3'

```

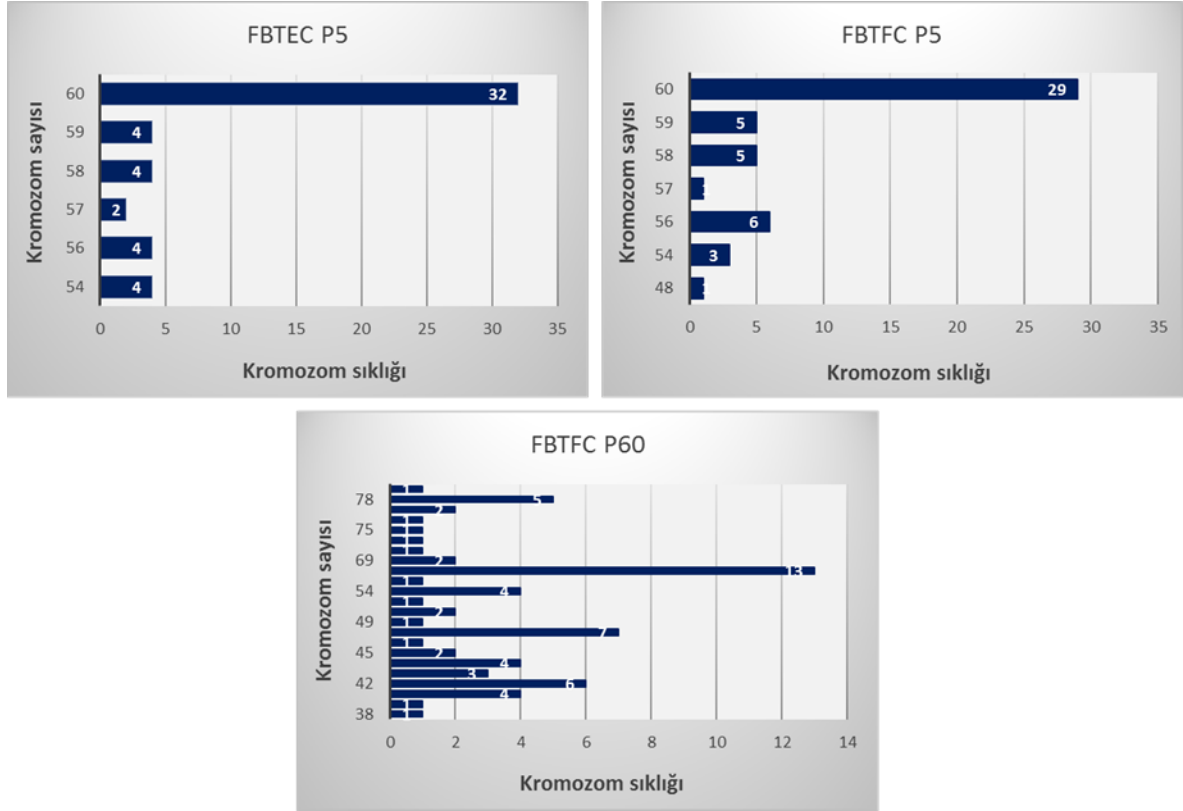
Şekil 4. 16. FBTEC hücre hattı mitokondriyal DNA COI geninin 658 bp'lik bölgesinin sekansı.

4.5. Karyotip ve Tripsin G-Bantlama (GTG) İle Hücre Hatlarının Kromozom Analizi Sonuçları

FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının kromozom analizi için karyotip ve GTG, MacLeod ve arkadaşlarının (2007) protokolleri modifiye edilerek uygulanmıştır. Kromozom analizi, kromozom kararsızlıklarını tespit etmede ve kromozomları düzenlemede kullanılan geleneksel bir tekniktir. Bu amaçla kullanılan karyotip de bir vücut hücresi örneğindeki kromozomların boyutunu, şeklini ve sayısını belirlemek ve değerlendirmek için yapılan bir testtir (Khatun vd., 2011).

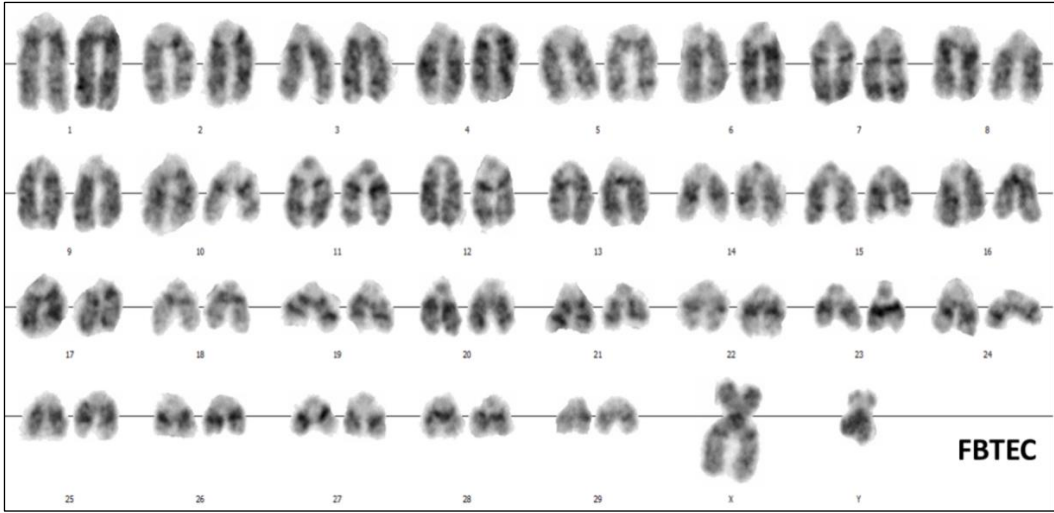
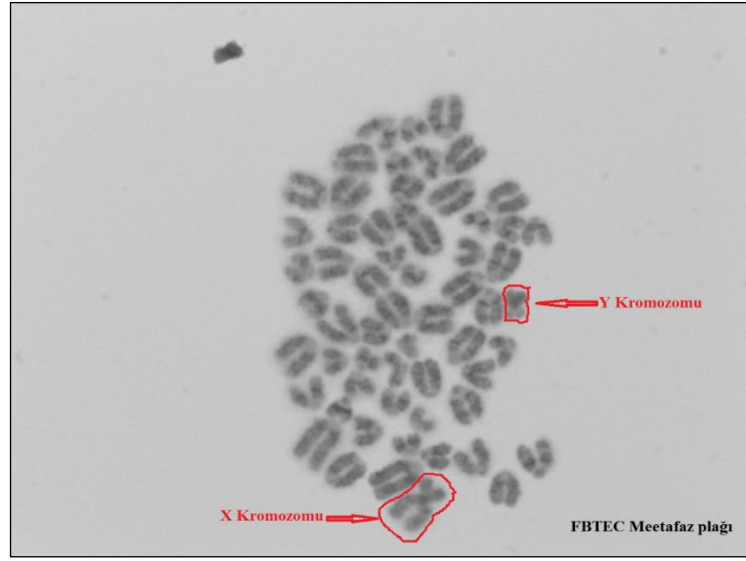
Yapılan karyotip değerlendirmesinde, kromozomların numaralandırılması ve yapısal analizi, evcil hayvanların uluslararası sitogenetik adlandırma sistemine (DiBerardino vd., 1989) ve evcil sığırların uluslararası kromozom adlandırma sistemine (Cribru vd., 2001) göre yapılmıştır. Değerlendirme sonucu, FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının model kromozom sayılarının uluslararası adlandırma sistemleri ile uyumlu olduğu ($2n=60$) saptanmıştır (Şekil 4.17) (Melander, 1957). FBTEC hücre hattı 60. pasaja kadar çoğalması devam ettiği ve popülasyon ikiye katlanma zamanı düştüğü için karyotipinde herhangi değişim olup olmadığının kontrolü için tekrar yapılmıştır ve kromozom sıklığı çeşitliliğinin artarak daha heterojen bir yapıya dönüştüğü görülmüştür (Şekil 4.17). Karyotip kromozom sıklığı 5. pasajda 48-50 arasında iken 60. pasajda 38-78 arasında geniş bir aralıkta dağılım göstermiştir. Macpherson ve Stoker'da BHK 21 hücresinin izolasyonunu takiben yaptıkları 65-70 günlük uzun süreli pasajlardan sonra çoğalmanın hızlandığını ama karyotipinin değişmediğini görmüşlerdir (Macpherson ve Stoker, 1962). Bizim çalışmamızda da FBTEC

hücre hattının uzun süreli pasajlanmalarına rağmen karyotipinin değişmediği yine model kromozom sayısının $2n=60$ olduğu görülmüştür. Ancak, kromozom sayısı 60 olan metafaz plağı oranının hücre pasajı 60'da hücre pasajı 5'e göre %60 oranında düşüş gösterdiği görülmüştür.

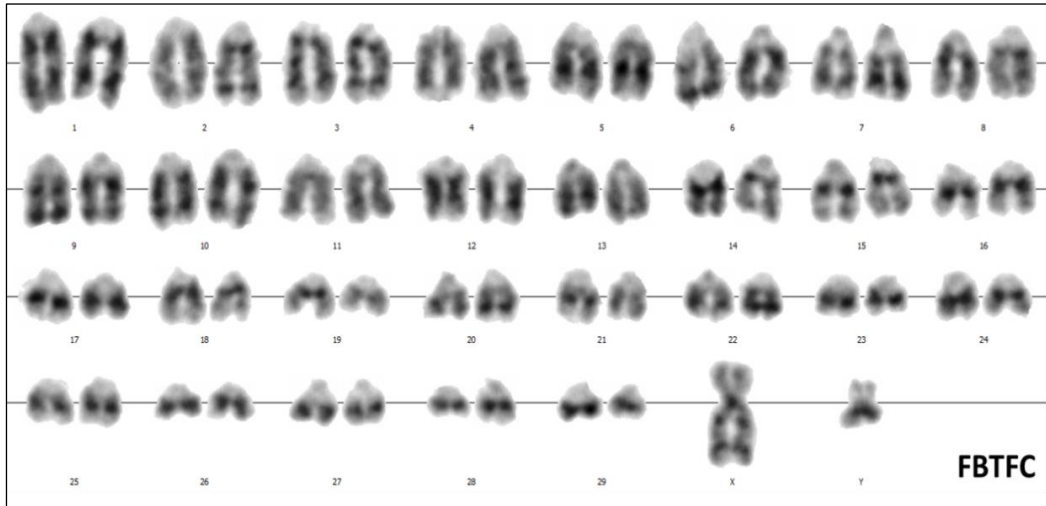
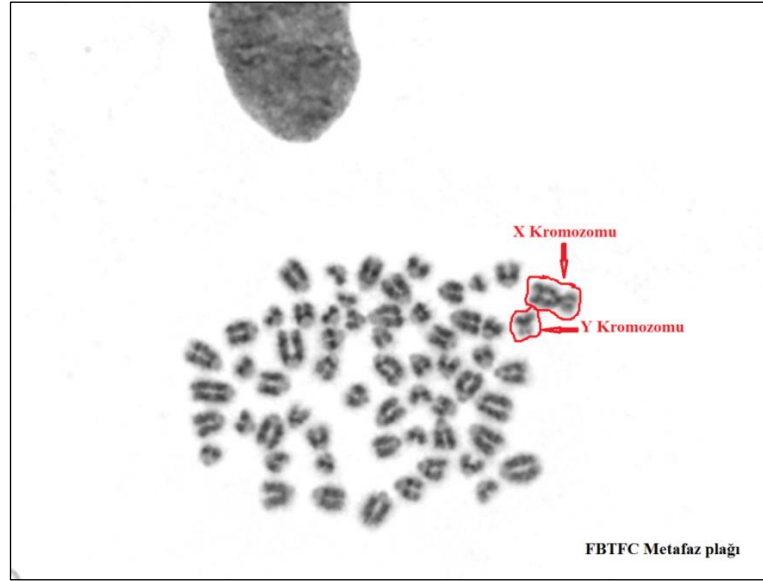


Şekil 4. 17. FBTEC 5.pasajda (P5), FBTFC 5. ve 60. pasajda (P60) 50 adet metafaz plağında kromozom dağılımları ve karyotipi.

Kromozom morfolojileri de yine uluslararası adlandırma sistemlerine uygun olarak ve Di Berardino ve arkadaşlarının (1989), evcil hayvanların uluslararası sitogenetik çalışmasıyla uyumlu bulunmuştur. Hem FBTEC hücre hattı hem de FBTFC hücre hattında 29 çift akrosentrik otozomal kromozom ve bir çift submetasentrik eşey kromozom olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18) (Şekil 4.19). Bu sonuçlar her iki hücre hattının da tür orijininin sığır olduğunu doğrulamıştır. Kromozom numaralandırması ve eşleştirmesinde, G-bantlama ve kromozom büyüklük sıralaması dikkate alınarak, en büyük kromozom olan 1 nolu kromozomdan en küçük kromozom olan 29 nolu kromozoma kadar sırayla yapılmıştır (Iannuzzi, 1990).



Şekil 4. 18. FBTEC hücre hattının 5. pasajdaki metafaz plağı ve karyotipi. En büyük kromozom 1 nolu kromozom, en küçük kromozom da Y kromozomudur. Bütün otozomal kromozomlar akrosentrik olup, X ve Y kromozomları da tipik olarak submetasentriktir, ($2n=60$).

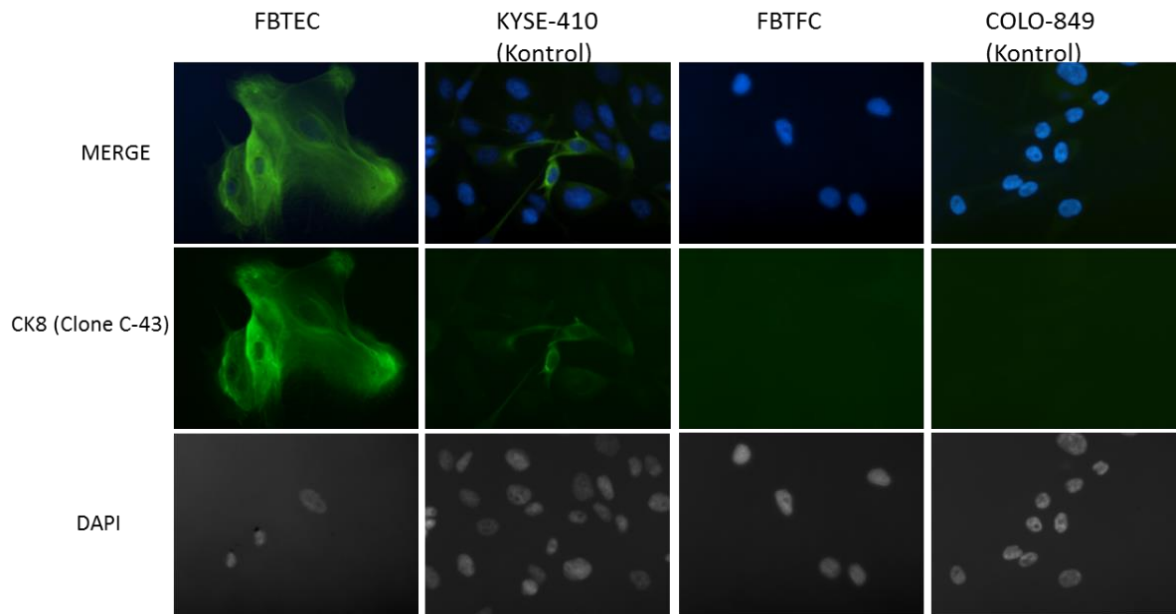


Şekil 4. 19. FBTEC hücre hattının 5. pasajdaki metafaz plağı ve karyotipi. En büyük kromozom 1 nolu kromozom, en küçük kromozom da Y kromozomudur. Bütün otozomal kromozomlar akrosentrik olup, X ve Y kromozomları da tipik olarak submetasentriktir, ($2n=60$).

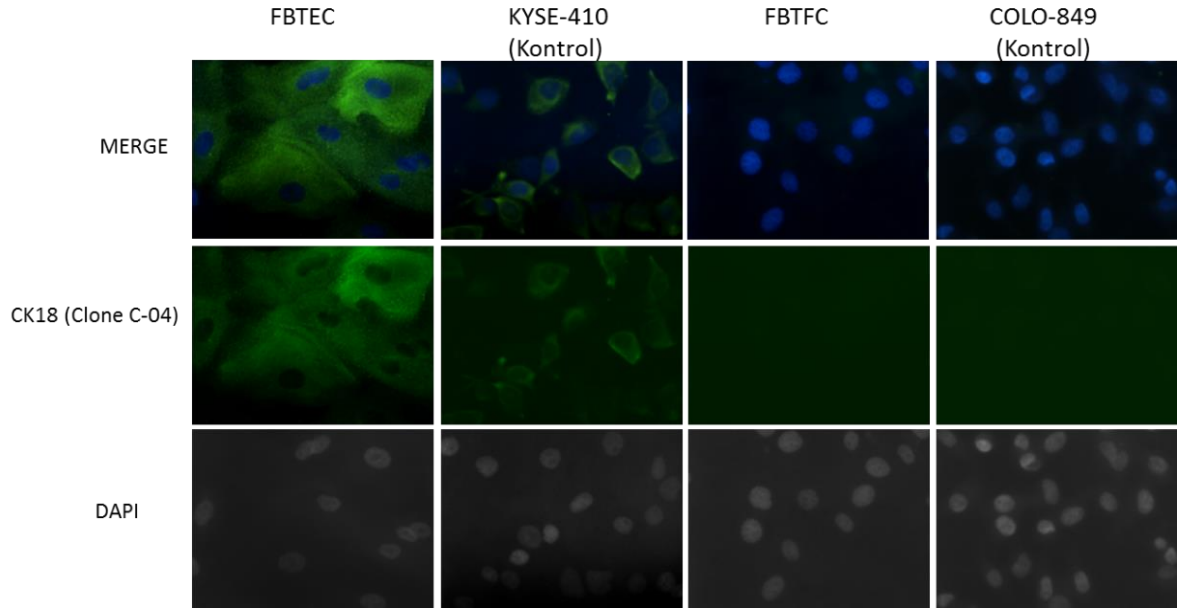
4.6. FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarının İmmünoboyama Sonuçları

FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının doku orjinlerinin doğrulanması için immünoboyama yöntemi kullanılmıştır. İmmünoboyama fikse edilmiş hücrelerde veya dokularda hedef proteinlerin lokalizasyonunu, nispi ekspresyon ve aktivasyon durumlarını incelemek için antikorlar ve floresan işaretli belirteçlerden yararlanılan oldukça elverişli ve yaygın kullanımı olan bir immünohistokimya yöntemidir. Bu yöntemde temel amaç hücrelerin yapısının ve içeriğinin korunarak incelenmesidir.

Bu çalışmada immünoboyama için sitokeratin filament tipi belirlenirken, insan ve sığır dokuları tarafından ifade edilen keratinlerin elektrik yükü, boyut ve immünoaktivite bakımından çok benzer olduğu dikkate alınarak FBTEC hücre hattının doku orjininin epitelyal olduğunu göstermek amacıyla CK8 ve onun asidik partneri olan CK18 seçilmiştir (Bragulla ve Homberger, 2009). Bu sitokeratinler embriyonun basit epitelindeki primer keratinler olup, insan fötüsünün dilinde ve bukkal mukozasında 27. haftaya kadar ifade edildikleri Vaidya ve arkadaşları (2000) tarafından gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan sığır fötüsünün de 18-20 haftalık olması nedeniyle doku orjini doğrulaması için CK8 ve CK18 keratinleri seçilmiştir. İmmünoboyama sonuçlarında da FBTEC hücreleri CK8 ve CK18 için pozitif olarak bulunurken, FBTFC hücreleri negatif bulunmuş ve bu sonuçlar FBTEC hücre hattının epitel doku orijinli olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.20, Şekil 4.21).

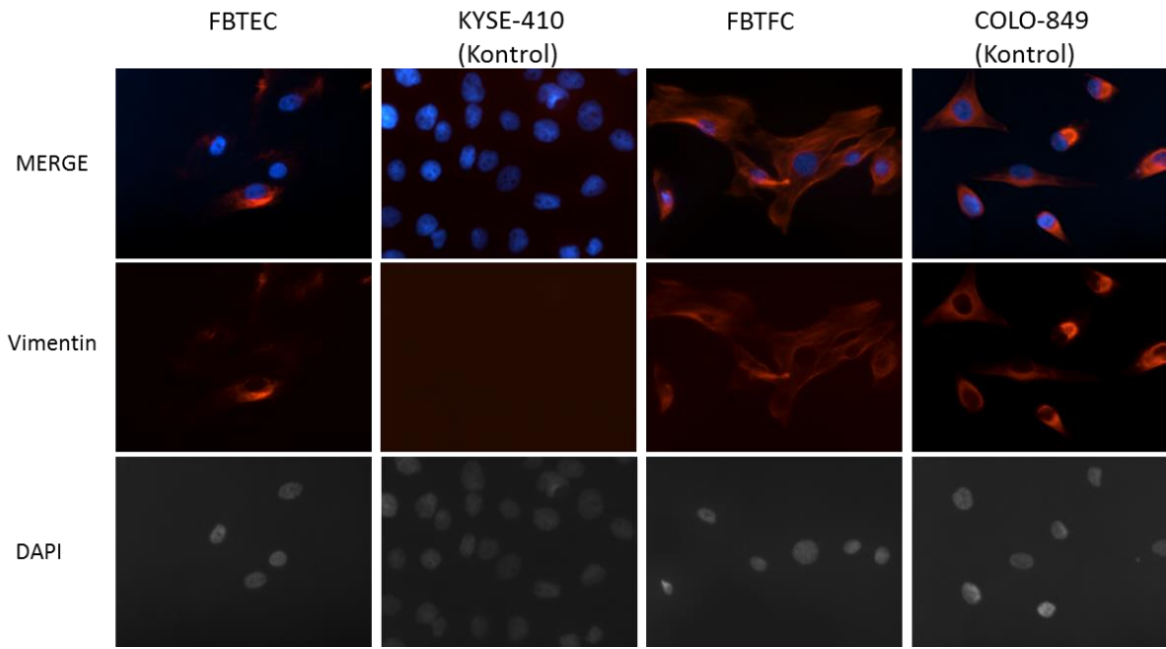


Şekil 4. 20. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının ve kontrol grubu hücre hatlarının sitokeratin 8 (CK8) intermediyer filamentleri için immünoboyaması. FBTEC ve pozitif kontrol hücresi KYSE-410 pozitif. FBTFC ve negatif kontrol hücresi COLO-849 negatif (Büyütme: x400).



Şekil 4. 21. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının ve kontrol grubu hücre hatlarının sitokeratin 18 (CK18) intermediyer filamentleri için immünoboyaması. FBTEC ve pozitif kontrol hücresi KYSE-410 pozitif. FBTFC ve negatif kontrol hücresi COLO-849 negatif (Büyütme: x400).

FBTFC hücre hattının doku orjininin fibroblast olduğunu göstermek amacıyla fibroblast hücreler için spesifik olan vimentin intermediyer filament proteini seçilmiştir. Vimentin (Vim) proteini mezenkimal kökenli hücrelerde bulunmasına rağmen, embriyonik gelişim sırasında epitel hücreleri ve nöronlar gibi mezenkimal olmayan hücre tiplerinde de bulunmaktadır (Velez-delValle vd., 2016). Ayrıca kültüre edilmiş epitel hücrelerinde de varlığı gösterilmiştir (SundarRaj vd., 1992). Bizim çalışmamızda da FBTFC hücreleri ve vimentin proteini için pozitif kontrol olan COLO-849 fibroblast hücrelerinde vimentin pozitif iken, FBTEC hücrelerinde de zayıf olmakla birlikte pozitif olup, atıfta bulunulan çalışmalarla uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Vimentin için negatif kontrol olan KYSE-410 epitel hücrelerinde negatif bulunmuştur ve bu sonuçlar FBTFC hücre hattının fibroblastik hücre olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.22).

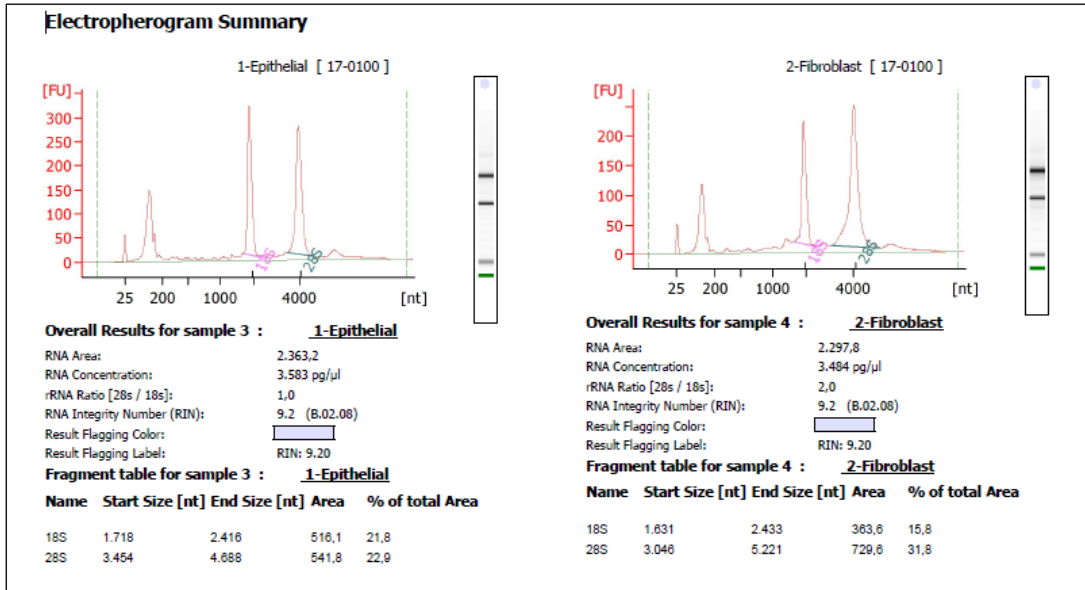


Şekil 4. 22. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının ve kontrol grubu hücre hatlarının vimentin intermediyer filamentleri için immünoboyaması. FBTFC ve pozitif kontrol hücresi COLO-849 pozitif. FBTEC kısmen pozitif ve negatif kontrol hücresi KYSE-410 negatif (Büyütme: x400).

4.7. Transkriptom Analizi İle FBTEC ve FBTFC Hücre Hatlarının Tür Orijini, Doku Orijini Ve Şap Virüsü Hücre Reseptörleri İfadesinin Sonuçları

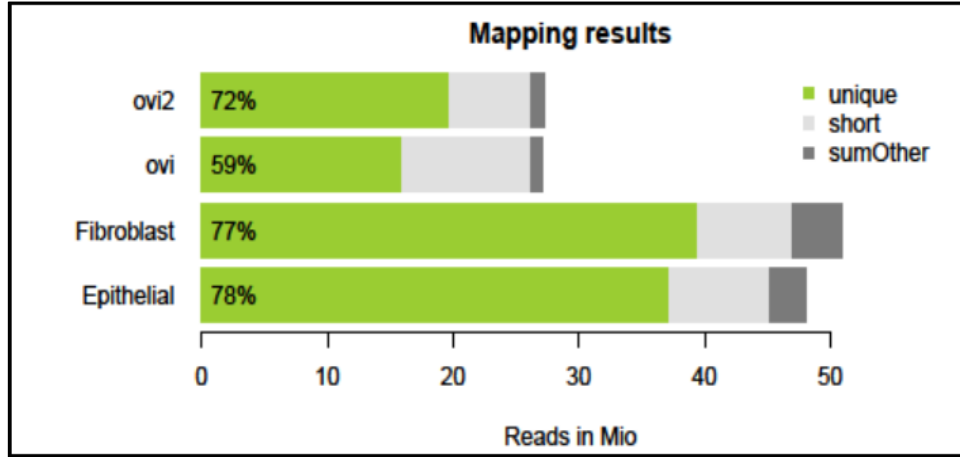
RNA dizileme, standart gen mikro-arrayları kullanılarak saptanamayacak kadar düşük seviyelerde ifade edilen transkriptlerin tanımlanması için yüksek bir duyarlılıkla transkript bolluğuna dayalı diferansiyel gen ekspresyon profillerinin analizine izin verir (Werner, 2010). Bu nedenle transkriptom analizi ile FBTEC ve FBTFC hücre hatlarının tür ve doku orjinlerinin doğrulanması imkanı sağlanmıştır.

RNA moleküllerinin bütünlüğü, RNA ekstraksiyonundaki gen ekspresyonunun anlık görüntüsünü yansıtmaya çalışan deneyler için büyük önem taşır. Sağlıklı bir çalışma için rRNA oranlarını ve RNA bütünlüğünü ifade eden RIN değerinin 8 üzerinde ($RIN \geq 8$) olması beklenir (Schroeder vd., 2006). Bizim çalışmamızda da her iki hücre hattının RNA örneklerinin rRNA oranları (28S/18S) ve bütünlüğü RNAseq için uygun görülen değerlerde bulunmuş olup, FBTEC ve FBTFC hücrelerinin her ikisi için de 9,2'dir. rRNA oranları da çalışmada izole edilen RNA'ların bütünlüğünün korunduğunu (28S rRNA > 18S rRNA) göstermiştir (Şekil 4.23).



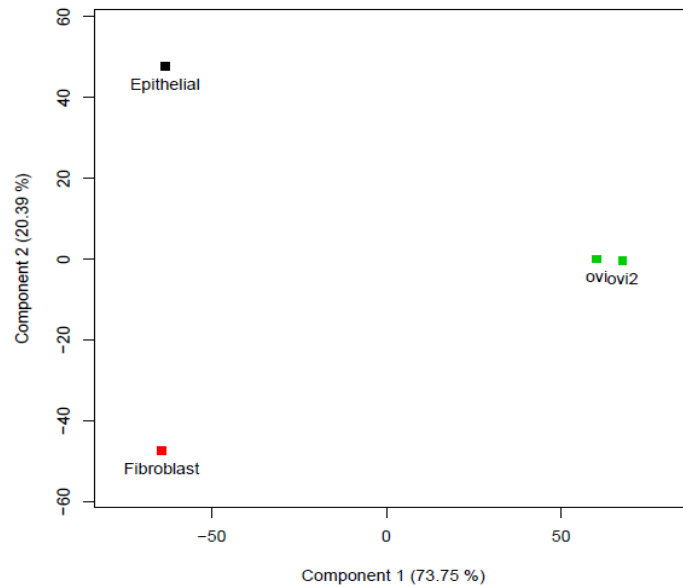
Şekil 4. 23. FBTEC (Epitelyal) ve FBTEC (Fibroblast) hücre örneklerinin elektroferogram görüntüleri.

Yeni nesil dizileme ile yapılan RNAseq analizinden elde edilen okumalar sığır genomuna [(Ensembl (87_bt)] eşleştirilmiş ve verilerin normalizasyonu EMBL-EBI (The European Molecular Biology Laboratory-The European Bioinformatics Institute) den alınan verilerle (E.GEOD-74612) yapılmıştır. Bu çalışmanın verileri Ovi1 hücreleri (gebe olmayan sığır yumurtalığının epitel dokusundan) ve Ovi2 hücrelerinin (gebe sığır yumurtalığının epitel dokusundan) RNAseq verilerine aittir. Bizim çalışmamızda, FBTEC ve FBTEC hücrelerinin her biri için toplamda 48-50 milyon okuma elde edilmiştir. Bu okumalarda, örnek başına %77-78 oranında eşsiz haritalanmış okumalar elde edilmiş ve böylece hücre hatlarının sığır orjinli olduğu da RNAseq ile tekrar doğrulanmıştır. Ayrıca bu oranlar, sekans verilerinin normalizasyonunda kullanılan sığır yumurtalık epitelinden elde edilen Ovi1 ve Ovi2 hücrelerinin RNAseq verisi ile karşılaştırıldığında yüksek oranlar olup, küresel gen ifade profillerini analiz etmek için oldukça uygun oranlardır (Şekil 4.24) (Maillo vd., 2015).



Şekil 4. 24. FBTEC (fibroblast) ve FBTEC (epitelyal) örneklerinin mRNA dizilemesi için uyum verimliliği. RNA sekanslamasından elde edilen diziler sığır genomuna (87_bt) eşlenmiş ve verilerin normalizasyonu ovi1 ve ovi2 hücrelerinin (E.GEOD-74612) RNAseqverileri ile yapılmıştır. Örneklerin açıklamalı gen bölgelerinde; yeşil bölge, eşsiz eşlemeli okumaların yüzdesi; açık gri bölge, eşleşme için çok kısa olan dizilerin yüzdesi; koyu gri bölge: benzersiz şekilde hizalanamayan diziler.

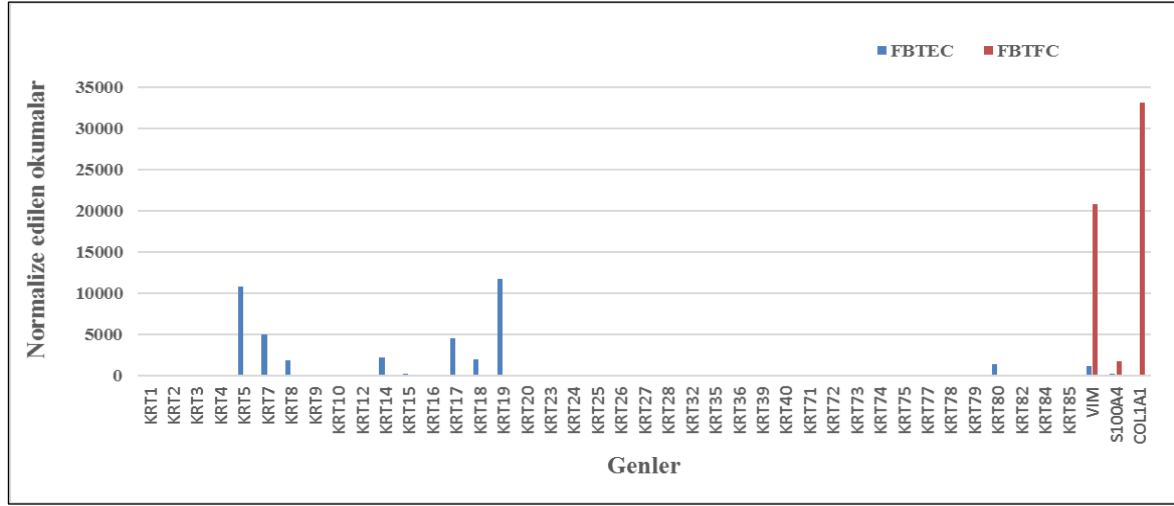
FBTEC ve FBTEC hücre hatlarının ve sığır ovidukt epitel hücreleri Ovi1 ve Ovi2'nin RNAseq veri setleriyle birlikte oluşturulan Ana Bileşen Analiz (PCA) grafiğinde, FBTEC ve FBTEC örneklerinin transkriptomlarının hem birbirlerine göre konumlanmalarından dolayı kolayca ayırt edilebildiği hem de yayınlanmış numuneler olan Ovi1 ve Ovi2 den kolayca ayırt edilebildiği ve farklı konumlandıkları görülmüştür (Şekil 4.25) (Maillo vd., 2015). Maillo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, gebe ve gebe olmayan sığırın ovidukt epitelinden elde edilen kültür, primer kültür aşamasında olduğu ve RNAseq verileri de bu karışık kültüre ait olduğu için bu hücrelerin PCA grafiğinde konumlandıkları bölge FBTEC ve FBTEC arasında olduğunu düşündürmüştür. Bu da FBTEC hücrelerinin epitel olarak, FBTEC hücrelerinin de fibroblast olarak saflaştıklarının ayrı bir göstergesi olmuştur.



Şekil 4. 25. FBTEC (fibroblast) ve FBTEC (epitelyal) örneklerinden elde edilen mRNA dizilimi verilerinin ve yayınlanmış veriler olan Ovi1 ve Ovi2 ile PCA analiz grafiği.

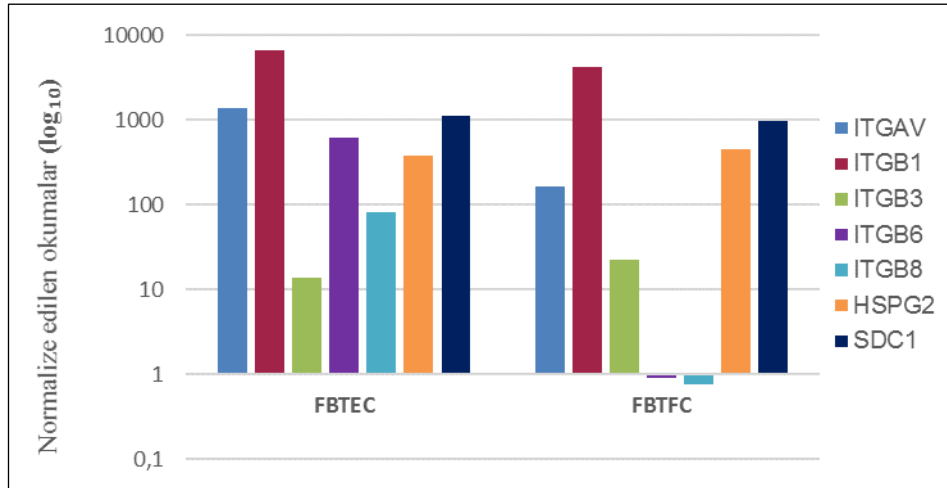
RNA-seq verileri transkriptoma ait olması nedeniyle hücrelerin doku orijinin doğrulamasında da daha geniş profilde değerlendirme imkanı sağlamıştır. Epitelyal ve fibroblastik hücreler için spesifik olan intermediyer filamentlere ait gen ifadeleri incelenmiş ve immünoboyama sonuçlarında olduğu gibi RNAseq sonuçları da epitelyal ve fibroblastik hücelere özgü intermediyer filament proteinlerinin bu hücre hatlarında ifade edildiğini doğrulamıştır. Epitelyal hücreler için spesifik olan keratinlerden, Keratin (KRT) 5, KRT7, KRT8, KRT14, KRT17, KRT18, KRT19 ve KRT80'nin FBTEC hücre hattında, FBTEC ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek seviyelerde ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.20). İnsan ve sığır dokuları tarafından ifade edilen keratinlerin elektrik yükü, ebat ve immünoaktivite bakımından çok benzer olduğu dikkate alındığında, Vaidya ve arkadaşlarının (2000) insan fötüs dili ile yaptıkları çalışmada, 20 haftalık fötüste özellikle KRT5, KRT8, KRT18 ve KRT19 un oldukça yüksek oranlarda ifade edildiği görülmektedir (Bragulla ve Homberger, 2009). Bu da bizim çalışmamızın RNAseq bulgularını doğrulamaktadır. Fibroblastik hücreler için spesifik olan, vimentin (VIM) proteini, fibroblast spesifik protein/kalsiyum bağlama proteini (S100A4) ve kollajen tip 1 alfa1 zinciri (COL1A1), FBTEC hücre hattında, FBTEC hücre hattı ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek seviyelerde ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.26). Bununla birlikte, vimentin FBTEC hücre hattında az miktarda da olsa ifade edildiği görülmüştür. Bu durum, immünoboyama sonuçlarının değerlendirmesinde olduğu gibi, vimentin intermediyer

filament proteininin hücre göçü ile bağlantılı olması nedeniyle kültüre edilmiş bazı epitel hücrelerinde de görülebilen ihtimali ile uyumlu olduğunu göstermektedir (Velez-delValle vd., 2016).



Şekil 4. 26. RNAseq ile epitelyal ve fibroblastik doku proteinlerinin gen ifadeleri.

RNAseq verileri, yeni her iki hücre hattında şap virüsü hücrel reseptörlerinin gen ifadesi yönünden de değerlendirme imkanı sunmuştur. Daha önce literatür bilgisinde de belirtildiği şekilde, günümüzde şap virüsü hücrel reseptörleri olarak integrinler ve HSPGs tanımlanmıştır. İntegrin ailesinden şimdilik en az 4 tanesi ($\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta6$, $\alpha\beta8$) şap virüsü hücrel reseptörü olarak bilinmektedir. HSPGs geniş bir protein ailesi olup ve aileyede adını veren HSPG, şap virüsü hücrel reseptörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca HSPGs'in alt aile gruplarından olan sindekan grubundan, sindekan-1'in $\beta1$ integrinlerle, $\alpha\beta3$ integrin ve $\alpha\beta5$ integrin ile olan etkileşimlerinin olması, Shi ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada, bir RNA virüsü olan hepatit C virüsü için temel reseptör olarak görev aldığı gösterilmiş olması, sindekan-1'in de şap virüsü hücrel reseptörü aday olabileceğini düşündürmüştü ve ileriye dönük çalışmalara fikir vermesi açısından, her iki yeni hücre hattında da diğer şap virüsü hücrel reseptörlerine ilaveten sindekan-1'in de gen ifadesi incelenmiştir (Şekil 4.27) (Roper vd., 2012).

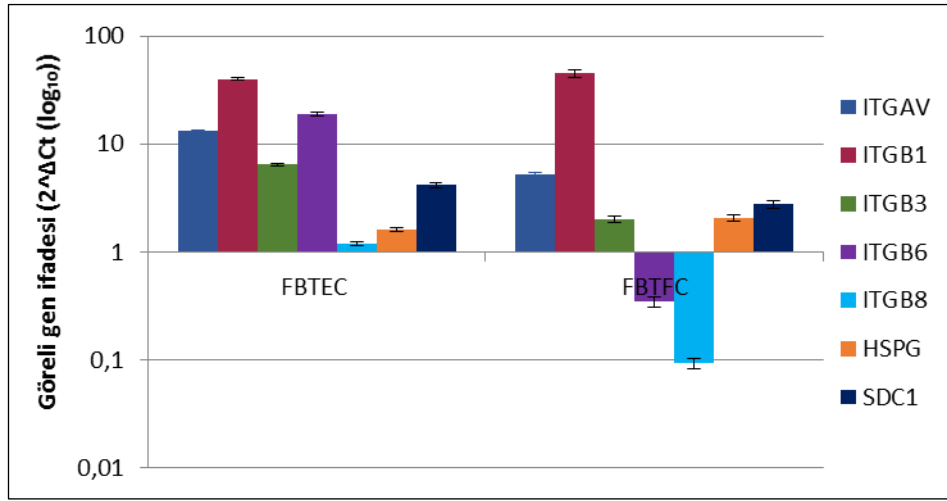


Şekil 4. 27. FBTEC ve FBTFC hücre hatlarında şap virüsü hücre reseptörlerinin RNA sekanslama ile gen ifadesi sonuçları.

Gen ifadeleri sonuçları da göstermiştir ki, her iki yeni hücre hattında da şap virüsü hücre reseptörleri ifade edilmektedir. FBTEC hücre hattında bütün reseptörler ifade edilirken FBTFC hücre hattında da integrin $\beta 6$ ve $\beta 8$ alt üniteleri haricindeki reseptörler FBTEC hücre hattındaki oranlarda ifade edilmiştir. İntegrin ve HSPG reseptörlerinin ifadesi qRT-PCR sonuçları ile de doğrulanmış ve RNAseq analizi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle şap virüsü hücre reseptörlerinin tartışması qRT-PCR sonuçları ile birlikte yapılacaktır.

4.8. Şap Virüsü Hücre Reseptörleri İçin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

RNAseq'de kullanılan RNA örnekleri qRT-PCR için de kullanılmış ve böylece iki test arasında bağıntı kurma kolaylığı sağlanmıştır. Şap virüsü hücre reseptörleri olarak da yine RNAseq'de kullanılan aynı reseptör grupları seçilmiş ve sonuçlar RNAseq verileriyle uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.28). İntegrin αV , $\beta 1$, $\beta 3$ alt üniteleri, HSPG2 ve SDC1'in hem FBTEC hem de FBTFC hücre hattında ifade olduğu görülmüştür. İntegrin $\beta 6$ ve $\beta 8$ alt üniteleri FBTFC hücre hattında ifade edilmezken FBTEC hücre hattında da diğer alt ünitelere göre daha az olmakla birlikte ifade edilmiştir. Bu veriler RNAseq ve qRT-PCR sonuçlarının birbirini doğruladığını göstermektedir.



Şekil 4. 28. FBTEC ve FBTEC hücre hatlarında şap virüsü hücre reseptörlerinin qRT-PCR ile ifade sonuçları.

Monaghan ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada, hedef doku epitel hücrelerinde $\alpha\beta6$ ve $\alpha\beta3$ 'ü immüno Floresan konfokal mikroskop ve RT-PCR ile görüntülemişler ve doğal enfeksiyon sırasında epitel hücrelerinin $\alpha\beta6$ 'yı ifade ederken $\alpha\beta3$ 'ü ifade etmediğini belirtmişlerdir. $\alpha\beta6$ sadece epitel hücrelerinde (makula densa, endometrial, dil epiteli ve tükürük bezi hücrelerinde) ifade edilmekle birlikte, miktarı farklı hücre türlerinde çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, deride ve akciğer epitel hücrelerinde az ifade edilir (Wang vd., 2015). Bizim çalışmamızda da dilin üst doku tabakaları kullanılmış ve elde edilen epitel hücrelerinde Monaghan ve arkadaşlarının (2005) $\alpha\beta6$ için belirttikleri şekilde yüksek oranda ifade edildiğini, ancak $\alpha\beta3$ için belirttiklerinin aksine $\alpha\beta3$ 'ünde epitel hücrelerinde de ifade olduğu görülmüştür. Fibroblast hücrelerinde ise integrin $\alpha\beta6$ 'nın alt ünitesi $\beta6$ ve $\alpha\beta8$ 'in $\beta8$ alt ünitesi ifade olmazken $\alpha\beta3$ 'ün ifade olduğu görülmüştür. Ayrıca, $\alpha\beta6$ ve $\alpha\beta3$ fibroblast bir hücre hattı olmasına rağmen BHK 21 hücresinde benzer miktarlarda ifade edildiği Yılmaz ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir (Yılmaz vd., 2019). Yine Yılmaz ve Akay'ın yaptıkları çalışmada (2005) BHK 21 hücresinin süspanse kültürlerinde $\alpha\beta3$ 'ün oldukça yüksek oranda ifade edildiğini Western blot tekniği ile göstermişlerdir.

Neff ve arkadaşları (2001), $\alpha\beta3$ 'ün hedef epitel hücrelerini enfekte etmede doku tropizmi için temel reseptör olmadığını ancak $\alpha\beta3$ 'ün virüsün hücre içine alınmasında rol oynayabileceğini belirtirmişlerdir. Bu durumda diğer hücre yüzey moleküllerinin virüsün hücre içine alınmasında yardımcı reseptör olarak görev alabildiğini ve birçok çalışmada da

HSPG'nin, FMDV için yedek yada yardımcı bir reseptör veya virüs enfeksiyonundan sonra hücrelere giriş için alternatif bir yol olabileceği gösterilmiştir (Wang vd., 2015). Bu tez çalışmasında da FBTEC ve FBTFC hücre hatlarında, özellikle *in vitro*'da şap virüsünün hücre içine alınmasında yardımcı ve etkili reseptör olan HSPG'nin yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca HSPGs ailesinden olan Sindekan 1'in epitel ve plazma hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilmesine rağmen bizim çalışmamızda fibroblast hücre hattı olan FBTFC'de kaydedeğer oranda ifade edilmesi de önem arzeden bir bulgu olmuştur (Afratis, 2017).

4.9. Şap Virüsü Laboratuvar Suşlarının FBTEC ve FBTFC Hücre Hatlarında Enfektivite Süresi Tayini

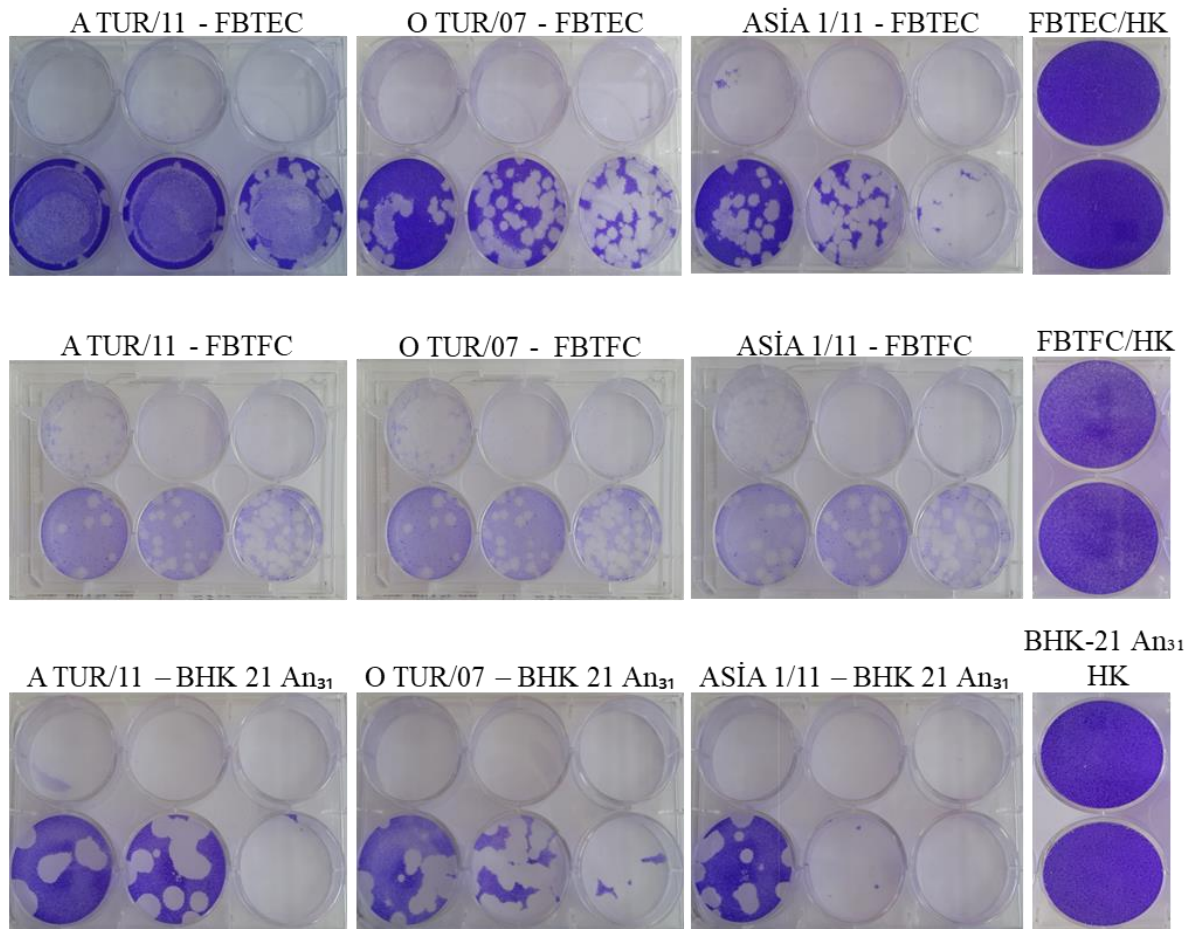
Çalışmada kullanılan şap virüsleri BHK 21 An₃₁ tek tabaka hücre kültüründe adaptasyonu yapılan laboratuvar suşlarıdır. Şap virüsü BHK 21 hücre kültüründe ortalama 18-24 saatte %90-%100 oranında CPE oluşturur (Capstick vd., 1965). Bizim çalışmamızda da şap virüsü serotipleri FBTEC ve FBTFC hücrelerinde de 18-24 saat süreleri içinde %90 - %100 oranında CPE görülmüş ve süreler Capstick ve arkadaşlarının çalışması ile uyumluluk göstermiştir. Çalışma saatleri incelendiğinde FBTEC ve FBTFC hücrelerinin sonuçları BHK 21 An₃₁ hücresi ile de uyumlu olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattındaki çalışma süreleri.

HÜCRE ADI	VİRÜS ADI	VİRÜS ENFEKTİVİTE SÜRESİ		
		1.Çalışma (pasaj 5)	2.Çalışma (pasaj 7)	3.Çalışma (pasaj 10)
FBTEC	ATUR/11	18.5 saat	18 saat	18 saat
	OTUR/07	18.5 saat	18 saat	18 saat
	ASİA1/11	18.5 saat	18 saat	18 saat
		(Pasaj 5)	(Pasaj 15)	(Pasaj 20)
FBTFC	ATUR/11	18 saat	17 saat	18 saat
	OTUR/07	19 saat	20 saat	20 saat
	ASİA1/11	19 saat	20 saat	20 saat
		(Pasaj 20)	(Pasaj 20)	(Pasaj20)
BHK-21 An ₃₁ (kontrol grubu)	ATUR/11	19 saat	18 saat	18 saat
	OTUR/07	19 saat	18 saat	18 saat
	ASİA1/11	19 saat	18 saat	18 saat

4.10. FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarından Şap Virüsü Laboratuvar Suşlarının Plak Test İle Enfektivite Titrelerinin Tayini

Plak testte, FMD aş1 virüslerinin FBTEC ve FBTEC hücre hatlarında çalışma süresinin tayininde olduğu gibi yine BHK 21 An₃₁ tek tabaka hücre kültüründe adaptasyonu yapılan aynı laboratuvar suşları olan ATUR/11, OTUR/07 ve ASİA1/11 kullanılmıştır. Yeni hücre hatları olan FBTEC, FBTEC ve kontrol grubu hücre hattı olan BHK 21 An₃₁ hücre hattı ile yapılan plak test sonucunda elde edilen plak morfolojileri ve plakların sayısına bağlı olarak hesaplanan enfektivite titre değerleri grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.29) (Çizelge 4.2). Enfektivite değerlerinin grafiğe aktarılmasında plak oluşumlarından dolayı ya da hücrelerin tamamen dökülmesinden dolayı plak sayımında zorluk çekilen gözlerde enfektivite değeri 8 pfu ve üzeri olan değerler 8 pfu olarak alınmıştır (Şekil 4.30).

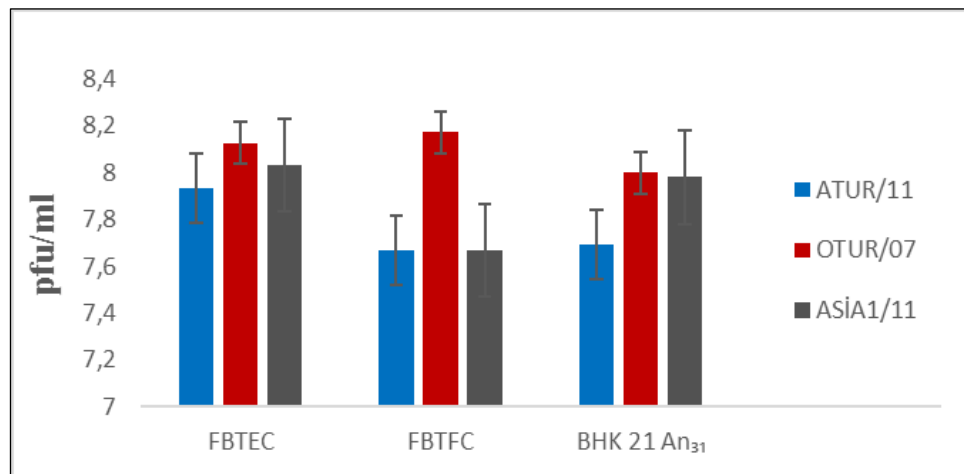


Şekil 4. 29. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTEC hücre hattı ve kotrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattındaki plak morfolojileri.

Sahadan izole edilen şap virüsleri normalde büyük plak karakterindedir (Cowan ve vd., 1974). Ancak plak tekniği ile yapılan testlerde, doğal ve adapte virüslerin hem birbirlerine göre hem de *in vitro* da hücre tiplerine göre farklılıklar gösterdikleri görülmüştür. Bu nedenle de bir hücre kültürüne adapte ve adapte olmayan aynı virüslerin plak morfolojilerinde farklılıklar görülebilir (Sütçü, 1986). Bu çalışmada da her üç şap virüsü serotipinin FBTEC ve FBTFÇ hücre hatlarındaki plak morfolojileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre nispeten daha küçük ve orta plağın baskın olduğu orta-küçük plak karışımı olarak görülmüştür. Bunun da kullanılan şap virüsü serotiplerinin BHK 21 An₃₁ hücre hattına adapte suşlar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4. 2. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFÇ hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattındaki enfektivite titre değerleri tablosu.

HÜCRE ADI	VİRÜS ADI	ENFEKTİF TİTRE (PFU) Log ₁₀ /1,0 ml		
		1.Çalışma (pasaj 5)	2.Çalışma (pasaj 7)	3.Çalışma (pasaj 10)
FBTEC	ATUR/11	> 8	> 8	7,8
	OTUR/07	8,38	> 8	> 8
	ASİA1/11	> 8	8,1	> 8
		(Pasaj 5)	(Pasaj 15)	(Pasaj 20)
FBTFÇ	ATUR/11	> 8	8,6	6,4
	OTUR/07	8,62	8,5	7,4
	ASİA1/11	> 8	7,6	7,4
		(Pasaj 20)	(Pasaj 20)	(Pasaj 20)
BHK-21 An ₃₁ (kontrol grubu)	ATUR/11	> 8	> 8	7,08
	OTUR/07	> 8	> 8	8,0
	ASİA1/11	8,0	7,9	8,04



Şekil 4. 30. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFÇ hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hatlarına göre enfektivite titre grafiği.

Şap virüsü serotiplerinin enfektivite sonuçları, önce hücre hatları arasında, sonra da her hücre hattı sonuçları kendi içinde istatikselsel olarak değerlendirilmiştir. FBTEC (M=8.03, SD=0.15), FBTFc (M=7.83, SD=0.72) ve BHK 21 An₃₁ (M=7.89, SD=0.30) hücrelerinden elde edilen şap virüsü tiplerinin enfektivite titreleri, hücre tipleri ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (F=0.428, p=0.65). FBTEC hücre hattından elde edilen A tipi virüs (M=7.93, SD=0.11), O tipi virüs (M=8.13, SD=0.22) ve Asia1 tipi virüs (M=8.03, SD=0.06) karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (F=1.298, p=0.340). FBTFc hücrelerinden elde edilen A tipi virüs (M=7.66, SD=1.13), O tipi virüs (M=8.17, SD=0.67) ve Asia1 tipi virüs (M=7.66, SD=0.30) karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunmamıştır (F=0.419, p=0.676). Kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücrelerinde, A tipi virüs (M=7.69, SD=0.53), O tipi virüs (M=8.03, SD=0.05) ve Asia1 tipi virüs (M=7.98, SD=0.07) karşılaştırıldığında da yine anlamlı bir fark bulunmamıştır (F=1.035, p=0.411).

FBTEC ve FBTFc hücre hatlarından elde edilen şap virüsü serotiplerinin enfektivite titreleri kontrol grubu hücre hattı ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da özellikle O serotipinin enfektivitesinin FBTEC ve FBTFc hücre hattında BHK 21 An₃₁ hücre hattından nispeten yüksek olduğu görülmektedir. Duque ve Baxt, viral reseptör olarak α v integrinlerin tipe spesifik rollerini analiz etmek için yaptıkları çalışmada, klonlanmış sığır α V, β 1, β 3, β 5 ve β 6 integrin alt ünitelerini hücrelere transfekte etmişler ve şap virüsünün 3 adet serotip A suşu ve iki adet serotip O suşunun α V β 1, α V β 3, α V β 5 ve α V β 6 integrinlerini kullanma oranlarını karşılaştırmışlardır. Bütün virüsler, bu integrinleri ifade eden hücreleri enfekte edebilmelerine rağmen, integrinleri kullanma etkinliklerinde farklılar göstermişlerdir. Tüm A tipi virüsleri, göreceli olarak α V β 3 ve α V β 6'yı yüksek etkinlikte kullanırken, sadece bir virüs, orta derece etkinlikte α V β 1 kullanmıştır. Buna karşılık, her iki tip O virüsü de α V β 6 ve α V β 1 integrinleri α V β 3'ten daha yüksek etkinlikte kullanmışlardır. Sadece, her iki serotip ile enfekte olmuş ve α V β 5 ifade eden hücrelerde, düşük viral replikasyon seviyeleri tespit edilmiştir (Duque ve Baxt, 2003). α V β 5 integrinin az kullanılması, Jackson ve arkadaşlarının α 5 β 1 ve α V β 5'in şap virüsü için reseptör olmadığını vurgulamaları ile uyumaktadır (O'Donnell vd., 2005). Bu tez çalışmasında da, Duque ve Baxt'ın çalışmalarında hem A serotipi hem de O serotipi için ortak integrin olan α V β 1 integrin, FBTEC ve FBTFc hücre hatlarının her ikisinde de oldukça yüksek oranda ifade edilmiştir. α V β 6 integrin FBTEC hücre hattında kısmi olarak ifade edilmiş ve bu ifadeler de enfektivite titre değerleri ile uyumluluk göstermiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil

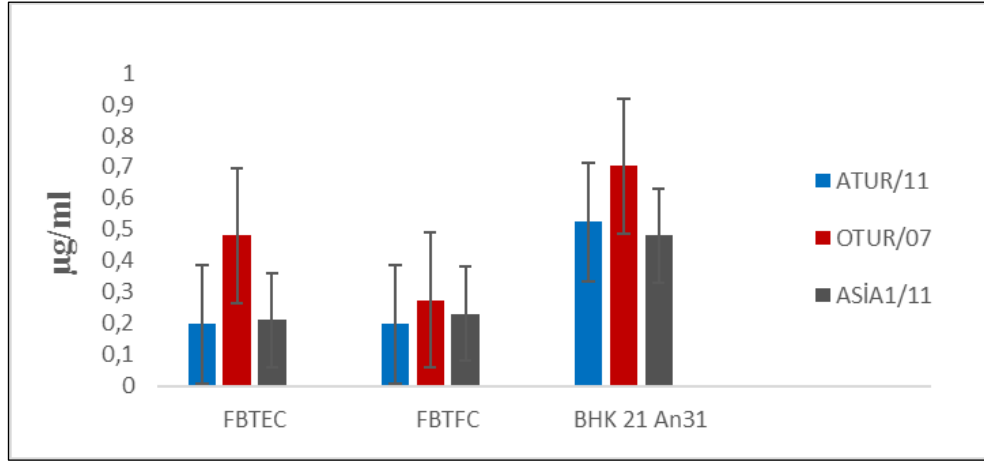
4.30). Yılmaz ve Akay'ın (2005) BHK 21 hücresinde A serotipi şap virüsü ve $\alpha\beta 3$ integrin ile yaptıkları çalışmada, A serotipi şap virüsünün enfektivite ve antijenite değerleri ile $\alpha\beta 3$ integrinin ekspresyonu arasında doğru orantı olduğu görülmüştür. Bizim çalışma bulgularımızda da şap virüsü A serotipinin afinitesinin yüksek olduğu belirtilen integrin $\alpha\beta 3$ 'ün yüksek oranda ifade edildiği FBTEC hücre hattındaki enfektivitesinde diğer serotiplere göre yüksek olduğu görülmüştür. Şap virüsü O serotipinin afinitesinin yüksek olduğu belirtilen integrin $\alpha\beta 1$ 'in de yüksek oranda ifade edildiği FBTEC hücre hattındaki enfektivitesinde diğer serotiplere göre yüksek olduğu görülmüştür.

4.11. FBTEC ve FBTEC Hücre Hatlarından Elde Edilen Şap Virüsü Laboratuvar Suşlarının 146S Antijenik Partikül Miktarlarının Tayini Sonuçları

146S antijenik partikülünün miktar tayininde de şap virüsünün enfektivite süresinin tespiti, plak test ve enfektivite titre tayininde olduğu gibi yine BHK 21 An₃₁ tek tabaka hücre kültüründe adaptasyonu yapılan aynı laboratuvar suşları olan ATUR/11, OTUR/07 ve ASIA1/11 kullanılmıştır. Hücre kültürlerine ekilerek toplanan her üç serotip virüsünde 146S antijenik partikül miktar tayinleri sukroz yoğunluk gradient santrifügasyon yöntemi ve sürekli akış UV spektrofotometre metodu ile ölçülerek hücre tiplerine göre gösterilmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.31).

Çizelge 4. 3. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTEC hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattındaki 146S antijenik partikül miktarları tablosu.

HÜCRE ADI	VİRÜS ADI	146S Partikülü (μg)		
		1.Çalışma (pasaj 5)	2.Çalışma (pasaj 7)	3.Çalışma (pasaj 10)
FBTEC	ATUR/11	0,21	0,18	0,14
	OTUR/07	0,44	0,51	0,19
	ASIA1/11	0,21	0,23	0,19
		(Pasaj 5)	(Pasaj 15)	(Pasaj 20)
FBTEC	ATUR/11	0,20	0,17	0,18
	OTUR/07	0,28	0,29	0,23
	ASIA1/11	0,21	0,11	0,12
		(Pasaj 20)	(Pasaj 20)	(Pasaj20)
BHK-21 An ₃₁ (kontrol grubu)	ATUR/11	0,41	0,48	0,68
	OTUR/07	0,83	0,51	0,47
	ASIA1/11	0,24	0,45	0,51



Şekil 4. 31. Şap virüsü serotiplerinin FBTEC hücre hattı, FBTFc hücre hattı ve kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hatlarına göre 146S antijenik partikül miktarları ($p < 0.05$).

Şap virüsü serotiplerinin 146S antijenik partikül miktarları yönünden hem sonuçların yorumlanması hem de istatistiksel değerlendirmesinde, öncelikle çalışmada kullanılan şap virüsü laboratuvar suşlarının, BHK 21 An₃₁ hücre hattına adapte virüsler olması nedeniyle bu hücre hattından elde edilen her üç şap virüsü tipinde 146S değerlerinin yüksek olması olağan ve beklenen bir sonuçtur (Sütçü, 1986). Bu bağlamda FBTEC ve FBTFc hücre hatları 146S yönünden değerlendirildiklerinde, FBTEC hücre hattından elde edilen A, O ve Asia1 tipi virüsleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, aralarında fark olduğu görülmüştür. ($F=118.983$, $p < 0.05$). O tipi virüsü ($M=0.48$, $SD=0.03$), A tipi virüsden ($M=0.20$, $SD=0.02$) ve Asia1 tipi virüs ($M=0.21$, $SD=0.02$) daha anlamlı bir düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. FBTFc hücre hattında da, A, O ve Asia1 tipi virüsleri karşılaştırıldığında 146S değerleri yönünden aralarında fark olduğu anlaşılmıştır ($F=15.148$, $p < 0.05$). O tipi virüsü ($M=0.27$, $SD=0.02$) ve A tipi virüs ($M=0.20$, $SD=0.02$) arasında anlamlı bir fark olduğu saptanırken, Asia1 tipi virüs ($M=0.22$, $SD=0.04$) ile iki tip virüs arasında bir fark saptanmamıştır.

146S antijenik partikül değerlerinde de enfektivite değerlerinde olduğu gibi hücre hatları arasındaki benzer orantısallık görülmüştür. Ancak kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattından elde edilen her üç tip şap virüsünün de 146S antijenik partikül oranları FBTEC ve FBTFc hücre hatlarından daha yüksek bulunmuştur. Bunun yukarıda bahsedildiği gibi her üç tip şap virüsünün de daha önce BHK 21 An₃₁ hücre hattına adapte olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna rağmen, Duque ve Baxt'ın (2003)

çalışmalarında hem A serotipi hem de O serotipi için ortak integrin olduğu belirtilen $\alpha V\beta 1$ integrinin, bu çalışmada bu integrinin alt ünitesi olan $\beta 1$ integrinin her iki hücrede yüksek oranda ifade edilmesi, O tipi şap virüsünün hem FBTEC hem de FBTFC hücre hattında diğer tiplere göre yüksek antijenik titreye sahip olmasını açıklamaktadır.

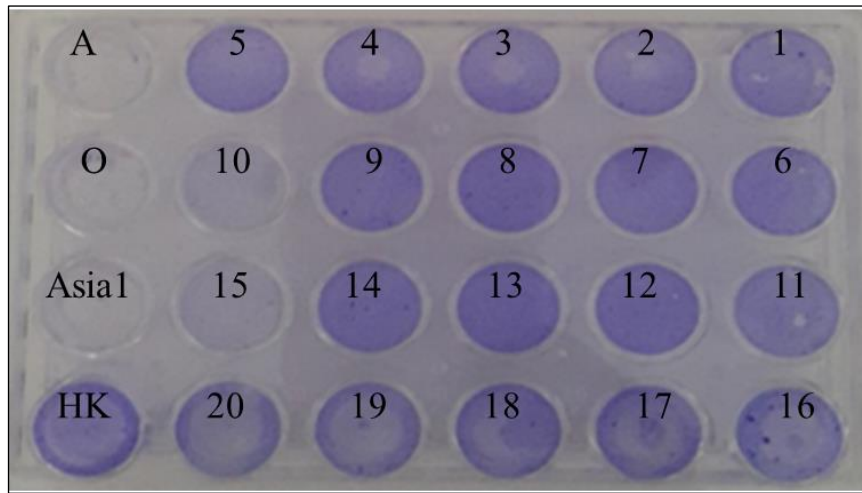
4.12. Hücre Pasajları Yapılan Saha Materyallerinde Çoklu qRT-PCR ile Şap Virüsü Serotiplerinin Değerlendirme Sonuçları

Şap Enstitüsünün saha örneklerinden, rutin teşhis çalışmalarında, daha önceden qRT-PCR'da pozitif bulunan ama BHK 21 An₃₁ hücre hattında yapılan pasajlarda negatif bulunan 20 adet saha örneği seçilmiştir. Bu örnekler FBTEC ve FBTFC hücre hatlarında 3 seri kör pasaj yapılmış ve 3. pasajda örnekler qRT-PCR yapılmış ve değerlendirmelerde 35 CT ve üzeri değerler negatif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.4). Ayrıca virüs CPE'lerini göstermek amacıyla da plak test yönteminde olduğu gibi FBTEC, FBTFC ve BHK 21 An₃₁ hücre hattının 3. pasajları sonrasında, kristal viyolet boyası ile boyanarak oluşan plaklar görüntülenmiştir (Şekil 4.32, Şekil.33, Şekil 4.34). Çalışmada BHK 21 An₃₁ hücre hattı da yine kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

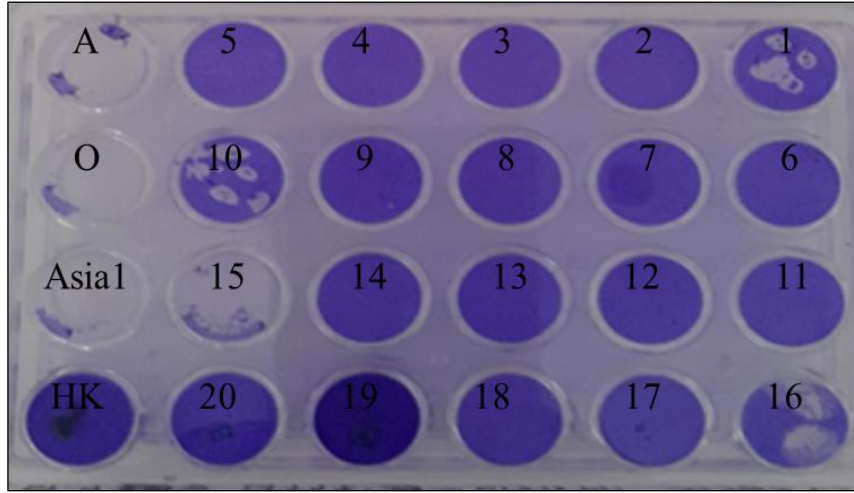
Çizelge 4. 4. Şap virüsü şüpheli saha örneklerinin FBTEC ve FBTFC hücre pasajları sonrası multiplex qRT-PCR sonuçları.

Saha materyali no	Hayvan türü	Doku tipi	Virüs serotipi (Direk saha materyalinden)	Virüs serotipi BHK 21 An ₃₁ hücre pasajı sonrası	Virüs serotipi FBTEC hücre pasajı sonrası	Virüs serotipi FBTFC hücre pasajı sonrası
1	Sığır	Epitel	A	Negatif		A
2	Sığır	Epitel	A	Negatif		
3	Sığır	Epitel	A	Negatif		
4	Sığır	Epitel	O	Negatif		
5	Sığır	Salya	O	Negatif		
6	Sığır	Epitel	A	Negatif		
7	Sığır	Epitel	O	Negatif		
8	Kuzu	Kalp	O	Negatif		
9	Oğlak	Kalp	O	Negatif		
10	Sığır	Epitel	O	Negatif	O	O
11	Sığır	Epitel	O	Negatif	O	
12	Sığır	Epitel	O	Negatif		
13	Sığır	Epitel	A	Negatif		
14	Sığır	Epitel	A	Negatif		
15	Sığır	Epitel	O	Negatif	O	O
16	Sığır	Epitel	O	Negatif		
17	Sığır	Kalp	O	Negatif		
18	Sığır	Epitel	A	Negatif		
19	Sığır	Epitel	A	Negatif		
20	Sığır	Epitel	A	Negatif		
A serotipi PK				14.71		
O serotipi PK				18.57		
Asia1 serotipi PK				18.37		

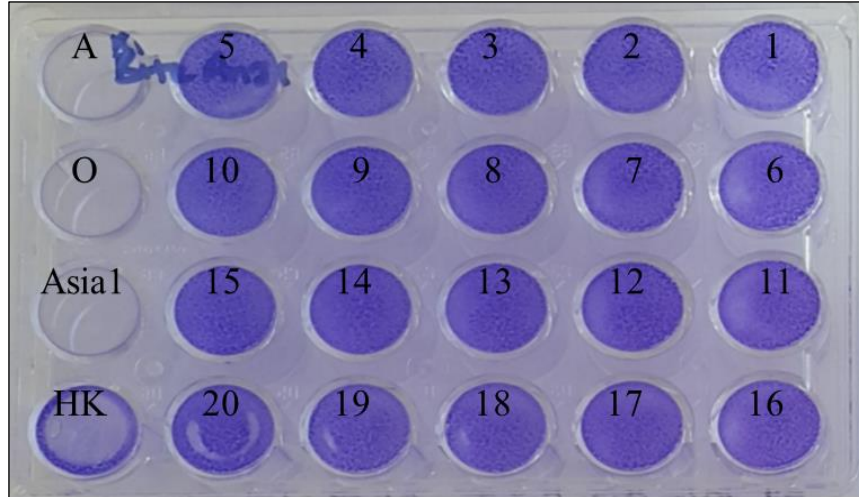
Her üç hücre hattında da pozitif kontrol virüsleri (serotip A, serotip O, serotip Asia1) üremiş, hücreleri tamamen enfekte ederek dökülmelerini sağlamış (Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34) ve qRT-PCR ile de pozitiflikleri tekrar doğrulanmıştır (Çizelge 4.4). Saha örneklerinden, FBTEC hücre hattında 10, 11 ve 15 nolu örnekler, FBTFEC hücre hattında da 1, 10 ve 15 nolu örneklerin olduğu gözlerde CPE gözlenirken, BHK 21 An₃₁ kontrol grubu hücre hattında ise hiçbir saha örneğinde CPE gözlenmemiş ve qRT-PCR sonuçlarında yine negatif bulunmuştur (Şekil 4.34 ve Çizelge 4.4). FBTEC ve FBTFEC hücre hatlarında üreyen saha örneklerinde, hem CPE (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33) gözlenmiş hemde qRT-PCR ile yapılan tiplendirmede daha önce tespit edilen virüs serotipleri yine aynı sonucu vermiştir (Çizelge 4.4). Saha örneklerinin hücreleri enfekte etmesi ve pozitifliğinin değerlendirilmesinde, hem CPE görülen hemde qRT-PCR da CT değeri 35 altında olanlar dikkate alınmıştır.



Şekil 4. 32. Saha virüslerinin FBTEC hücre hattında 3 seri pasajı sonrası kristal viyolet boyaması.



Şekil 4. 33. Saha virüslerinin FBTEC hücre hattında 3 seri pasajı sonrası kristal viyoleto boyaması.



Şekil 4. 34. Saha virüslerinin BHK 21 An₃₁ hücre hattında 3 seri pasajı sonrası kristal viyoleto boyaması.

Laboratuvar suşları ile yapılan çalışmalarda her iki yeni hücre hattı da 3 serotipe karşı duyarlı bulunmuştur. Saha virüsleri ile yapılan çalışmada ise BHK 21 An₃₁ hücre hattında negatif bulunan numunelerden, FBTEC hücre hattı ile 3 adet O serotipi, FBTEC hücre hattı ile de 2 adet O serotipi ve bir adet A serotipi pozitif bulunmuştur. Saha numunelerinde A ve O serotiplerinin bulunmasının nedeni mevcut durumda sahada Asia1 serotipinin seyretmemesidir. Stacey ve arkadaşlarının farklı kaynaklardan sağlanan ve içinde BHK 21 An₃₁ hücresinde bulunduğu 22 adet BHK 21 hücresinin şap virüsü tiplerine olan duyarlılıklarını da inceledikleri çalışmada, O1 Manisa ve A22 Mahmatlı şap virüsü tipleri

kullanılmıştır. Çalışmada, BHK 21 An₃₁ hücresinin A serotipine daha duyarlı olduğu görülmüştür (Stacey vd., 1998). Sa-Carvalho ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da (1997), şap virüsü serotip O'nun *in vitro*'da heparine bağlanan virüsleri seçtiğini ve heparin bağlayıcı fenotipli virüslerin doğal konakta zayıflatıldığını göstermişlerdir. Jackson ve arkadaşları da (1996) *in vitro*'da paraformaldehit ile fikse edilmiş hücrelerde, HPSG ile yarışacak olan heparin, heparin sülfat için rekabet eden trombosit faktör 4 ve HSPG'ları inhibe eden heparinaz gibi ajanları da inhibe ederek O serotipi şap virüsünün hücresel etkileşimini incelemiştir. Sonuçlar, şap virüsü O serotipinin hücrelere girmesinin karmaşık bir işlem olduğunu ve hücre yüzeyi ile ilk temasın heparin sülfat aracılığıyla yapıldığını göstermiştir. Bu iki çalışma da bizim bulgularımızı açıklar niteliktedir. Çünkü, bizim çalışmamızda da her iki yeni hücre hattında O tipi şap virüsünün afinite gösterdiği $\alpha\beta 1$ integrin ve heparin sülfat proteoglikan ailesinden olan HSPG2 ve sindekan 1 reseptörleri oldukça yüksek oranlarda ifade olmaktadır. Özellikle de pozitiflik sonuçlarında O serotipinin fazla olmasının nedeninin virüsün bu reseptörleri tercih etmiş olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu da bu hücre hatlarını O serotipi şap virüsü için daha seçici kıldığını göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar laboratuvar suşlarındaki enfektivite titre, antijenik titre sonuçlara ile de uyum göstermektedir ve O serotipi açısından alınan bu sonuçlar ayrı bir önem arz etmektedir. O serotipi dünyada baskın olan serotip olup, diğer serotiplere göre de prevalansı yüksektir. Bununla birlikte, O serotipinin yüksek prevalansı için henüz kesin bir genetik açıklama mevcut değildir (Mason vd., 2003; Saeed vd., 2015). Ayrıca O serotipi, serotipler arasında SAT2 ile birlikte en kararsız olan serotiptir (Doel vd., 1981). Bu kararsızlık, teşhisinde ve izolasyonunda da zorluklara neden olabildiğinden her iki yeni hücre hattının da O serotipine daha duyarlı olması ayrıca önemlidir.

Bir FMDV salgınında, etiyolojik ajanın hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması, klinik semptomlar göstermeyen hayvanlarda bile önemlidir. Antijenlerin, nükleik asitlerin veya viral enfektivitenin tespitine dayanan çeşitli teşhis yöntemleri şu anda mevcuttur, ancak şap virüsünün önemi göz önüne alındığında, bu teşhis yöntemleri genellikle tespit şansını arttırmak için eşzamanlı olarak uygulanır. Diğer metodolojilerden daha yavaş olmasına rağmen, virüs izolasyonu, sadece yüksek hassasiyeti nedeniyle değil aynı zamanda daha ileri çalışmalar için viral materyal temin ettiğinden dolayı da yeri doldurulamaz bir yöntemdir (Zabal ve Fondevila, 2013).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile şap virüsüne duyarlı, şap hastalığının teşhisini ve şap virüsünün izolasyonunu daha etkin kılacak alternatif yeni hücre hatlarının oluşturulması kapsamında, iki yeni hücre hattı geliştirilmiştir. Her iki hücre hattında Avrupa Farmokopesi ve 9 CFR düzenlemesine göre yapılan testlerle, mikrobiyal, mikoplazmal ve viral ajanlar yönünden negatif oldukları ortaya konulmuştur. DNA barkodlama, karyotip ve transkriptom analizi ile orijinlerinin sığır olduğu, immünoboyama ve yine transkriptom analizi ile de FBTEC hücre hattının epitelyal, FBTEC hücre hattının da fibroblastik olduğu ortaya konulmuştur. Şap hastalığının hücre kültüründe teşhisi ve şap virüsünün izolasyonu için temel ve elzem olan şap virüsü hücresele reseptörlerinin her iki yeni hücre hattında farklı oranlarda ifade olduğu da transkriptom analizindeki gen ifadeleri ve qRT-PCR ile ortaya konulmuştur.

Şap virüsü hücresele reseptörleri olan integrinler, şap virüsünün de antijenik bölgesinde bulunan RGD dizisini tanıyan ve α v alt ünitesini içeren α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6, α v β 8 integrin heterodimerleridir (Hatley, 2018). Bu nedenle α v integrin alt ünitesi şap virüsü hücresele etkileşimlerinde oldukça önemli rol oynamaktadır. FBTEC hücre hattında şimdiye kadar şap virüsü hücresele reseptörü olarak tanımlanmış RGD bağımlı 4 adet integrin (α v β 1, α v β 3, α v β 6, α v β 8), HSPG2 ve heparan sülfat ailesinden sindekant 1 aktif olarak ifade olmuştur. Bu reseptör ifadeleriyle orantılı olarak FBTEC hücre hattının şap virüsü laboratuvar suşlarıyla yapılan hassasiyet çalışmalarında, enfektivite yönünden kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Antijenik yönden kontrol grubuna oranla daha düşük sonuçların elde edilmesinin yukarıda 4.11’de de açıklandığı gibi, bu laboratuvar suşlarının BHK 21 An₃₁ hücre hattına adapte suşlar olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Bu görüş, saha suşları ile yapılan çalışmada, FBTEC hücre hattının BHK 21 An₃₁ hücre hattına göre daha hassas olması ile doğrulanmıştır. FBTEC hücre hattının ömrü oldukça kısa olup, 10. pasajdan sonra sağlıklı devam edememesi bu hücre hattının rutinde kullanımını zorlaştırmaktadır. Ancak ileride farklı yöntemlerle yapılacak immortalizasyon çalışması ile şap virüsüne duyarlılığı yüksek yeni devamlı bir hücre hattı oluşturulabilir. Ayrıca şap hastalığının hedef hayvan grubu içerisinde büyük çoğunluğunu oluşturan sığırlarla aynı homolojiye sahip ve dil epiteli hücresi olması nedeniyle de oldukça önem arzeden bir hücre hattı olacaktır.

FBTFC hücre hattında da şap virüsü hücrel reseptörü olan integrin heterodimerlerinin başlıca alt ünitesi olan integrin αv alt ünitesi ifade olmuştur. Beta alt ünitelerinden $\beta 1$ ve $\beta 3$ ifade olurken $\beta 6$ ve $\beta 8$ alt üniteleri ifade olmamıştır. Dolayısıyla integrin heterodimeri olarak FBTFC hücre hattında integrin şap virüsü için temel reseptör olarak kabul edilen $\alpha v \beta 3$, şap virüsü serotip O ve serotip A için de afinitesi yüksek olan $\alpha v \beta 1$ ifade olmuştur. Şap virüsü için diğer reseptör grubu olan HSPG2 ve heparan sülfat ailesinden olan sindekan 1, FBTFC hücre hattında FBTEC hücre hattına göre daha yüksek oranda ifade olmuştur. Yine FBTEC hücre hattında olduğu gibi bu reseptör ifadeleriyle orantılı olarak FBTFC hücre hattının da şap virüsü laboratuvar suşlarıyla yapılan hassasiyet çalışmalarında, enfektivite yönünden kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Antijenik yönden kontrol grubuna oranla daha düşük sonuçların elde edilmesi yukarıda FBTEC hücre hattında yapılan açıklamada olduğu gibi, bu laboratuvar suşlarının BHK 21 An₃₁ hücre hattına adapte suşlar olmasından kaynaklanabileceğidir. Nitekim saha suşları ile yapılan çalışmada, 20 adet saha izolatının BHK 21 An₃₁ hücre hattında negatif çıkmasına rağmen FBTFC hücre hattında 3 tanesinin pozitif olarak yakalanması bu hücre hattının şap virüsüne BHK 21 An₃₁ hücre hattına göre daha hassas olduğunu göstermiştir. FBTFC hücre hattının 60. pasaj kadar çoğalabilmesi, bu hücre hattını sadece teşhis ve izolasyon amaçlı değil aynı zamanda plak test ve nötralizasyon testleri gibi kontrol testlerinde de kullanılabileceğini ve ayrıca 30. pasajdan sonra ortamda süspans olarak üreyen hücrelerin olması nedeniyle de süspans kültürüne de adapte olabileceği ipuçlarını vermesi, bu hücre hattını üretim amaçlı olarak kullanılabilecek aday bir hücre olması açısından ayrıca önemli kılmaktadır.

Literatür bilgisinde 2.4'de belirtildiği gibi şap virüsüne duyarlı olan devamlı hücre hatları ile ilgili ifade edilen bilgiler gözönüne alındığında, FBTFC hücre hattının durumu ayrı bir önem arz etmektedir. Hem şap virüsüne duyarlı olması hem viral ajanlar yönünden ari olması hem de hastalığın en büyük hedef konakçı ailesi olan sığırlarla aynı homolojiye sahip olması nedeniyle bu alandaki boşluğu doldurabilecek bir hücre hattı olarak kendini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu çalışmada FBTFC hücre hattının saha izolatlarının kontrol grubu olan BHK 21 An₃₁ hücre hattına göre daha duyarlı sonuçlar alınması, sahada yeni bir şap virüsü alt tipi ile karşılaşıldığında onun izolasyonu ve aşı suşu haline getirilmesinde hem saha suşunun hücre kültüründe üretilmesi ve izolasyonunda hem zaman ve etkinlik açısından hem de hedef hayvanla aynı homolojiye sahip bir hücre kültüründe adapte edilerek bir aşı

suşunun hazırlanması, aşı üretim prosesi açısından da önemli bir katkı sağlayacaktır. Çünkü bir şap hastalığı salgınında, etiyolojik ajanın hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması, klinik semptomlar göstermeyen hayvanlarda bile önemlidir. Antijenlerin, nükleik asitlerin veya viral enfektivitenin tespitine dayanan çeşitli teşhis yöntemleri şu anda mevcuttur, ancak şap hastalığının önemi göz önüne alındığında, bu teşhis yöntemleri genellikle tespit şansını arttırmak için eşzamanlı olarak uygulanır. Diğer metotlardan daha yavaş olmasına rağmen, virüs izolasyonu, sadece yüksek hassasiyeti nedeniyle değil aynı zamanda daha ileri çalışmalar için viral materyal temin etmesinden dolayı da yeri doldurulamaz bir yöntemdir (Zabal ve Fondevila, 2013). Bu bağlamda da bu iki yeni hücre hattı özellikle de uzun süre kullanılabilir olması nedeniyle FBTFC hücre hattı bu alanda çok önemli bir katkı sunacaktır.

Bu tez çalışmasının çıktıları olarak;

- Şap hastalığının teşhisinde ve şap virüsünün izolasyonunda kullanılabilir epitelial olarak FBTEC ve fibroblast olarak FBTFC hücre hatları olmak üzere iki yeni sonlu hücre hattı geliştirilmiştir.
- FBTEC hücre hattı şap virüsü hücrel reseptörlerinin hepsini ifade etmesi yönünden FBTFC hücre hattına göre daha avantajlı gibi görünmesine rağmen daha kısa ömürlü olmasıyla da dezavantaja sahiptir. Ancak bu durum da yeni bir çalışma ya da proje konusu ortaya çıkarmış olup, bu hücre hattı immortalizasyon ile devamlı hücre kültürü haline getirilip ömrünün uzatılması sağlanarak yeni bir hücre hattı oluşturulması önerilmektedir.
- Bu iki yeni hücre hattının şap virüsü hücrel reseptörleri çalışmalarında, HSPGs ailesinden olan sindekan 1 reseptör proteininin, her iki yeni hücre hattında da HSPG2 ile birlikte ifade olması, sindekan 1'in de bir şap virüsü reseptörü adayı olabileceği bulgusunun daha ileri çalışmalarla ortaya konması gerektiği önerilmektedir.
- BHK 21 An₃₁ hücre hattı Şap Enstitüsü'nde de teşhis ve izolasyonda rutinde kullanıldığı için bizim çalışmamızda kontrol grubu olarak yararlanılmış ve bu çalışmada elde edilen iki yeni hücre hattıyla özellikle saha izolatlarında daha duyarlı

sonuçlar elde edilmiştir. BHK 21 An₃₁ hücre hattına adapte şap virüsü laboratuvar suşlarının orijinal saha izolatlarının, FBTEC ve FBTFC hücre hatlarına adaptasyonlarının yapılarak laboratuvar suşu haline getirilmesi ve daha sonra BHK 21 An₃₁ hücre hattı ile karşılaştırmalı olarak, dizi analizlerinin, tekrar enfektivite ve antijenite testlerinin yapılması önerilmektedir.

- Sonuçlar, FBTFC hücre hattının ömrünün uzun olması, bu hücre hattını sadece teşhis ve izolasyon amaçlı değil aynı zamanda plak test ve nötralizasyon testleri gibi kontrol testlerinde de kullanılabilceğini göstermektedir.
- FBTFC hücre hattının 30. pasajından itibaren kültür ortamında süspanse kültüre adaptasyonun ipuçları olabilecek süspanse hücre popülasyonlarının olması bu hücre hattının ileri çalışmaları yapıldıktan sonra üretim amaçlı da kullanılabilme imkanı sağlayabilecek olması bu çalışmanın sonuçlarını ayrıca önemli kılmaktadır.
- Uzun süre kullanılabilirliği ve sığır orijinli olması nedeniyle FBTFC hücre hattı şap hastalığında olduğu gibi diğer viral sığır hastalıklarının teşhisinde ve bu hastalıklara karşı hücre kültüründe üretilen aşılar için de bir alternatif hücre adayı olabilir. Yine hasta hayvanla homolog orjinli olması nedeniyle hücreden kaynaklanabilecek sorunları da (yabancı protein kaynaklı yan etki, allerjik reaksiyon vb.) en aza indirme imkanı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile şap virüsüne duyarlı kısa ömürlü ama immortalizasyonla devamlı hücre hattı haline getirilebilecek FBTEC hücre hattı ve 60. pasaja kadar sorunsuz ve iyi bir büyüme hızına sahip ve kullanıma hazır FBTFC hücre hattı elde edilmiştir. Rutin kullanımdaki BHK 21 An₃₁ hücre hattı ile elde edilenlere benzer veya daha üstün olan tekrarlanabilir sonuçlar ve performans seviyeleri gösteren, şap virüsünün doğal konakçısı orijinli ve viral reseptörlerini koruyan, uzun süreli kullanım için ana ve çalışma hücre stoğu bankalaması yapılmış, literatürde ve uygulamada sığır fötüsü dili fibroblastlarından oluşturulmuş ilk hücre hattı olan FBTFC hücre hattı bu çalışmanın en önemli çıktısı olarak kullanıma sunulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., 1989, The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution, *Nature*, 337 (23), 709-716.
- Afratis, N.A., Nikitovic, D., Mulhaupt, H.A., Theocharis, A.D., Couchman, J.R., Karamanos, N.K., 2017, Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.*, 284(1):27-41. doi: 10.1111/febs.13940.
- Ali, A., Zahur, A.B., Farooq, U., Latif, A., Naeem, K., Afza, M., Ullah, R.W., Shabana and Muhammad, Z.Y., 2019, Comparative Sensitivity of LFBK and LFBK $\alpha\beta 6$ Cell Lines for Isolation of Foot and Mouth Disease Virus from Riverine Buffaloes by Using OroPharyngeal Fluids. *J Virol Antivir. Res.* 2019, 8:1, DOI: 10.4172/2324-8955.1000188
- Amadori, M., Volpe, G., 1997, Phenotypic features of BHK 21 cells used for production of FMD vaccine, *Biological*, 25: 65-73.
- Bachrach, H. L., 1968, Foot-and-mouth disease virüs, *Annual Review of Microbiology*, 22, 201-244.
- Bachrach, H. L., Callis, J. J., Hess, W. R., & Patty, R. E., 1957, A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology*, 4(2), 224–236. doi:10.1016/0042-6822(57)90060-0
- Bal-Price, A. and Coecke, S., 2011, Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). *Cell Culture Techniques*, 1–25. doi:10.1007/978-1-61779-077-5_1
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, M., Domingo, E., 2001, Evolution of cell recognition by viruses, *Science*, 292, 1102-1105.
- Baranowski, E., Ruiz-Carabo, C.M., Sevilla, N., 2000, Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in Aphthovirus receptor usege, *Journal of Virology*, February, p:1641-1647.
- Barteling, S.J., 2002, Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 21 (3), 577- 588.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baxt, B., Becker, Y., 1990, The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells, *Virus Genes*, 4, 73-83
- Belsham G.J., 2005, Translation and replication of FMDV RNA, *Foot-and-Mouth Disease Virus*, Mahy B.W.J (Eds). Springer-Verlag, p.43-70
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., vd., 1999, Functions of cell surface heparin sulfate proteoglycans. *Ann Rev Biochem.*,68:72-77.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T.,1995, Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha\beta 3$) inhibit binding and infection and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *Journal of Virology*, April, p:2664-2666.
- Berryman, S., Clark, S., Monaghan, P., Jackson T., 2005, Early events in integrins $\alpha\beta 6$ mediated cell entry of foot-andmouth disease virüs, *J. Virol.* 69: 2664-2666.
- Blaxter ML., 2004, The promise of a DNA taxonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359: 669-679.
- Bocksteins, E., Shepherd, A.J., Mohapatra, D.P. and Snyders, D.J., 2012, Applications of Immunocytochemistry, Editor; Hesam Dehghani. Publisher; InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, p. 3-17
- Bowen, J.A. and Hunt, J.S., 2000, The role of integrins in reproduction. *Ezperimental Biology and Medicine*, 223, 331-343.
- Bragulla, H. H., and Homberger, D. G., 2009, Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214(4), 516–559. doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x
- Brehm, K.E., Ferris, N.P., Lenk, M., Riebe, R., Haas, B.. 2009, Highly sensitive fetal goat tongue cell line for detection and isolation of foot-and-mouth disease virüs, *J Clin Microbiol.*, 47(10):3156-60. doi: 10.1128/JCM.00510-09

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Brooksby, J. B., 1958, The Virus of Foot-and-Mouth Disease. *Advances in Virus Research* Volume 5, 1–37. doi:10.1016/s0065-3527(08)60670-3

Brown, F., 1981, Foot-and-mouth disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 6(12), 325-327.

Brown, F., 2003, The history of research in foot-and-mouth disease, *Virus Research*, 91:3-7.

Burman, A., Clark. S., Abrescia, N.G., Fry, E.E., Stuart, D.I., Jackson, T., 2006, Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for alphav integrins, *J Virol*, 80:9798-810.

Burry, R.W., 2010, *Immunocytochemistry, A Practical Guide for Biomedical Research*, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, p.1-2.

Campbell, I.D., and Humphries, M.J., 2011, Integrin Structure, Activation, and Interactions *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3(3): a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994.

Cao, Y., Lu, Z., Liu, Z., 2016, Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems. *Expert Review of Vaccines*, 15(6), 783–789. doi:10.1586/14760584.2016.1140042

Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A. F., Freshney, R. I., 2010, Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *International Journal of Cancer*, 127(1), 1–8. doi:10.1002/ijc.25242.

Capstick, P. B., Garland, A. J., Chapman, W. G., Masters, R. C., 1965, Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. *Nature* 205, 1135–1136.

Capstick, P.B., Telling, R.C., Chapman, W.G., Stewart, D., 1962, Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease, *Nature*. 1962 Sep 22;195:1163-4.

Cartwright, S.F., Pay, T.W., Henderson, W.M., 1957, Multiplication of the virus of foot-and-mouth disease in culture. *J Gen Microbiol.*, 16(3):730-48.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Castro, M. P., 1973, An infectious agent causing “spontaneous” degeneration of swine cells in vitro, *In Vitro*, 9(1), 8–16. doi:10.1007/bf02615982
- Chakraborty, S., Kumar, N., Dhama, K., Verma, A.K., Tiwari, R., Kumar, A., Kapoor, S., Singh, S.V., 2014, Foot-and-Mouth Disease, an Economically Important Disease of Animals, *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2 (2S): 1 – 18.
- Chapman, W.G., Ramshaw, I.A., 1971, Growth of the IB-RS-2 pig kidney cell line in suspension culture and its susceptibility to foot-and-mouth disease virus, *Appl Microbiol* 22:1–5.
- Clarke, J. B., 1983, Transformation and foot and mouth disease virus (FMDV) productivity of some BHK cell lines, *Acta Virol*. 1983 Nov;27(6):534.
- Clarke, J.B and Spier, R.E., 1980, Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*, 63(1), 1–9. doi:10.1007/bf01320756.
- Clarke, J.B and Spier, R.F., 1977, Studies on the susceptibility to FMDV of BHK cell cultures derived from various sources. *International Symposium on Foot-and-Mouth Disease*, Lyon, 1976. *Develop. Biol. Standard*.35, 61–66. Basel: S. Karger 1977.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., Stokes, W., 2005, Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice, *Altern Lab Anim*. Jun;33(3):261-87.
- Cowan, K.M., Erol, N., Whiteland, A., Girard, H.C., 1974, Quantitative and qualitative aspects of FMDV vaccine standardization, Meeting of the research group of the standing technical committee of the European commission for the control of FMD. Lelystad, Netherlands, 22-24 October.
- Cribiu E.P., Di Berardino D., Di Meo G.P., Eggen A., Gallagher D.S., Gustavsson I., Hayes H., Iannuzzi L., Popescu C.P., Rubes J., Schmutz S., Stranzinger G., Vaiman A., Womack J., 2001, International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB 2000), *Cytogenet Cell Genet.*, ;92(3-4):283-99. DOI: 10.1159/000056917.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Crowell, R.C., Tomko, R.P., 1994, Receptors for picornaviruses, *Cellular Receptors for Animal Viruses* 6, 75-99.
- Darribere, T., Skalski M., Cousin, H., Gaultier, A., Montmory, C., Alfandari, D., 2000, Integrins: regulators of embryogenesis. *Biology of the Cell*, 92, 5-25.
- DiBerardino, D., Hayes, H., Fries, R., & Long, S., 1990, International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (1989). *Cytogenetic and Genome Research*, 53(2-3), 65–79. doi:10.1159/000132898.
- Desmarests, L. M., Theuns, S., Olyslaegers, D. A., Dedeurwaerder, A., Vermeulen, B. L., Roukaerts, I. D., and Nauwynck, H. J., 2013, Establishment of feline intestinal epithelial cell cultures for the propagation and study of feline enteric coronaviruses. *Veterinary Research*, 44(1), 71. doi:10.1186/1297-9716-44-71.
- Ding, Y.Z., Liu, Y.S., Zhou, J.H., Chen, H.T., Wei, G., Ma, L.N., Zhang, J., 2011, A highly sensitive detection for foot-and-mouth disease virus by gold nanoparticle improved immuno-PCR, *Virology* 438: 148.
- Doel, T.R., Baccharini, P.J., 1981, Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virology*, 70(1):21–32.
- Drewa, T., Szmytkowska, K., Włodarczyk, Z., Sir, I., & Kierzenkowska-Mila, C., 2006, Does the Presence of Unwanted Dermal Fibroblasts Limit the Usefulness of Autologous Epidermal Keratinocyte Grafts? *Transplantation Proceedings*, 38(9), 3088–3091. doi:10.1016/j.transproceed.2006.08.103.
- Duque, H., LaRocco, M., Golde, W. T., & Baxt, B., 2004., Interactions of Foot-and-Mouth Disease Virus with Soluble Bovine V 3 and V 6 Integrins. *Journal of Virology*, 78(18), 9773–9781. doi:10.1128/jvi.78.18.9773-9781.2004.
- Duque, H., and Baxt, B., 2003, Foot-and-mouth disease virus receptors: Comparisons of Bovine α v integrin utilization by type 1 and 2 viruses, *Journal of Virology*, Vol 77(4) pp.2500-2511.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

ECACC, 2019, https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/114565/m219_passage-numbers-explained.pdf.

European Pharmacopoeia 9th, 2.6.1. sterility

Eroschenko, V.P., 2001, Histoloji Atlası, Palme yayıncılık, s.17.

Fenner, F., 1987, Veterinary Virology, Academic Press, Inc.San Diego, California, p.425-435.

Fox, G. vd., 1989, The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid). J.Gen. Virol., 70, 625-637.

Freshney, R.I., 2010 Culture of animal cells, Alan R. Liss., New York.

Fry, E.E., Stuart, D.I., Rowlands, D.J., 2005, The Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus, CTMI. 288:71-101.

Fry, E. E., 1999, The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. The EMBO Journal, 18(3), 543–554. doi:10.1093/emboj/18.3.543.

Fukai, K., Onozato, H., Kitano, R., Yamazoe, R., Morioka, K., Yamada, M., Kanno, T. 2013, Availability of a fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 for isolation of Foot-and-mouth disease virus (FMDV) from clinical samples collected from animals experimentally infected with FMDV. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 25(6), 770–774. doi:10.1177/1040638713508400 Kaur G and Dufour JM. 2012. Cell lines. Spermatogenesis. 1; 2(1): 1–5. doi: 10.4161/spmg.19885.

Gao, Y., Sun, S.Q., Guo, H.G., 2016, Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements, Virology Journal, 13:107. DOI 10.1186/s12985-016-0561-z.

Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Vias, M., 2014, Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. British Journal of Cancer, 111(6), 1021–1046. doi:10.1038/bjc.2014.166

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grubman, M.J., 1980, The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp, *Archives of Virology*, 63(3-4), 311–315. doi:10.1007/bf01315038.
- Grubman, M.J., Baxt B., 2004, Foot-and-mouth disease, *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. p. 465–493.
- Gutiérrez-Rivas, M., Pulido, M.R., Baranowski, E., Sobrino, F., Sáiz, M., 2008, Tolerance to mutations in the foot-and-mouth disease virus integrin-binding RGD region is different in cultured cells and in vivo and depends on the capsid sequence context. *J Gen Virol.*, 89:2531–9.
- Gürhan, S.İ., Gürhan B., Öztürkmen, H., 1987, Klonlama yöntemi ile elde edilen BHK 21 hücre kültürlerinin üreme özelliklerinin ve şap virüsüne duyarlılıklarının incelenmesi, *Doğa Vet. ve Hay. Der.* 11 (1), 21-27.
- Gürhan, S. İ., Gürhan, B., Öztürkmen, A., Aynagöz, G., Tufan, M., Candaş, A., Kızıl, S., 1993, Establishment of the prevalence of persistently infected cattle and sheep in Anatolia with FMDV, *Etlik Vet. Mik. Journal.*, 7 (4): 52-59.
- Hahn, W. C., 2002, Immortalization and transformation of human cells. *Mol. Cells* 13, 351–361.
- Han, S.C., Guo, H.C., Sun. S.Q., 2015, Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions, *Arch Virol.* 160:1–16.
- Hatley, R. J. D., Macdonald, S. J. F., Slack, R. J., Le, J., Ludbrook, S. B., Lukey, P. T., 2018, An α v-RGD Integrin Inhibitor Toolbox: Drug Discovery Insight, Challenges and Opportunities. *Angewandte Chemie*, 130(13), 3354–3379. doi:10.1002/ange.201707948.
- Hebert P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., Biological identifications through DNA barcode. *Proc R Soc LondB.* 2003a; 270:313–21.
- Hayflick, L., 1965, The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Horbach, S. P. J. M., Halfman, W., 2017, The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. *PLOS ONE*, 12(10), e0186281. doi:10.1371/journal.pone.0186281

<https://ecfr.io/Title-09/pt9.1.113>

Humphries, M.J., McEwan, P.A., Barton, S.J., 2003, Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), 313-320.

Humphries, M.J., 2002, Insights into integrin-ligand binding and activation from the first crystal structure, *Arthritis Res.*, 4 (supply3), 69-78.

Humphries, M.J., 2000, Integrin structure, *Biochem Soc Trans.* 2000;28(4):311-39.

Hynes, R.O., 2004, The emergence of integrins: A personal and historical perspective, *Matrix Biol* 23: 333–340.

Hynes, R.O., 2002, Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673–687.

Hynes, R.O., Marcantonio, E.E., Stepp, M.A., Urry, L.A. and Yee, G.H., 1989, Integrin heterodimer and receptor complexity in avian and mammalian cells, *The Journal of Cell Biology*, 109, 409-420.

Iannuzzi, L., 2007, Cytogenetics in animal production, *Italian Journal of Animal Science*, 6:sup1, 713-715, doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.23.

Iannuzzi, L., 1996, G- and R-banded prometaphase karyotypes in cattle (*Bos taurus* L.). *Chromosome Research*, 4(6), 448–456. doi:10.1007/bf02265052.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iannuzzi, L., 1990, An Improved Characterization of Cattle Chromosomes by Means of High-Resolution G- and R-Band Comparison. *Journal of Heredity*, 81(1), 80–83. doi:10.1093/oxfordjournals, jhered.a11093.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. and Hebert, P. D. N., 2007, Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x.
- Ivanova, N. V., Clare, E. L. And Borisenko, A. V., 2012, DNA Barcoding in Mammals. *Methods in Molecular Biology™*, 153–182. doi:10.1007/978-1-61779-591-6_8.
- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., King, A.M., 2004, Integrin alphavbeta8 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol.*, 78:4533–40. Jackson, T., King, A..MQ., Stuart, D.I., Fry, E., 2003, Structure and receptor binding, *Virus Research*, 91: 33-46.
- Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D., King, A.M., 2002, Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol.*, 76:935–41.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., & King, A. M. Q., 2000, The epithelial integrin $\alpha\beta 6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 74(11), 4949–4956. doi:10.1128/jvi.74.11.4949-4956.2000.
- Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R.A., 1997, Arginine-Glycine-Aspartic acid binding by FMD viruses to the purified integrin $\alpha\beta 3$ in vitro. *Journal of Virology*, November, p:8357-8361.
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W., King, A.M., 1996, Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 70: 5282–5287.
- Jeon, K.L., Hwang. K.K., 2014. Immortalization of bovine primary epithelial cells to isolate foot-and-mouth disease virüs. *J. Prev. Vet. Med.* Vol. 38, No. 1: 15-25.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jin, X., Lee, J.S., Kwak, S., Lee, S.Y., Jung, J.E., Kim, T.K., Xu, C., Hong, Z., Li, Z., Kim, S.M., Pian, X., Lee, D.H., Yoon, J.T., You, S., Choi, Y.J., Kim, H., 2006, Establishment and Characterization of Three Immortal Bovine Muscular Epithelial Cell Lines. *Mol. Cells*, Vol. 21, No. 1, pp. 29-33.
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., vd., 1996, Efficient infection of cells in culture by type O Foot-and-Mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol.*, 70:5282–7.
- Kaplan, J., Hukku, B., 1998, Chapter 11 Cell Line Characterization and Authentication. *Methods in Cell Biology*, 203–216. doi:10.1016/s0091-679x(08)61579-4.
- Kasza, L., Shaddock, J.A., Christofinis, G.J., 1972, Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6, *Res Vet Sci* 13:46–51.
- Kaur, G., Dufour, J.M., 2012, Cell lines, *Spermatogenesis*, 1;2(1):1–5.doi: 10.4161/spmg.19885.
- Kitching, R.P., 1998, A recent history of foot-and-mouth disease, *J. Comp. Pathol.* 118: 89-108.
- Knowles, N. J., Samuel, A. R. (2003): Molecular epidemiology of foot-and- mouth disease virus. *Virus Research*, 91: 65-80.
- Khatun, M.R., Arifuzzaman, M.D and Ashraf, A., 2011, Karyotype for Identification of Genetic Abnormalities in Cattle, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, Volume:6, Issue: 2, P: 117-125, DOI: 10.3923/ajava.2011.117.125.
- Kumar R, Dhama K and Wani MY., 2011, Foot-and-mouth disease: an economically important disease of animals, *Livestock Line*, 5(6): 4-8.
- LaRocco, M., Krug, P. W., Kramer, E., Ahmed, Z., Pacheco, J. M., Duque, H., Rodriguez, L. L., 2015, Correction for LaRocco vd., A Continuous Bovine Kidney Cell Line Constitutively Expressing Bovine $\alpha\beta 6$ Integrin Has Increased Susceptibility to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 755–755. doi:10.1128/jcm.03220-14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- LaRocco, M., Krug, P. W., Kramer, E., Ahmed, Z., Pacheco, J. M., Duque, H., Rodriguez, L. L., 2013, A Continuous Bovine Kidney Cell Line Constitutively Expressing Bovine $\alpha\beta 6$ Integrin Has Increased Susceptibility to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1714–1720. doi:10.1128/jcm.03370-12.
- Liddington, R.C., 2004, Structural basis of integrin signaling. *Handbook of Cell Signaling*. Liddington, R.A. and Dennis E.A. (eds), Academic pres, New York, 123-126p.
- Loftus, J.C, Smith, J.W. and Ginsberg, M.H., 1994, Integrin mediated cell adhesion: the extracellular face. *The Journal of Biological Chemistry*, 26 (41), 25235-25238.
- Longjam, N., Deb, R., Sarmah, A. K., Tayo, T., Awachat, V. B., & Saxena, V. K., 2011, A Brief Review on Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease of Livestock: Conventional to Molecular Tools. *Veterinary Medicine International*, 1–17. doi:10.4061/2011/90576.
- Lowell, C.A., Mayadas, T.N., 2012, Overview: studying integrins in vivo, *Methods Mol Biol.*, 757:369-97. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_22.
- MacLeod, R. A. F., Kaufmann, M., & Drexler, H. G. (2007). Cytogenetic harvesting of commonly used tumor cell lines. *Nature Protocols*, 2(2), 372–382. doi:10.1038/nprot.2007.29 .
- Macpherson I, Stoker M. (1962) Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*. 1962 Feb;16:147-51.
- Mann, J.A and Sellers, R.F., 1990, Foot-and-Mouth Disease Virus. *Virus Infections of Ruminants*, Dinter Z. and Morein B. (eds), Elsevier Science Publishers B.V, Newyork, 503-513p.
- Martínez MA., Verdaguer N., Mateu MG., Domingo E., 1997, Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci*, 94:6798–802.
- Mason, P. W., Grubman, M. J., Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Research*, 91: 9-32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mason, P.W., Rieder, E. and Baxt, B., 1994, RGD sequencing of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, 91, 1932-1936.
- Masters, J. R., 2000, Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 233–236.
- Melander, Y., 2010, The mitotic chromosomes of some ruminant mammals (*Bos taurus* L., *Bison bonasus* L. and *Ovis aries* L.). *Hereditas*, 45(4), 649–664. doi:10.1111/j.1601-5223.1959.tb03073.x.
- Milner, R. and Campbell., 2002, The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *Journal of Neuroscience Research*, 69, 286-291.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P.H., Violette, S.M., vd., 2005, The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol.*, 86:2769–80.
- Moreno-Layseca, P., Icha, J., Hamidi, H., Ivaska, J., 2019, Integrin trafficking in cells and tissues, *Nature Cell Biology*. doi:10.1038/s41556-018-0223-z.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., 1998, Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin $\alpha\beta 3$ as its receptor. *Journal of Virology*, May, P: 3587-359.
- Neff, S., Baxt, B., 2001, The ability of integrin alpha(v)beta(3) to function as a receptor for foot-and mouth disease virus is not dependent on the presence of complete subunit cytoplasmic domains. *J Virol.*, 75:527–32.
- Nemerow, G.R. and Stewart, P.L., 2001, Antibody neutralization epitopes and integrin binding sites on nonenveloped viruses. *Virology*, 288, 189-191.
- Nicole S., Negrisola E., Eccher G., Mantovani R., Patarnello T., Erickson D.L., Kress W.J., Barcaccia G., 2012, DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technology and Biotechnology* 50: 387– 398.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H., and Baxt, B., 2005, Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *Journal of Virology*. 79 (13), 8506–8518.
- OIE, 2019 List of FMD free Members according to RESOLUTION No. 17 (87 th General Session of World Assembly, May 2019) [Online]. Paris, France OIE. Available: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/fmd/list-of-fmd-free-members/>
- OIE, 2019, Listed diseases, infections and infestations in force in 2019, Available: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>
- OIE, 2019, Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus), Chapter 3.1.8. (NB: Version adopted in May 2017) , Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf
- Paton, D. J., Barnett, P. V., Ferris, N. P., 2012, Foot and mouth disease. In: Commission, O. T. A. H. S. (ed.) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th ed. Paris, France: OIE World Organisation for Animal Health.
- Puckette, M., Clark, B.A., Smith, J.D., Turecek. T., Martel, E., Gabbert, L., Pisano, M., Hurtle, W., Pacheco, J.M., Barrera, J., Neilan, J.G., Rasmussen, M., 2017, Foot-and-Mouth Disease (FMD) Virus 3C Protease Mutant L127P: Implications for FMD Vaccine Development, *Journal of Virology*, 91, 22, 1-13.
- Rach, J., Bergmann, T., Paknia, O., DeSalle, R., Schierwater, B., Hadrys, H., 2017. The marker choice: Unexpected resolving power of an unexplored CO1 region for layered DNA barcoding approaches, *PLoS One*, 12(4), e0174842.
- Rao, X., Lai, D., Huang, X., 2013, A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *Journal of Computational Biology*, 20(9), 703–711. doi:10.1089/cmb.2012.0279.
- Reid, Y.A., 2014, Authentication and characterization of animal cell lines: Towards best practices in cell culture. *J Bioprocess Biotechniq*, 4:6. doi.org/10.4172/2155-9821.C1.007.
- Reid, Y. A., Durkin, A. S., Steenbergen, K., Hay, R. J., 2001, Cell Line Authentication Methods. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi:10.1038/npg.els.0002559.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rhiner, C., and Hengartner, M. O., 2006, Sugar Antennae for Guidance Signals: Syndecans and Glypicans Integrate Directional Cues for Navigating Neurons. *The Scientific World Journal*, 6, 1024–1036. doi:10.1100/tsw.2006.202.
- Rodriguez, L.L., Grubman, M.J., 2009, Foot and mouth disease virus vaccines, *Vaccine* 27, 90–94.
- Roper, J. A., Williamson, R. C., and Bass, M. D., 2012, Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(5), 583–590. doi:10.1016/j.sbi.2012.07.003.
- Rueckert, R.R., 1990, Picornaviridae and Their Replication. *Virology*. Fields B.N. and Knipe D.M. (eds), Raven Press Ltd., New York, 507-548p.
- Pal, K., and P. L. Grover. 1983. A simple method for the removal of contaminating fibroblasts from cultures of rat mammary epithelial cells. *Cell Biology International Reports*. 7:779-783
- Ruiz-Sáenz, J., Goez, Y., Tabares, W., & López-Herrera, A., 2009, Cellular Receptors for Foot and Mouth Disease Virus. *Intervirolgy*, 52(4), 201–212. doi:10.1159/000226121.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Esko, J.D., 2011, Heparan sulfate proteoglycans, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1;3(7). pii: a004952. doi: 10.1101/cshperspect.a004952.
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., 1997, Tissue culture adaptation of foot-and- mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of Virology*, July, p:5115-5123.
- Schiff, L.J., 2005, Review: Production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 41, pp. 65-70 (6).
- Phipps, S.M.O., Berletch, J.B., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., 2007, Biological Aging Methods *Mol. Biol.*, 371: 9–19. doi: 10.1007/978-1-59745-361-5_2.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saeed, A., Kanwal, S., Arshad, M., Ali, M., Shaikh, R. S., & Abubakar, M., 2015, Foot-and-mouth disease: overview of motives of disease spread and efficacy of available vaccines. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1). doi:10.1186/s40781-015-0042-8.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Mensel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006, The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7:3.
- Shi, Q., Jiang, J., Luo, G., 2013, Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol.*, 87(12):6866-75. doi: 10.1128/JVI.03475-12.
- Sobrinho, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M., Nunez, J.I., Rosas, M. F., Baranowski, E., Ley, V., 2001, Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat, *Vet. Res.*, 32,1, 1-30.
- Somal, A., Bhat, I. A., B., I., Pandey, S., Panda, B. S. K., Thakur, N., Sharma, G. T., 2016. A Comparative Study of Growth Kinetics, In Vitro Differentiation Potential and Molecular Characterization of Fetal Adnexa Derived Caprine Mesenchymal Stem Cells. *PLOS ONE*, 11(6), e0156821. doi:10.1371/journal.pone.0156821.
- Stacey, A., Stacey, G., & Gürhan, S. İ., 1998, An Indepth Characterization of BHK Cell Lines. *Biomedical Science and Technology*, 117–121. doi:10.1007/978-1-4615-5349-6_12.
- Stewart, P.L and Nemerow, G.R., 2007, Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol.*, 15(11):500-7. DOI: 10.1016/j.tim.2007.10.001.
- Stoker M, Macpherson I.(1964) Syrian Hamster Fibroblast Cell Line Bhk21 And Its Derivatives. *Nature*. 1964 Sep 26;203:1355-7.
- Stram, Y., Molad T., Chai, D., Gelman, B., Yadin, H., 1995, Detection and subtyping of footand-mouth disease virus in infected cattle by polymerase chain reaction and amplified VP1 sequencing. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 52-55.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- SundarRaj, N., Rizzo, J. D., Anderson, S. C., & Gesiotto, J. P., 1992, Expression of vimentin by rabbit corneal epithelial cells during wound repair, *Cell and Tissue Research*, 267(2), 347–356. doi:10.1007/bf00302973.
- Swaney, L.M.,1988, A continuous bovine kidney cell line for routine assays of foot-and-mouth disease virus. *Veterinary Microbiology*, 18(1), 1–14. doi:10.1016/0378-1135(88)901113.
- Sütçü, M., 1986, Şap Hastalığı. Şap Enstitüsü Yayın No,2, Ongun Kardeşler Mat., Ankara,
- Sütçü, M., Erdem, H., Gürhan, Sİ., 1978, Sahada hasta hayvanlardan elde edilecek O1 tipi şap virüsü suşlarının BHK monolayer doku kültürüne adaptasyonu, bu kültürlerde üretilmesi ve virüslerin karakterleri üzerinde çalışmalar, Şap Enstitüsü, Cilt I (1987), Ongun kardeşler Mat., Ankara, s.205-229.
- Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46: 271–282.
- Tillmar, A.O., Dell’Amico, B., Welander, J., Holmlund, G., 2013, A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. *PLoS ONE*, 8(12), e83761. doi:10.1371/journal.pone.0083761.
- Tripathi, R., Sharma, P., Chakraborty, P., and Varadwaj, P. K., 2016, Next-generation sequencing revolution through big data analytics. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 119–149. doi:10.1080/21553769.2016.1178180).
- Trivedi, S., Aloufi, A.A., Rehman, H., Saggu, S., Ghosh, S.K., 2016, DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1): 332-337.
- Udroiu, I., and Sgura, A., 2017, Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives. *Animal Genetics*, 48(5), 505–515. doi:10.1111/age.12581.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uphoff, C. C., Drexler, H. G., 2014, Detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *Current Protocols in Molecular Biology*, 28.4.1–28.4.14. doi:10.1002/0471142727.mb2804s106.
- Ünal, N., Gürhan, S. İ., 1998, Yağ adjuvantlı ve AL(OH)₃ jeline adsorbe saponinli şap aşılarının VP1 değerlerindeki değişimin SDS-PAGE ile zamana bağlı olarak incelenmesi, *Pendik Vet. Mikrob. Derg.* , 29 (1-2): 81-86.
- Vaidya, M. M., Sawant, S. S., Borges, A. M., Naresh, N. K., Purandare, M. C., & Bhisey, A. N., 2000, Cytokeratin expression in human fetal tongue and buccal mucosa. *Journal of Biosciences*, 25(3), 235–242. doi:10.1007/bf02703930.
- Velez-delValle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Muñozledo, F., Galván-Mendoza, I. J., & Kuri-Harcuch, W. (2016). Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep24389
- Wang G, Wang Y, Shang Y, Zhang Z, (2015) How foot-and-mouth disease virus receptor mediates foot-and-mouth disease virus infection. *Virology*. 2015; 531: 9. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.046
- Wild, T. F., Burroughs, J. N., Brown, F. (1969). Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 4: 313-320.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D., 2005, DNA barcoding Australia's fish species, *Philos. Trans. Royal Society B*. 360, 1847-1857.
- Whiteside, J.P, Rayner R.W and Spier R.E, 1983, The improvement and standardization of the simplified process for the production of foot and mouth disease virus from BHK suspension cells, *J. Biol. Standardization*, 11(3): 145–155.
- www.proteinatlas.org/learn/method/immunocytochemistry, 2018.
- www.daff.gov.au, 2013. Review of published tests to detect pathogens in veterinary vaccines intended for importation in to Australia. Second edition, P:26-29.
- www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xiong, J.P., Stehle, Goodman S.L, ve Arnaout M.A., 2003. New insights into the structural basis of integrin activation, *Blood*, Volume 102, Number 4.
- Yılmaz, Ş.,Coşkuner, A., Özdemir, A., Arsoy, A., Arıcı, M.K., Karaçam, S.O., Gültekin, Y., Özbilge, B.B., Alpay, B.M., Çelik, N., Ekici, H., Karakaya, M., Kara, O., Parlak, H., Türkoğlu, T., 2019, Endüstriyel boyutta şap aşısı üretiminde serumsuz vasat kullanımı, Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, TAGEM/HSGYAD/16/A02/P02/72 (yayımlanmamış).
- Yılmaz, S., Akay, M.T., 2005, Detection of integrin receptor in serial suspension passages of BHK 21 Cell Culture, Biomed, XIIth International Symposium on Biomedical Science and Technology, 20-23 September, İzmir, Turkey.
- Zabal, O., Fondevila, N., 2013, Selection of Highly Susceptible Cell Lines to Foot and Mouth Disease Virus Infection, *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3,263-266.
- Zahid, M.N., 2016, Role of Integrin Proteins as Receptors for Foot and Mouth Disease Virus. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, Volume 4, Issue 8, s.41.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama-A: Etik kurul raporu.....	132
Ek Açıklama-B: FBTEC DNA barkodu elektroferogramı.....	134
Ek Açıklama-C: FBTEC DNA barkodu elektroferogramı.....	135
Ek Açıklama-D: FBTEC hücre hattının DNA barkodlama ile kimliklendirme sertifikası.	136
Ek Açıklama-E: FBTEC hücre hattının DNA barkodlama ile kimliklendirme sertifikası.	137

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklama-A. Etik kurul raporu



T.C.
ŞAP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

Sayı: 93369491. HDYEK-604-7
 Konu: Kurul Kararı

27.05.2016

ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 26 Mayıs 2016 tarihinde aylık olağan toplantısını yapmıştır. Toplantı karar tutanağı ve çalışmaların onayları ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize arz ederim.

Ali ÖZDEMİR
 Kurul Başkanı

EKİ _____ :

- 1 adet Karar Tutanağı

Ek açıklamalar-A Etik Kurul Raporu devamı

ŞAP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

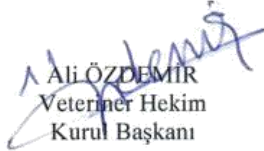
KARAR SAYISI: 2016-5

KARAR TARİHİ: 26.05.2016

Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 26 Mayıs 2016 tarihinde toplanmıştır.

Toplantıda aşağıdaki kararlar alınmıştır.

- 1- Enstitümüz Hücre Bankası Laboratuvarında görevli Biyolog Şükran YILMAZ'ın yürütücüsü olduğu 10.05.2016 tarih ve 2215/440 kayıt nolu "**Şap Virusü İzolasyonu ve Teşhisi İçin Fetal Sığır Dilinden Hücre Hattı Oluşturulması ve Karakterizasyonu**" konulu çalışmanın; Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik (Resmi Gazetede yayımlanan 04 Şubat 2014 Tarih ve 28914 sayılı)'in 8. Maddesinin k bendinin 2. Fıkrasında yer alan "**Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetüsler ile yapılan prosedürler**" HADYEK iznine tabi olmadığından kurul onayına gerek olmadığına karar verilmiştir.

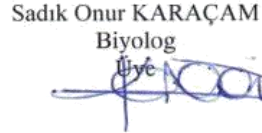

Ali ÖZDEMİR
Veteriner Hekim
Kurul Başkanı

Elif ÇELİK
Veteriner Hekim
Kurul Başkan Yard.


Ergün UZUNLU
Veteriner Hekim
Üye


Himmet EKİCİ
Uzm. Veteriner Hekim
Üye


Dr. İbrahim HANCI
Veteriner Hekim
Üye


Sadık Onur KARAÇAM
Biyolog
Üye

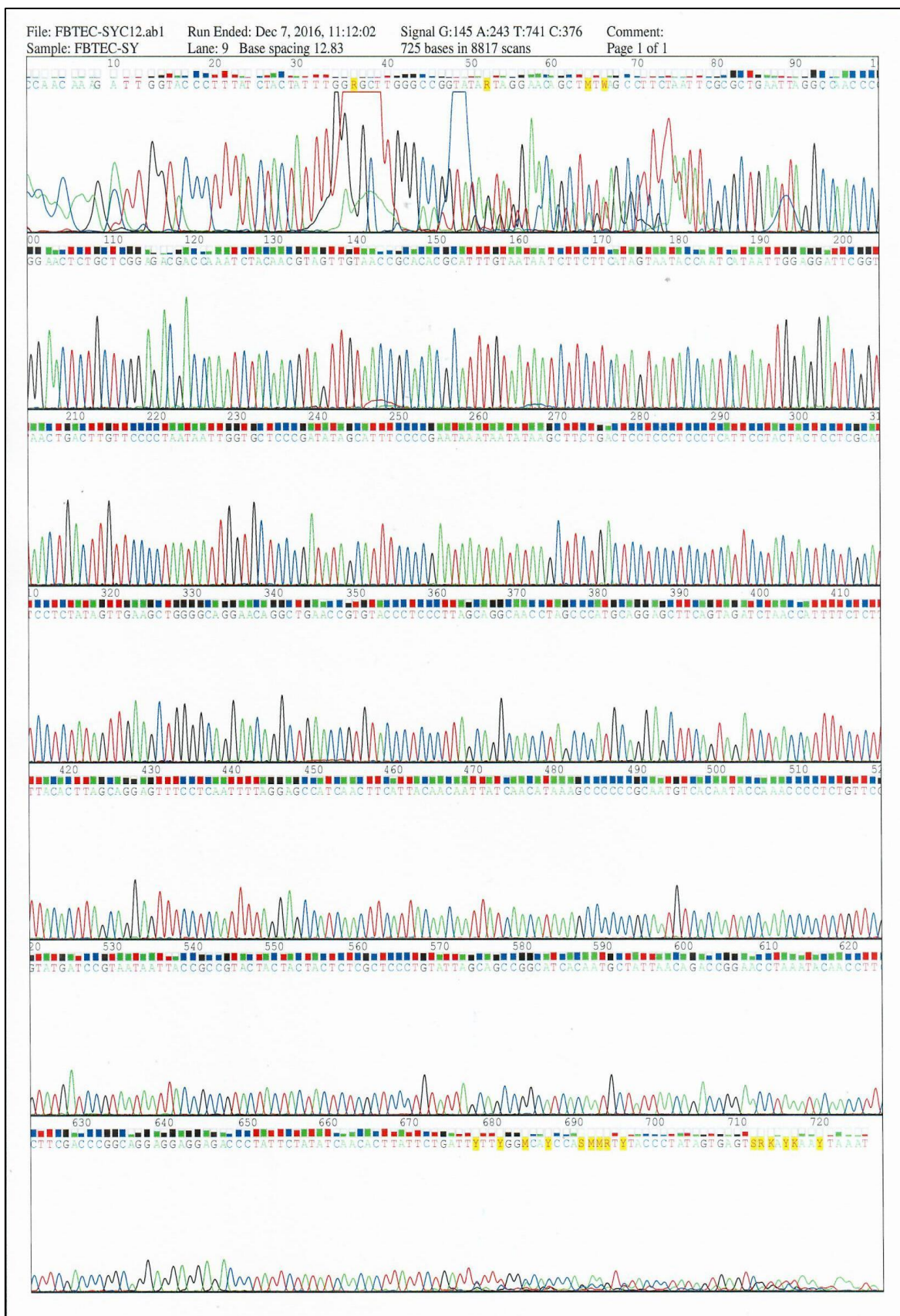
Duran ASLAN
Üye
(Katılmadı)

Fahri DURMAZ
Üye
(Katılmadı)

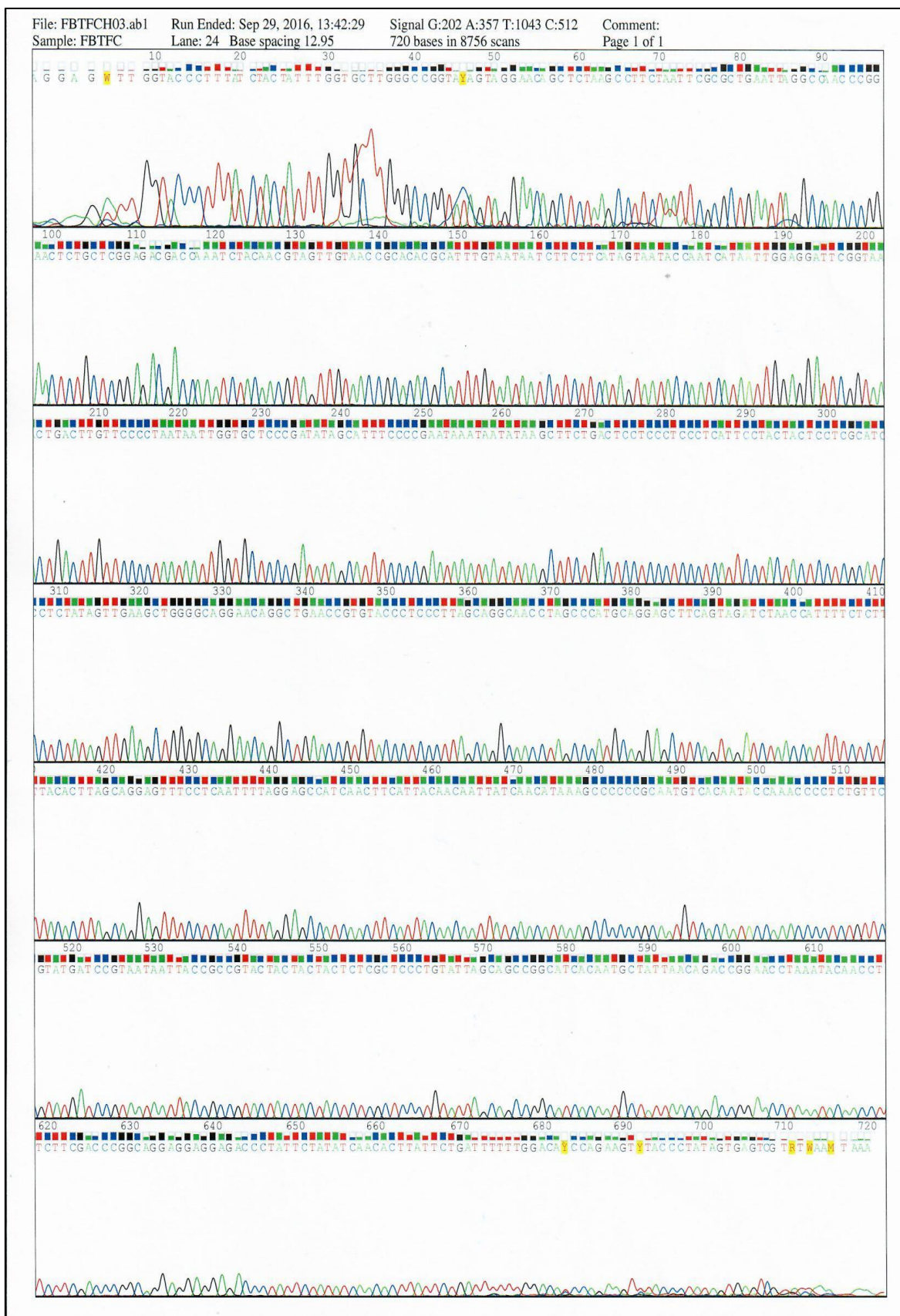
Ali Rıza ÖZBİLGE
Üye



Ek açıklamalar-B. FBTEC DNA Barkodu elektroforegramı




Ek açıklamalar-C. FBTEC DNA Barkodu elektroforegramı



Ek açıklamalar-D. FBTEC hücre hattının DNA barkodlama ile kimliklendirme sertifikası

Species-Identification

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Sample name: FBTEC

Date of analysis: 07.12.2016

DNA processing number: 12532

Method: DNA Barcoding by PCR amplification of 5' coding region of cytochrome c oxidase I (658 bp fragment size). Cycle sequencing of respective PCR products revealed following assignment upon submission to BOLD (Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.Barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 2007; 7(3): 355-364

Primer:

1x LepF1_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT CAA CCA ATCATA AAG ATA TTG G
 1x VF1_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG TCT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG G
 1x VF1d_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG TCT CAA CCA ACC ACA ARG AYA TYG G
 3x VF1i_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG TCT CAA CCA ACC ANA ANG ANA TNG G

1x LepR1_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AAA CTT CTG GAT GTC CAA AAA ATC A
 1x VR1d_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AGA CTT CTG GGT GGC CRA ARA AYC A
 1x VR1_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AGA CTT CTG GGT GGC CAA AGA ATC A
 3x VR1i_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AGA CTT CTG GGT GNC CNA ANA ANC A

Sequence:

```
5'- CCAACAAAGATTGGTACCCTTATCTACTATTGGRGCTTGGCCGGTATARTAGGAACA
GCTMTWAGCCTTCTAATTCGCGCTGAATTAGGCCAACCCGGAACCTGCTCGGAGACGAC
CAAATCTACAACG TAGTTGTAACCGCACACGCATTGTAATAATCTTCTCATAGTAATA
CCAATCATAATTGGAGGATTTCGTAACGACTTGTCCCTTAATAATTGGTCTCCCGAT
ATAGCATTTCCTCCGAATAAATAATAAGCTTCTGACTCCCTCCCTCCTCATTCTACTA
CTCCTCGCATCCTCTATAGTTGAAGCTGGGGCAGGAACAGGCTGAACCGTGACCCCTCC
TTAGCAGGCAACCTAGCCATG CAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCATTTCTCTTTACAC
TTAGCAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCCATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATA
AAGCCCCCGCAATGTCACAATACCAAAACCCCTGTTCTGATGATCCGTAATAATTACC
GCCGTACTACTACTCTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GACCGAACCTAATAACAACCTTCTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CAACTATTCTGATTTTGGMCAVCCASMMRITYACCCATAGTGAGTSRKAYKAY
TAAAT-3'
```

Identification Summary:


Taxonomic Level	Taxon Assignment	Probability of Placement (%)
Phylum	Chordata	100
Class	Mammalia	100
Order	Artiodactyla	100
Family	Bovidae	100
Genus	Bos	100
Species	Bos taurus	100


Search Result: The submitted sequence has been matched to **Bos taurus**. This identification is solid unless there is a very closely allied congeneric species that has not yet been analyzed. Such cases are rare.

Geschäftsführer/
Managing Director:
Prof. Dr. Jörg Overmann
Aufsichtsratsvorsitzender/Head of
Supervisory Board: RD Dr. David Schaefer

Braunschweigische Landessparkasse
Kto.-Nr./Account: 2 039 220
BIC/Bank Code: 250 500 00
IBAN DE22 2505 0000 0002 0392 20
SWIFT (BIC) NOLA DE 2 H

Handlungsjahr/
Commercial Register:
Amtsgericht Braunschweig
HRB 2570
Steuernr.: 13/200/24030






Ek açıklamalar-E. FBTFC hücre hattının DNA barkodlama ile kimliklendirme sertifikası

Species-Identification

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Sample name: FBTFC

Date of analysis: 29.09.2016

DNA processing number: 12303

Method: DNA Barcoding by PCR amplification of 5' coding region of cytochrome c oxidase I (658 bp fragment size). Cycle sequencing of respective PCR products revealed following assignment upon submission to BOLD (Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.Barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 2007; 7(3): 355–364.

Primer:

1x LepF1_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G
 1x VF1_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG TCT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG G
 1x VF1d_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG TCT CAA CCA ACC ACA ARG AYA TYG G
 3x VF1i_t1: ATT TAG GTG ACA CTA TAG TCT CAA CCA ACC ANA ANG ANA TNG G

1x LepR1_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AAA CTT CTG GAT GTC CAA AAA ATC A
 1x VR1d_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AGA CTT CTG GGT GGC CRA ARA AYC A
 1x VR1_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AGA CTT CTG GGT GGC CAA AGA ATC A
 3x VR1i_t1: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT AGA CTT CTG GGT GNC CNA ANA ANC A

Sequence:

5'-AGGAGWTTGGTACCCCTTATCTACTATTGGTGCTGGGCCGGTAYAGTAGGAACAGCTC
 TAAGCCTCTAATTCGCGCTGAATTAGCCAACCCGGAACCTGCTCGGAGACGACCAAA
 TCTACAACGTAGTTGTAACCGCACACGCAITTTGTAATAATCTTCTCATAGTAATACCAA
 TCATAATTGGAGGATTCGGTAACGACTGTTCCTTAATAATTGGTGCTCCCGATATAG
 CATTTCCTCCGAAATAATAATAAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCATTCTACTACTCC
 TCGCATCCTCTATAGTTGAAGCTGGGGCAGGAACAGGCTGAACCGTGATCCCTCCCTAG
 CAGGCAACCTAGCCCATGCAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCAITTTCTTTACACTTAG
 CAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCCATCAACTTATTACAACAATTATCAACATAAAGC
 CCCCGCAATGTCACAATACCAAAACCTCTGTTTCGTATGATCCGTAATAATTACCGCGG
 TACTACTACTCTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATCAATGCTATTAACAGAGCC
 GGAACCTAAATACAACCTTCTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCTATTCTATATCAAC
 ACTTATTCTGATTTTTGGACAYCCAGAAGTYTACCCTATAGTGAGTCGTRTWAAMTAAA-3'

Identification Summary:



Taxonomic Level	Taxon Assignment	Probability of Placement (%)
Phylum	Chordata	100
Class	Mammalia	100
Order	Artiodactyla	100
Family	Bovidae	100
Genus	Bos	100
Species	Bos taurus	100

Search Result: The submitted sequence has been matched to **Bos taurus**. This identification is solid unless there is a very closely allied congeneric species that has not yet been analyzed. Such cases are rare.

Geschäftsführer/
Managing Director:
Prof. Dr. Jörg Overmann
Aufsichtsratsvorsitzender/Head
Supervisory Board: RD Dr. David Schuppert

Braunschweigische Landesbank
Kto.-Nr./Account: 2 039 220
BLZ/Bank Code: 250 500 00
IBAN DE22 2505 0000 0002 0392 20
SWIFT (BIC) NOLADE 2 H

Handelssgericht/
Commercial Register:
Amtsgericht Braunschweig
HRB 2570
Spendenkto. 13/200/24030

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyad: Şükran Yılmaz

E.Posta: sukranyilmaz@gmail.com

Sukran.yilmaz@tariorman.gov.tr

Doğum tarihi: 23.08.1969

Yabancı Dili: İngilizce

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora : Eskişehir Osmangazi üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik ABD, 2013-2019

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, 2002-2005

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1985-1989

GÖREVLER/İŞ TECRÜBESİ

<u>Görev Dönemi</u>	<u>Unvan</u>	<u>Kurum</u>	<u>Bölüm</u>
10.07.2013- 11.09.2014	Teknik Koordinatör	ŞapEnstitüsü Müdürlüğü	Şap Enstitüsü Müd.
2006- Devam	Bölüm Başkanı	Şap Enstitüsü Müdürlüğü	Hücre Bankası Bölümü
2006-Devam	Koleksiyon sorumlusu	Şap Enstitüsü Müdürlüğü	Hayvan Hücre kültür Koleksiyonu (HÜKÜK)
2002-2006	Lab. Şefi	Şap Enstitüsü Müdürlüğü	Hücre Bankası Lab.
10/1998-2002	Biyolog	Şap Enstitüsü Müdürlüğü	Hücre Bankası Lab.
01/1997-10/1998	Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	Sınıf Öğretmenliği/Fen Bilgisi Öğretmenliği
04/1996-01/1997	Biyolog	Özel Yaşam Hastanesi	Biyokimya Lab.
12/1990-12/1993	Biyolog	Özel Tanı Labotuarı	Bakteriyoloji Lab.

ALINAN EĞİTİMLER

Tarih	Eğitim Türü	Eğitimci Kurum	Eğitim Konusu
2018	Kursiyer	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara	GMP Denetçiliği ve Denetim Teknikleri
2018	Kursiyer	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara	GMP'ye Uygun Temiz Oda Tasarımı ve HVAC Sistemleri
28-29 Şubat 2008	Kursiyer	İKEV	İlaç Endüstrisinde Biyofarmasötikler
04-05 Kasım 2006	Kursiyer	I.C.C.E Validasyon ve Eğitim, Danışmanlık Ticaret Ltd.Şti. İstanbul	Steril Operasyonlar, cGMP ve Hijyen
26-27 Mayıs 2006	Kursiyer	Hacettepe Üniversitesi	İmmünohistokimya Teknikleri
7-11 Temmuz, 2003	Kursiyer	TÜBİTAK Genetik Müh. ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze, İzmit	Enzim Purifikasyonunda Temel Yöntemler
12-27 Haziran 2003	Kursiyer	Kalite Merkezi Mühendislik, Danışmanlık,Eğitim Ltd. Şti	ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi, Dökümantasyonu ve Süreç Yaklaşımı
19-21 Haziran 2003	Kursiyer	Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta	Hücre Kültürü Uygulamaları
1-4 Aralık 2002	Kursiyer	Leiden University, Hollanda	Klinik ve Farmasötik Endüstride Hücre Kültüründe Gelişmeler”
5-6 Aralık 2002	Kursiyer	Leiden University/ Hollanda	Biyoteknolojik Ürünler için İyi Üretim Uygulamaları (GMP)

VERİLEN EĞİTİMLER

1. “Hücre kültürlerinde Karakterizasyon”, Hücre Kültürü ve İzolasyonu Kursu, 2-5 Eylül 2019, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İzmir, Türkiye
2. “Hücre kültürlerinde Karakterizasyon”, Temel Hücre ve Primer Hücre Kültürleri Kursu, 21-25 Eylül 2010, EBİLTEM, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

3. “Hücre kültürlerinde Karakterizasyon”, Temel Hücre Kültürü ve Kök Hücre Teknikleri Kursu, 12-16 ekim 2009, EBİLTEM, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
4. “Hücre Kültürü Teknolojisi” , Biyomühendislik ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, 29 Mart 2007, Ankara, Türkiye.
5. “Hücre Kültürü Teknolojisi”, Biyokimya ABD, Fen bilimleri Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ), 29 Mart 2007, Ankara, Türkiye.
6. “Hücre kültürü teknolojisi”, Biyologların mesleki gelişim projesi, Laboratuar teknolojileri konulu eğitim programı, 1-2 Ekim 2005, Biyologlar Derneği, Ankara, Türkiye.
7. “Hücre kültürlerinde Karakterizasyon, Hücre kültürü teknolojisinde temel prensipler ve yapay organlar”, 24-26 Kasım 2004, EBİLTEM, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

BURSLAR

1. TÜBİTAK Doktora Sırası araştırma Bursu (01.09.2016 - 01.09.2017 (Bir yıl) , Almanya)The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Almanya
2. ICGEB (The International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology) Eğitim Bursu (10-14 Temmuz 2006, Brezilya) Hayvan Hücre Kültürlerinde Biyofarmosötiklerin üretimi, Federal University of Rio De Janerio, Brezilya
3. ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) Eğitim Bursu (23-26 Kasım 2004, Hollanda)*In vitro* Monoklonal Antikor Üretimi. Hollanda Aşı Enstitüsü, Bilthoven, Hollanda

ÖDÜLLER

1. En iyi Poster Ödülü
Aysun Kılıç Süloğlu, Şükran Yılmaz, Güldeniz Selmanoğlu, M.Turan Akay. Hiperisin aracılı fotodinamik terapinin HT-29 kolon adenokarsinom hücrelerinde fototoksik etkisinin araştırılması (The investigation of phototoxic effect of hypericin mediated photodynamic therapy in HT- 29 colon adenocarcinoma cells). IV.Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi. 13-16 Aralık 2012, Uludağ Üniversitesi, Bursa

2. Novartis İlaç San.A.Ş, 2010 -2011 Farmasötik Teknoloji Proje Destek Ödülü:
Zelihagül DEĞİM, Uzm. Ecz. Başaran MUTLU, Dinç EŞSİZ, Şükran YILMAZ, Levent ALTINTAŞ. SERM (Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri) Grubundan Raloksifen ve Tamoksifenin Lipozomal ve Nanopartiküler İlaç Şekillerinin Geliştirilerek in Vivo-in Etkinliklerinin İncelenmesi”
3. Novartis İlaç San.A.Ş, 2009-2010 Farmasötik Ve Medisinal Kimya İlaç Tasarım Ve Geliştirme Araştırma Ödülleri, Birincilik Ödülü
Fatma Gumus,,Gokcen Eren, Leyla Acık, Ayten Celebi, Fatma Ozturk, Sukran Yılmaz, Rahsan Ilıkcı Sagkan, Sibel Gur,, Aykut Özkul, Ayhan Elmalı, and Yalcın Elerman. Synthesis, Cytotoxicity and DNA Interactions of New Cisplatin Analogues Containing Substituted Benzimidazole Ligands
4. En İyi İkinci Poster Ödülü
Yılmaz, Ş., Akay, M.T. Detection of Integrin Receptor in Serial suspension Passages of BHK 21 Cell Culture. Biomed 2005, XIIth International Symposium on Biomedical Science and Technology, 20-23 September, İzmir, Türkiye
5. JAACT (Japanese Association for Animal Cell Technology) Yabancı Katılımcı Ödülü
E. Aslankaraoğlu, M. Gümüşderelioğlu, Ş.Yılmaz, N. Bingöl. Proliferation and Monoclonal Antibody Production of Hybridoma Cells Immobilized on Nonwoven Polyester Fabric Discs. JAACT 2002 Fuchu, 11- 15 September 2002, Tokyo, Japan.

PROJE DENEYİMLERİ

1. Katyonik Amfifilik İlaçların Lizozomotropik Etkinlik Bakımından İncelenmesi, 3001 - Başlangıç AR-GE, Danışman, Yürürlükte. TÜBİTAK Proje No: 118S026, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, (ARDEB, 05.01.2018, 05.01.2018) - Still continues, 01.06.2018 - 01.06.2020 (Danışman).
2. Endüstriyel Boyutta Şap Aşısı Üretiminde Serumsuz Vasat Kullanımı. Proje no: TAGEM/HSGYAD/16/A02/P02/72. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (2016-31.12.2019) (Proje Lideri)
3. Ağız yoluyla verilebilen hedeflendirilmiş antikanser ilaçların etkinliklerinin artırılması için nanotaşıyıcıların kullanılması - imatinib-deksketoprofen ve erlotinib-deksketoprofen

- içeren nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının fibrosarkomalı fareler üzerindeki etkilerinin araştırılması, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Sonuçlandı, MAG - Mühendislik Araştırma Destek Grubu. TÜBİTAK Proje No: 213M675. (ARDEB, 20.12.2013, 23.09.2014), 15.06.2016, 01.07.2014 - 01.07.2016 (Bursiyer).
4. Embriyonik Kök Hücre ve İnsülin Taşıyan Lipozom, Nanopartikül ve Kohleat Formülasyonlarının Geliştirilerek Etkinliğinin İncelenmesi, 1002 - Hızlı Destek, Sonuçlandı, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, TÜBİTAK Proje no: 112S405 (ARDEB, 27.09.2012, 01.02.2013), 01.02.2013 - 01.02.2014 (Araştırmacı/Uzman).
 5. Raloksifenin hücre külltürlerinden absorpsiyon özelliklerinin incelenmesi ve yeni formülasyonları geliştirilerek etkinliğin artırılması. TÜBİTAK Proje no: 109S221 (SBAG-HD-438) (2009-2010) (Yardımcı Araştırmacı).
 6. Yeni bazı 2-süstitübenzimidazol ligantı taşıyan platin komplekslerinin sentez, in vitro sitotoksik etki ve DNA ile etkileşim çalışmaları. Proje no: 02/2007-24. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. (2007-2010 (Yardımcı Araştırmacı).
 7. Yaşlandırma işleminin farklı silikon elastomerlerinin sitotoksitelerine etkisi. . Proje no: 03/2007-23. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. (2007-2009) (Yardımcı Araştırmacı).
 8. Vajinal Uygulamaya Yönelik Olarak Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Düzeyleri Farklı Lactobacillus gasseri Suşları İçeren Tabletlerin Hazırlanması, Teknolojik ve Biyolojik Açıdan Değerlendirilmesi, 1002 - Hızlı Destek, Sonuçlandı. SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, TÜBİTAK Proje no:107S447, (ARDEB, 06.08.2007, 06.08.2007), 01.04.2008 - 01.04.2009. (Araştırmacı/Uzman).
 9. Rivastigmin'in CaCo-2 hücrelerinden penetrasyonunun araştırılması. Proje no: 02/2006-17. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. (2007 – Ocak 2008). (Yardımcı Araştırmacı).
 10. Şap Virusü Üretimi Amacıyla Soy Bean Peptonlu Vasatlarda BHK 21 Hücre Kültürlerinin Üretilmesi, Proje numarası; TAGEM, HS140105110, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, (TAGEM), Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı, (2005- 2009) (Proje Lideri).
 11. A/Aydın 98 Şap Virusuna Karşı Monoklonal Antikor Panelleri Üretilmesi ve Karakterizasyonu; Proje numarası; TAGEM/HS/14/01/05/112, Tarımsal Araştırmalar

Genel Müdürlüğü, (TAGEM), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, (2005- 2009) (Yardımcı Araştırmacı).

12. Şap virusunun üretiminde kullanılan BHK 21 hücre kültüründe integrin reseptörünün saptanması; Proje numarası; TAGEM, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, (TAGEM), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, (2004- 2006) (Proje Lideri)

YAYINLAR

Kitap Bölümü

Rahsan Ilıkcı Sagkan, Feray Kockar, Ali Sengul, Sukran Yilmaz, Ugur Musabak., 2018, Inhibition Effect Of Tnf α on Caix Expression in Ht-29 Colon Carcinoma Cells and The Relationship of This Cytokine With Cell Cycle. Academic Researches In Health Sciences, P. 63-74, Publisher: gece.

Poster Sunumları

1. Şükran Yılmaz, Aydın Coşkuner, Taibe Arsoy, Ali Özdemir, Hilal Parlak, Müslüm Kaan Arıcı, Sadık Onur Karaçam. Cultivation of suspended BHK 21 cells in batch production process by using serum-free and serum-containing media. 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), July 26-30,2018, Podgorica, Montenegro
2. Aysun Kilic Suloglu, Sukran Yilmaz, Guldeniz Selmanoglu, M.Turan Akay. Investigation of the phototoxic effects of Hypericin-mediated photodynamic therapy on HT-29 colon adenocarcinoma cells. IV Multidisciplinary Cancer Research Congress. December 13-16, 2012, Bursa, Turkey.
3. C.Yucel, Z.Degim, S.Yilmaz. Evaluation of nanoparticle formulation of doxycycline and investigation transport properties through CACO-2 cell line. 18th International Symposium on Microencapsulation. September 12-14, 2011, Antalya, Turkey.
4. A.Kilic, S.Yilmaz, G.Selmanoglu and M.T.Akay. Does hypericin alter the expression of anti-adhesion molecule dysadherin and immunolocalization of fibrous actin in caco-2 cells?. 36th FEBS Congress, June 25-30, 2011, Torino, Italy.

5. R.I.Sagkan, F.Kockar, Ali Sengul, S.Yilmaz and U.Musabak. Analysis of tumor associated transmembrane enzyme CAIX in HT-29 cells by flow cytometry. 36th FEBS Congress, June 25-30, 2011, Torino, Italy.
6. N.Basaran Mutlu, Z. Degim, S.Yilmaz, D. Essiz. Development of liposome formulation of rivastigmine with enhancers and investigation of transport properties through MDCK cell line. 15th IPTS, Advanced Therapeutic Systems from Innovative Technology to Commercialization. 2010, Ankara, Turkey.
7. A.B.Özcelik, S.Utku, A.Çelebi Keskin, L.Acik, S.Yilmaz, A.Ozgunor, F. Gumus. Cytotoxicity and DNA interactions of some Platinum (II) complexes with Benzimidazole ligands. Third International Meeting On Pharmacy-Pharmaceutical Sciences (Impps-3) , June 9-12,2010 İstanbul-Turkey
8. Zelihagul Degim, N.Basaran Mutlu, Sukran Yilmaz, Dinc Essiz. Development of liposome formulation of rivastigmine and investigation of transport properties through MDCK and CACO-2 cell lines. 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences, October 26-28, 2009, Antalya Turkey.
9. S.Yilmaz, N.Ozdural, M.Alkan, T.Arsoy, Y.Gultekin, M.Cengiz. Development of serum-free medium with soybean pepton efor study of foot-and-mouth disease virus in suspension BHK 21 cells. Life's Molecular Interactions. 34st FEBS Congress, July 4-9, 2009, Czech Republic
10. N.Basaran Mutlu, Zelihagul Degim, Sukran Yilmaz, Dinc Essiz. . Investigation of rivastigmine transport through MDCK Cell line. 14th IPTS, Overcoming Biological Barriers in Innovative Delivery Systems. September 6-10, 2008, Antalya, Türkiye.
11. N.Mutlu, Z.Degim, S.Yilmaz, D.Essiz, L.Altintas, G.Gunkaya. Investigation of rivastigmine transport through human colon carcinoma cells, CACO-2. 35th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. July 12-16, 2008, New York, NY U.S.A
12. Yilmaz, S., Akay, M.T., Unal, N., Aynagoz, G., Ozyoruk, F., Effect of change in surface expression of the alphaV beta3 integrin receptor of suspended BHK 21 cells on plaque character of foot-and-mouth disease virus, Molecules in Health and Disease, 31st FEBS Congress, 24-29 June, 2006, İstanbul, Türkiye
13. Yilmaz, S., Akay, M.T., Detection of integrin receptor in serial suspension passages of BHK 21 Cell Culture, Biomed, XIIth International Symposium on Biomedical Science and Technology, 20-23 September 2005, İzmir, Turkey

14. Hekimoglu Sueda, Yaziksiz-İscan Yonca, Unal Nilay, Yilmaz Sukran, Hincal A. Atilla., Evaluation of dermal irritation potential of DEET incorporated solid lipid particles in various vehicles by *in vitro* and *in vivo* studies. 1st EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in Drug Delivery, Sept. 29- Oct. 1, 2003, Versailles- France
15. Gurpinar, O.A., Onur, M.A., Yilmaz, S., Serdar, M.A., Unal, N., Tumer, A. Investigation of the effects of osteoblast/ β -TCP composites to therapy bone defects. IFMBE Proceedings, '2nd European Medical and Biological Engineering Conference, EMBEC'02 Part 2, December, 4-8, 2002, Vienna, Austria.
16. Aslankaraoglu, E., Gumusderelioglu, M., Unal, N., Yilmaz, S., MAB productivity of hybridoma immobilized on polyester fabrics. IFMBE Proceedings, '2nd European Medical and Biological Engineering Conference, EMBEC'02 Part 1, December, 4-8, 2002, Vienna, Austria.
17. Gurpinar, A., Onur, M.A., Yilmaz, S., Serdar, M., Unal, N. Bone marrow- derived osteoblastic cell culture on b-TCP Granules. Biomed IXth International Symposium on Biomedical Science and Technology, 19-22 September 2002, Kemer, Antalya, Turkey

Proceeding kitaplarında yayınlanan tebliğler

1. Ergün, G, Egilmez, F., Uctasli, S., Yilmaz, S., "Effect of reduced exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power LED," 12th Congress of the BASS, April, 12-14, Türkiye, (2007).
2. Biriken, D., Albayrak, N., Yilmaz, Ş., Özenci, H. Induction Of Cultured Human Monocytic THP-1 Leukemia Cells By Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. 1st Congress of the Society of Innate Immunity. Experimental and Clinical transplantation, 2007, Ankara, Turkey.
3. Ergün G. Egilmez F. Üçtaşlı MB. Yilmaz Ş. Effect Of Light Curing Type On Cytotoxicity of DBAs. 11th Congress of BaSS, 11-14 Mayıs 2006; Saraybosna, Bosna-Hersek.
4. Aslankaraoğlu, E., Gümüşderelioglu, M., Yilmaz, Ş., Bingöl, N. Proliferation and monoclonal antibody production of hybridoma cells immobilized on non-woven polyester fabric discs. 15th JAACT Meeting, 11-15 November 2002, Fuchu, Tokyo, Japan

Diğer Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Diren Sarısaltık, Zeynep Şafak Teksin, Şükran Yılmaz, 2018, Evaluation of biorelevant media to investigate the dissolution properties on flurbiprofen and to assess cytotoxicity effects on Caco-2 cell line. Istanbul J Pharm 48 (3): 82-88, DOI: 10.26650/IstanbulJPharm.2018.180013.
2. N.Başaran Mutlu Ağardan, Zelihağül Değim, Şükran Yılmaz. Development of Liposome Formulations of Tamoxifen and Assessment of Caco-2 Cell Transportation Properties. FABAD J. Pharm. Sci., 43(1), 1-6, 2018
3. Yücel Ç., Değim Z. , Yılmaz Ş. , 2016, Development of Cisplatin-loaded Liposome and Evaluation of Transport Properties Through Caco-2 Cell Line, Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, vol.13, pp.95-108.
4. Yücel Ç., Değim Z. , Yılmaz Ş., 2012. Nanoparticle And Liposome Formulation Of Doxycycline And Investigation Of Transport Properties Through Caco-2 Cell Lines", FABAD, Journal of Pharmaceutical Sciences, cilt.35, ss.191-194.
5. Gokcen EREN, Fatma GUMUŞ, Şukran YILMAZ. 2011. In vitro Cytotoxic Activities of Platinum (II) Complexes Containing 2 Acetoxymethyl and 2-(2'-Hydroxyethyl) benzimidazole Ligands. FABAD J. Pharm. Sci., 36, 69-73.
6. Sağkan R.I., F. Koçkar, Ş. Yılmaz, A. Şengül, U. Muşabak, 2011, "HT29 kolon karsinoma hücrelerinde CAIX ekspresyonunun akım sitometri ile gösterilmesi ve optimizasyonu", Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi (BİBAD), 4, 35-38.
7. Oya Bala, Hacer Deniz Arısu, Emin Türköz, Şükran Yılmaz. 2008. Farklı Polimerizasyon Şekillerinin ormoser esaslı rezin restoratif materyalin sitotoksitesi üzerine etkisi, in vitro. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 25(3): 31-37.
8. Fulya Karamustafa, Nevin Çelebi, Zelihağül Değim, Şükran Yılmaz. 2006. Evaluation of the viability of L-929 cells in the presence of Alendronate and Absorption enhancers. FABAD J.Pharm.Sci., 31, 1-5.

SCI, SSCI, AHCIİ İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Yeliz Hayran, Yasemin Keskin, Sukran Yılmaz, 2019, Cytotoxicity of polymethylmethacrylate copolymers. Annals of Medical Research. 26(9):1868-74. DOI: 10.5455/annalsmedres.2019.06.335

2. Yücel, Ç., Altıntaş, Y., Değim, Z., Yılmaz, Ş., Arsoy, T., Altıntaş, L., Can Çokçalıskan, and Sözmen, M., 2019, Novel Approach to the Treatment of Diabetes: Embryonic Stem Cell and Insulin-Loaded Liposomes and Nanocochleates. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 19(7), 3706–3719. doi:10.1166/jnn.2019.16321
3. Çoban Ö, Değim Z, Yılmaz Ş, Altıntaş L, Arsoy T, Sözmen M., 2019, Efficacy of targeted liposomes and nanocochleates containing imatinib plus dexketoprofen against fibrosarcoma. *Drug Dev Res.*, doi: 10.1002/ddr.21530
4. Demirbolat, G. M., Altintas, L., Yılmaz, S., and Degim, I. T. 2018. Development of Orally Applicable, Combinatorial Drug-Loaded Nanoparticles for the Treatment of Fibrosarcoma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(5), 1398–1407. doi:10.1016/j.xphs.2018.01.006
5. Yücel Ç., Aktaş Y., Değim Z. , Yılmaz Ş. , Arısoy T., Altıntaş L., Çokçalışkan C., Sözmen M., 2018, Effects of insulin and embryonic stem cells loaded plga nanoparticles on pancreatic beta tc cells", *acta poloniae pharmaceutica*, vol.75, no.6, pp.1377-1389.
6. Eren G, Yılmaz S and Gumus F., 2017. In vitro Cytotoxic Activities of Platinum(II) Complex with 1-Methyl-2-(3'-hydroxypropyl)benzimidazole and 2-(3'-Hydroxypropyl)benzimidazolium Hexa- and Tetrachloroplatinate Salts. *Letters in Drug Design & Discovery*, 14. doi:10.2174/1570180814666171012163
7. Berrin Küçüktürkmen, Burcu Devrim, Ongun M. Saka, Şükran Yılmaz, Taibe Arsoy and Asuman Bozkır. Co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide by lipid-polymer hybrid nanoparticles and effects on glioblastoma cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017 june 29: 1-10. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1080/03639045.2016.1200069
8. Aysun Kılıç Süloğlu¹, Güldeniz Selmanoğlu, Şükran Yılmaz, Hande Canpınar. Comparison of phototoxic effects of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 and Caco-2 colon cancer cells, *Turk J Biol.* (2016) 40: 1202-1218. doi:10.3906/biy-1510-43.
9. Ağardan, N. B. M., Değim, Z., Yılmaz, Ş., Altıntaş, L., & Topal, T. The Effectiveness of Raloxifene-Loaded Liposomes and Cochleates in Breast Cancer Therapy. *AAPS PharmSciTech*. 2016 Aug;17(4):968-77. doi: 10.1208/s12249-015-0429-3. Epub 2015 Oct 16.
10. Semra Utku, Azime Berna Özcelik, Fatma Gumus, Sukran Yılmaz, Taibe Arsoy, Leyla Acik and Ayten Celebi Keskin. Synthesis, in-vitro cytotoxic activity and DNA

interactions of new dicarboxylatoplatinum(II) complexes with 2-hydroxymethylbenzimidazole as carrier ligands. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. November 2014, Volume 66, Issue 11, pages 1593–1605. doi: 10.1111/jphp.12290.

11. N. B. Mutlu Agardan, Z. Degim, S. Yilmaz. Antitumoral and MMP-2 inhibition activity of raloxifene or tamoxifen loaded nanoparticles containing dimethyl- β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. (2014) 80:31–36. DOI:10.1007/s10847-014-0395-5.
12. Cigdem Yücel, Zelihagül Degim, Sukran Yilmaz. Nanoparticle and liposome formulations of doxycycline: Transport properties through Caco-2 cell line and effects on matrix metalloproteinase secretion. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67 (2013) 459–467. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.03.001.
13. Advije Gulcin Sagdicoglu Celep, Sukran Yilmaz and Nursen Coruh. 2012. Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of *Aesculus hippocastanum* on Breast Cancer MCF-7 Cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 20, No. 3, 692-698. DOI: 10.6227/jfda.2012200318.
14. Azime Berna Ozcelik, Semra Utku, Fatma Gumus, Ayten Celebi Keskin, Leyla Acik, Sukran Yilmaz, and Adeviye Oztungor. Cytotoxicity and DNA interactions of some platinum (II) complexes with substituted benzimidazole ligands. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2012 Jun;27(3):413-8. DOI: 10.3109/14756366.2011.594046.
15. Mutlu NB, Degim Z, Yilmaz S, Essiz D, Nacar A. New perspective for the treatment of Alzheimer diseases: liposomal rivastigmine formulations. *Drug Dev Ind Pharm*. 2011 Jul;37(7):775-89. doi: 10.3109/03639045.2010.541262.
16. Ergun G, Egilmez F, Yilmaz S. Effect of reduced exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power led. *J Appl Oral Sci*. 2011 May-Jun;19(3):286-92. 10.1590/S1678-77572011000300019.
17. Z. Degim, N. B. Mutlu, S. Yilmaz, D. Essiz, A. Nacar. Investigation of liposome formulation effects on rivastigmine transport through human colonic adenocarcinoma cell line (CACO-2). *Pharmazie* 65 (2010) 1, 32-40.
18. Sibel Ilbasemis-Tamer, Sukran Yilmaz, Erden Banoglu, and Ismail Tuncer Degim. Carbon Nanotubes to Deliver Drug Molecules. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2010, 6, 20-27. doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.005.

19. S. Karaoğlanoğlu, N. Akgöl, Y. Orçun Zorba, N. Öz dabak, S.Yılmaz, N. Ünal and N. Seven. Cytotoxicity evaluation of seven different resin based restorative materials: in vitro study. *Materials Research Innovations* 2010 Vol.14 No 3. DOI: 10.1179/143307510X12719005364747.
20. Fatma Gumus, Gokcen Eren, Leyla Acik, Ayten Çelebi, Fatma Ozturk, Sukran Yılmaz, Raşan Ilikçi Sagkan, Sibel Gur, Aykut Ozkul, Ayhan Elmali, and Yalcin Elerman. Synthesis, Cytotoxicity, and DNA Interactions of New Cisplatin Analogues Containing Substituted Benzimidazole Ligands, *J. Med. Chem.* 2009, 52, 1345–1357. doi: 10.1021/jm8000983.
21. Bilge Turhan Bal, Handan Yılmaz, Cemal Aydin, Secil Karakoca, Sukran Yılmaz . In vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: Effect of accelerated aging. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009 Apr; 89(1):122-6. doi: 10.1002/jbm.b.31194.
22. Kutlu Gokhan Ozdemir, Handan Yılmaz, Sukran Yılmaz. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 4 Nov 2008, Volume 90B Issue 1, Pages 82 – 86. doi: 10.1002/jbm.b.31256.
23. Ergun G, Egilmez F, Uctasli MB, Yılmaz S, Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *International Endodontic Journal*, 39, 1–8, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2007.01225.x.
24. Nalcaci, A., Oztan, M.D., Yılmaz, S. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. *International Endodontic Journal*, 2004, 37(2), 151-156. DOI: 10.1111/j.0143-2885.2004.00779.x.
25. Oztan, MD., Yılmaz, S., Kalayci, A., Zaimoglu, L. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2003, 30, 426-429. DOI: 10.1046/j.1365-2842.2003.01053.x