

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Spodoptera exigua* pkg GENİNİN ANTİSENSE RNA İLE SUSTURULMASINA
YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve KONGUR

**KASIM 2010
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Spodoptera exigua* pkg GENİNİN ANTİSENSE RNA İLE SUSTURULMASINA
YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

Merve KONGUR

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 1 Kasım 2010
Tezin Savunma Tarihi : 26 Kasım 2010**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hamdi ÖĞÜT**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“*Spodoptera exigua* pkg geninin antisense RNA ile susturulmasına yönelik çalışmalar” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benden esirgemeyen ve tüm imkanları sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve tez jüri üyelerinden Doç. Dr. Hamdi ÖĞÜT hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarından istifade etmemi sağlayan Wageningen Üniversitesi (Hollanda), Viroloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Just M. VLAK’a, Doç. Dr. M. Monique Van OERS’e ve Stineke Van HOOTE’a, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman inanan ve varlıklarıyla bana her zaman güç veren sevgili anneme, babama ve bu tezin hazırlanması sırasında manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ercüment OVALI’ya ve Prof. Dr. Asım ÖREM’e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Merve KONGUR
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Baculoviridae	1
1.1.1. Bakülovirüslerin Replikasyon Siklüsü ve Yapısı	2
1.1.2. Genomik Organizasyon ve Viral Proteinler	5
1.1.3. Bakülovirüs Uygulamaları	6
1.2. Böceklerdeki Davranış Değişiklikleri	7
1.2.1. <i>for</i> Geninin Davranış Değişikliğindeki Rolü	7
1.2.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2.3. <i>Apis mellifera</i>	8
1.2.4. <i>Pheidole pallidula</i>	8
1.3. Patojen Davranış Değişikliğinin Sebebiyeti	9
1.3.1. <i>Paragordius tricuspidatus</i>	9
1.3.2. Kuduz Virüsü	10
1.3.3. Kakugo Virüsü (KV)	11
1.3.4. Bakülovirüs	11
1.5. <i>Spodoptera exigua</i> Çizgili Yaprak Kurdu	12
1.6. <i>for</i> Geni ve Hiper mobilite	13
1.6.1. PKG'nin Yapısı	14
1.7. Antisens Teknolojisi	14
1.7.1. RNA İnterferans (RNAi)	15
1.8. Çalışmanın Amacı	16

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1.	Materyaller.....	17
2.1.1.	Kimyasallar ve Besiyerler.....	17
2.1.2.	Ticari Kitler ve Enzimler.....	17
2.1.3.	Hücreler, Plazmidler ve Virüsler.....	17
2.1.4.	Primerler.....	18
2.1.5.	Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	18
2.2.	Metod.....	19
2.2.1.	Hücrelerin Üretilmesi.....	19
2.2.2.	<i>Spodoptera exigua pkg</i> Geninin dsRNA Kodlayan AcMNPV ile Susturulması..	19
2.2.3.	Hairpin (Firkete) Yapıyı Taşıyan Bacmidlerin Oluşturulması.....	20
2.2.3.1.	Hairpin Oluşturacak <i>pkg</i> Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	20
2.2.3.2.	Hairpin Oluşturacak <i>gfp</i> Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	21
2.2.3.3.	PCR ürünlerinin Gateway Transfer Vektörüne (pDONR207-765 ng) Klonlanması.....	22
2.2.3.4.	Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması.....	23
2.2.3.5.	Elektrotransformasyon.....	23
2.2.3.6.	<i>pkg</i> ve <i>gfp</i> Genlerini Taşıyan Rekombinant Klonların Koloni PCR ile Seçilmesi.....	23
2.2.3.7.	Pozitif Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu.....	24
2.2.3.8.	Gateway-Transfer Vektöründeki Genlerin Gateway-Hedef Vektöre (pET28a-GW1a+2) Klonlanması ve Koloni PCR ile Klonların Seçimi.....	24
2.2.3.9.	Rekombinant Hedef Vektörlerden Plazmid DNA İzolasyonu ve Bunların Restriksiyon Analizi.....	26
2.2.4.	pFastBac Dual Vektörüne OpMNPV ie1 Promotorunun Klonlanması.....	26
2.2.4.1.	OpMNPV ie1 Promotorunun PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	27
2.2.4.2.	OpMNPV ie1 Promotor Bölgesinin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması....	27
2.2.4.3.	Miniprep Plazmid DNA İzolasyonu.....	28
2.2.5.	pFastBac Dual ie1 Vektörünün Oluşturulması.....	29
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	<i>pkg</i> ve <i>gfp</i> Genlerine Karşı dsRNA Kodlayan AcMNPV Virüsü ile Koenfeksiyon.....	31
3.2.	Hairpin oluşturacak <i>pkg</i> Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	34
3.3.	Hairpin oluşturacak <i>gfp</i> Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	34
3.4.	Gateway Klonlama.....	35

3.4.1.	BP Reaksiyonu.....	35
3.4.2.	LR Reaksiyonu	35
3.5.	pFastBac Dual Vektörüne OpMNPV ie1 Promotorunun Klonlanması	36
3.5.1.	OpMNPV ie1 Promotorunun PCR Aracılığıyla Çoğaltılması	36
3.5.2.	OpMNPV ie1 Promotor Bölgesinin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması	37
3.5.3.	pFBD ie1 Vektörünün Oluşturulması	38
4.	TARTIŞMA	40
5.	SONUÇLAR.....	44
6.	ÖNERİLER.....	45
7.	KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bakülovirüslerle enfekte olan böceklerde enfeksiyon sonucu bazı davranışsal değişiklikler meydana gelir. Bu davranışsal değişimler böceğin aşırı aktif hareketi ve bulunduğu yerin dikey doğrultusunda (bitkinin) en üst noktaya tırmanması şeklindedir. Virüs enfeksiyonu sonucunda böcekte meydana gelen davranışsal değişikliklere neden olan mekanizmaların çoğu bilinmemektedir. Bu çalışmada virüsün konak canlıda oluşturduğu davranış değişikliğinden sorumlu olduğu düşünülen cGMP protein kinaz (*pkg*) geninin rolü incelenmiştir. *for* geninin *Drosophila melanogaster* ve *Apis mellifera* gibi bazı farklı böceklerde, yem arama davranışını ve hareket kabiliyetini sağladığı gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı *Spodoptera exigua* *pkg* geninin RNA interferans tekniği kullanılarak baskılanması ve *pkg* geninin konağın davranış değişikliğindeki rolünün aydınlatılmasıdır. Çalışmada öncelikle *gfp* ve *pkg* genlerinin, gene özgü dsRNA üreten AcMNPV virüsü ile susturulduğu tespit edildi. Bu amaçla hedef genlere (*pkg* ve *gfp*) karşı dsRNA üreten AcMNPV bakmidleri ayrı ayrı *gfp* ekspresyonu yapan rekombinant AcMNPV ile Sf-9 hücrelerine birlikte enfekte edildiler. Ko-enfeksiyon sonucunda 3. ve 4. gün de *pkg* ve *gfp* genlerinin susturulduğu belirlenmiştir. Bu deneyi takiben *pkg* geninin susturulmasında daha farklı sistemlerin test edilmesi amacı ile *pkg* genine karşı firkete yapısında dsRNA üreten bakmidin inşası için gerekli plazmid vektörler hazırlanmıştır.

Bu çalışmada aşırı aktif hareket etme davranışına etkide bulunması muhtemel konak proteinlerin araştırılmasına katkı sağlayacak viral bakmid sisteminin oluşturulmasında kullanılacak teknolojinin tasarımı hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakülovirüsler, *Spodoptera exigua*, cGMP protein kinaz (*pkg*) geni, RNA interferans

SUMMARY

Study towards knockdown of *Spodoptera exigua pkg* gene by antisense RNA

As a result of infection, some behavioural changes occur in insects infected with baculoviruses. These behavioural changes include hypermobility and climbing the top of the plant. The mechanisms, by which the virus infection induces this behavioural change, are largely unknown. In this study, the role of cGMP protein kinase (*pkg*) gene thought to be responsible from behavioural changes occurred in host induced by the virus have been examined. It is shown that *for* gene provided food searching context and mobility in different insects, such as *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*.

The aim of the study is to silence *Spodoptera exigua pkg* gene and determine the role of *pkg* gene in the behavioural response of the host. In the study initially, it is detected that *pkg* and *gfp* genes were down regulated with AcMNPV bacmid producing dsRNA against these genes. For this purpose, AcMNPV bacmids expressing dsRNAs against target genes (*pkg* and *gfp*) separately co-infected with recombinant AcMNPV expressing *gfp* to Sf-9 cells. As a result of the infection, it was determined that *pkg* and *gfp* genes were successfully down regulated in the 3 d.p.i and the 4 d.p.i, respectively. Following these experiments, in order to test different systems for down regulating *pkg* gene, the plasmid vectors necessary for constructing bacmid producing dsRNA at hairpin structure against *pkg* gene.

In this study it is aimed to design the technology that will be used for the production of viral bacmid system potentially useful for understanding the mechanism involving hypermobility behaviour in host insects larvae's upon viral infection

Key Words: Baculoviruses, *Spodoptera exigua*, cGMP protein kinase (*pkg*) gene, RNA interference

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Tomurcuklanan virüs (BV) ve inklüzyondan gelişen virüs (ODV) yapısı.....	3
Şekil 2. Bakülovirüs enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi	4
Şekil 3. Gateway-Transfer Vektörü	22
Şekil 4. Gateway-Hedef Vektörü.....	25
Şekil 5. pFastBac Dual Vektörü	26
Şekil 6. pJET1.2/blunt Vektörü	28
Şekil 7. Düşük bakmid enfeksiyonu durumunda <i>pkg</i> geninin dsRNA kullanılarak susturulması	32
Şekil 8. Yüksek bakmid enfeksiyonu durumunda <i>pkg</i> geninin dsRNA kullanılarak susturulması	33
Şekil 9. PCR ile çoğaltılmış <i>S. exigua pkg</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	34
Şekil 10. PCR ile çoğaltılmış <i>gfp</i> geninin agaroz jel görüntüsü	34
Şekil 11. Koloni PCR ile belirlenen pozitif klonların agaroz jel görüntüsü	35
Şekil 12. <i>NsiI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET28a-GW1a+2, <i>pkg</i> ve <i>gfp</i> 'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	36
Şekil 13. PCR ile çoğaltılmış OpMNPV ie1 promotorunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü	37
Şekil 14. <i>XhoI/NsiI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pJET1.2/blunt ve ie1'in %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	38
Şekil 15. <i>XhoI/NsiI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pFBD <i>polh</i> Δ <i>p10</i> vektörü ve ie1'in %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	39

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Bakülovirüs'lerin Sistematiği.....	2
Tablo 2. <i>pkg</i> ve <i>gfp</i> genlerinin susturulması için tasarlanan primerler.....	18

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AcMNPV	: <i>Autographa californica</i> Multikapsid Nukleopolihedrovirüs
bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>dnapol</i>	: DNA polimeraz geni
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
dsRNA	: Çift zincirli ribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal bovine serum
<i>gfp</i>	: Yeşil floresan protein
LB	: Luria Bertani
MOI	: Multiplicity of infection
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TE	: Tris-EDTA Tamponu
UV	: Ultraviyole

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Baculoviridae

Bakülovirüsler ilk olarak ipek üreticilerinin korkulu rüyası polihidrozo hastalığının muhtemel nedenlerinden biri olarak ortaya çıkmıştır. Hastalık adını enfekte ipek böceği larva hücrelerinde gözlemlenen çokyüzlü yansıtıcı parçacıklardan almıştır. Bu çok yüzlü parçacıkların varlığı 1940'da elektron mikroskopisiyle kanıtlanmıştır (Bergold vd., 1947).

Bakülovirüs'ler, böceklerde sık sık öldürücü hastalıklara ve hastalık salgınlarına sebep olan büyük bir böcek virüsü grubudur. Bu virüse ait virionlar gömülü yapılar olarak adlandırılan proteinden meydana gelmiş yapılar içerisine gömülür. Bakülovirüs'ler, çoğunluğu Lepidoptera, Hymenoptera ve Diptera ordolarına ait arthropodların larval dönemlerini enfekte eder (Federice, 1999).

İnküzyon yapılarına göre baculovirus'ler *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) ve *Granulavirus* (GV) olmak üzere iki genusa ayrılır (Theilmann vd., 2005) (Tablo 1). Polihedrin proteininden meydana gelen bir yapı içerisine gömülen NPV'ler de morfolojik olarak her virionda bulunan nükleokapsid sayısına göre iki gruba ayrılır. Multinükleopolihedrovirüs (MNPV)'ler her virionda birden fazla nükleokapsid ihtiva ederken, single nükleopolihedrovirüs (SNPV)'ler her virionda bir nükleokapside sahiptir. Hem MNPV hem de SNPV'ler her gömülü yapı içerisinde çok sayıda virion ihtiva edebilirler. Granülün proteinden meydana gelen bir yapı içerisine gömülen GV üyeleri, morfolojik olarak NPV üyelerinden rahatlıkla ayrılabilir. NPV'ler yoğun bir kristal yapı halinde ve polihedron şeklinde iken, GV'ler bir granül görünümünde ve oval-silindirik yapıdadır. GV'ler her gömülü yapıda sadece tek bir virion ihtiva eder.

Son yıllarda, birkaç korunmuş gen (polihedrin/granülün, geç zorunlu faktör-2 ve DNA polimeraz) ve tüm genomun filogenetik analizlerine göre NPV'ler grup I ve grup II olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Buna göre, tomurcuklanan virüs (BV)'lerden zarf füzyon proteini olarak GP64'e sahip olanlar Grup I NPV'ler ve fonksiyonel olarak bu proteine homolog olan F proteini ihtiva edenler de Grup II NPV'ler olarak gruplandırıldı. (Herniou vd.,2001; Zanotto vd., 1993).

AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus), alfa baculoviridae Grup I türüdür ve en geniş kapsamlı araştırılan bakülovirüstür. Bütün bu

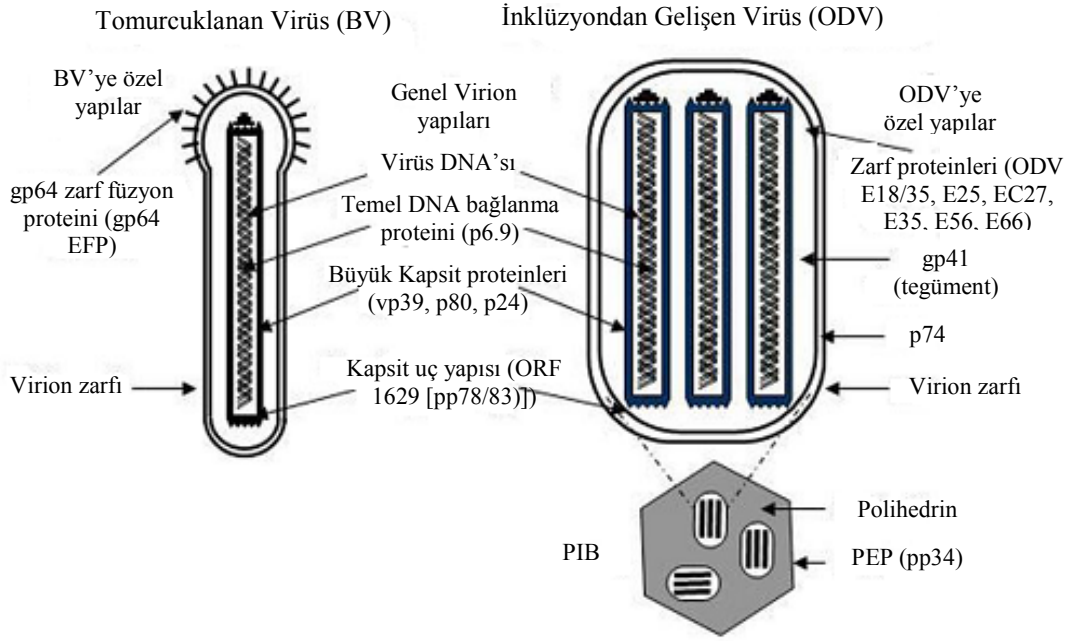
detaylı araştırmalar nedeniyle AcMNPV bu tezde virüs modeli olarak seçilmiştir be Baculoviridae familyasını temsil etmek için kullanılacaktır. Ayrıca bakülovirüsler arasında farklılık olduğu da bilinmektedir.

Tablo 1. Bakülovirüs'lerin Sistematığı

Familiya	Genus	
<i>Baculoviridae</i>	<i>Nucleopolyhedrovirus</i> (NPV)	Multinükleopolihedrovirüs (MNPV) örnek, <i>Autographa californica</i> MNPV (AcMNPV)
		Singlenükleopolihedrovirüs (SNPV) örnek, <i>Trichoplusia ni</i> SNPV (TnSNPV)
	<i>Granulavirus</i> (GV)	örnek, <i>Trichoplusia ni</i> GV (CdGV)

1.1.1. Bakülovirüslerin Replikasyon Siklusunu ve Yapısı

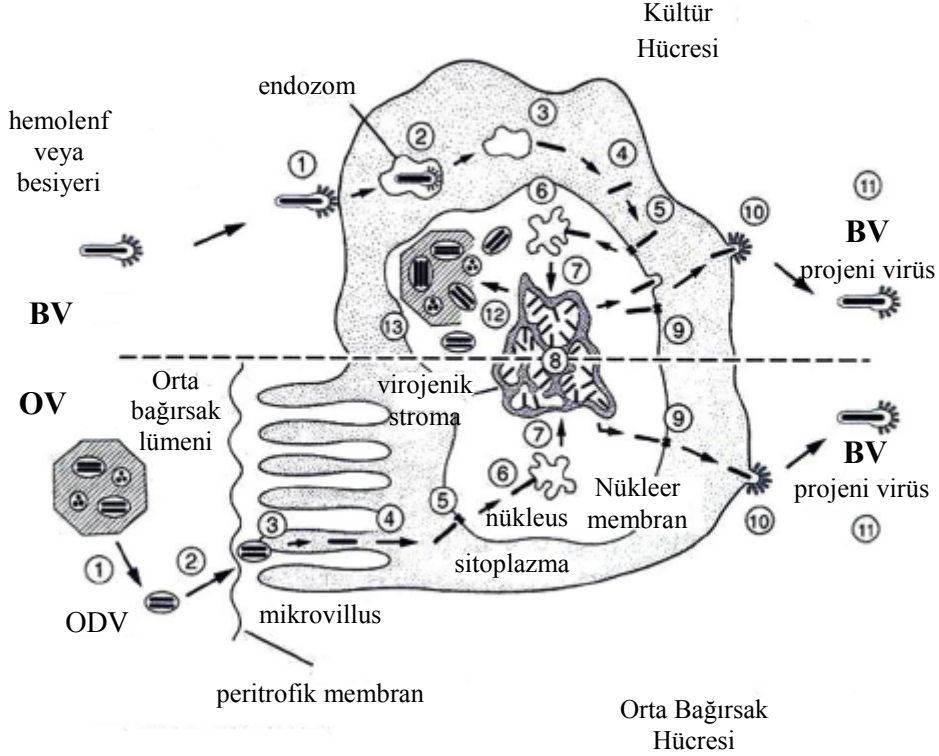
Bakülovirüs yaşam siklusu oklüzyon cisimleri (OB) ve tomurcuklanan (BV) virüsleri olmak üzere iki temel yol izler (Şekil 1). Siklus, oklüzyon cisimleri larva tarafından yenildiğinde başlar. Virüsler böceğin orta bağırsağına girene kadar sindirim borusunu takip ederler. Orta bağırsakta alkalın pH'tan dolayı polihedron çözülmeye başlar ve oklüzyon virüsleri (ODV) ortaya çıkar. Orta bağırsak yüksek pH'a sahip olan nadir bölgelerden biridir, OB'ler yüksek pH'ta çözülebildiklerinden bu da OB'nin orada bir konakçı tarafından yenene kadar sağlam kalacağını gösterir. Virüs daha sonra peritrofik membrana (PM) geçer; ancak bunun kendiliğinden mi yoksa başka bir şekilde mi olduğu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bazı çalışmalar polihedrada belli belirsiz bulunan bakteriyel proteazların bu prosese dahil olduklarını göstermiştir (Zummer vd., 1979). Virüsün PM'ye geçişinden sonra orta bağırsak epitel hücre enfeksiyonu oluşur (Şekil 2).



Şekil 1. Tomurcuklanan virüs (BV) ve inklüzyondan gelişen virüs (ODV) yapısı (Blissard, 1996)

Çoğu virüste olduğu gibi bakülovirüsler konakçıya girmek için hücre reseptörleriyle etkileşim içinde olan birkaç farklı proteini kullanırlar. Baculoviridae familyasında bu proteinler gastrointestinal epitelyal hücre enfeksiyonunda da bulunan -Per Os infektivite faktörleri (PIF) olarak adlandırılırlar. Bu ailenin başlıca üyeleri p74-pif, pif-1, pif-2 ve pif-3 tür. Bu proteinlerin birbirleriyle ve konakçıyla nasıl bir etkileşim içinde oldukları hala araştırılmaktadır (Peng vd., 2010). Bu proteinler sadece ODV membranlarında bulunurlar. Çünkü tomurcuklanan virüsler daha sonrada bahsedileceği gibi hücreleri farklı bir şekilde enfekte ederler. PIF'lerin konakçı hücreye bağlanım işlemi tamamlandığında, iki mebranın füzyonu hücre sitoplazmasına nükleokapsitin salınımıyla sonuçlanır (Rohrmann, 2008). Nükleokapsid başarılı bir şekilde hücrenin içine girdiğinde muhtemelen aktin polimerizasyon tarafından nükleusa gönderilir (Ohkawa vd., 2008). Nükleokapsitinin nükleer membrana nasıl geçtiği hala kesin olarak bilinmemekle beraber, büyüklükleri 30 ve 60 nm arasında değişiklik göstermesi nedeniyle 38 nm boyutunda olan nükleer gözenek kompleksinden geçmesi ihtimali söz konusudur. Nükleustaki genom yeni viral parçacıklar oluşturmak için ifade edilecek ve çoğaltılacaktır. İlk viral proteinler sentezlendikten ve genom kopyalandıktan sonra yavru virüs (BV form) üretimi başlar. Bunlar nükleusta nükleokapsid olarak oluşurlar ve viral protein GP16'nın faaliyetiyle NC

nükleustan dışarı yayılır. Daha sonra nükleokapsiti saran nükleer membran kaybolur ve virüs hücreden dışarı çıktıkça hücre membranıyla yer değiştirir.



Şekil 2. Bakülovirüs enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi (Friesen ve Miller, 2001)

Bu yayılma yüksek oranda GP64 ve F protein konsantrasyonlarının olduğu parçacıklar üzerinde oluşur. Bu proteinler yayılmanın gerçekleşmesi ve komşu hücrelere giriş için gerekli olan proteinlerdir. İlk enfekte hücreler olan orta bağırsak epitel hücrelerinde bu proteinler hücrenin bazal ve lateral bölgelerine yerleşirler (Keddie vd., 1989; Rohrmann vd., 2008). Bu durumun nükleokapsidlerin dayanıklı olan orta bağırsak yerine daha hassas olan hücelere gönderildiğini ve bu sayede viral yayılımı artırdığını açıkça gösterir. Normal hücrelerde bu şekilde yayılmazlar, ancak bu da önemli bir avantaj sayılmaz. Üretilen virüslerin komşu hücelere girişi GP64'ün bilinmeyen bir liganda bağlanmasıyla kolaylaşır. Bununla birlikte AcMNPV'de ki BV virüsleri de memeli hücreyi sağ kalımına girebildikleri için bu ligant koruma altındadır. Sistemik enfeksiyon bu şekilde oluşmuş olur ve daha sonraki aşamalarda virüsün son transkripsiyon faktörleri birçok farklı gen transkripsiyonlarını başlatır. Bu genlerden biri EGT'dir (ecdysteroid UDP-glukoz tranferaz). Bu protein bahsedilen ecdysteroidlere glukoz ilave ederek deri değişirme

hormonlarını etkisiz hale getirir ve deri değiştirmeyi geciktirir. Deri değiştirme ipek böceği için oldukça sıkıntılı bir dönemdir ve sistemik enfeksiyondan sonra birçok böcek bu dönemden sağ çıkamaz. Larva deri değişiminden önce yemeyi de kestiğinden gelişimi durur. Büyüme sürecinin uzaması da virüsün içine gelmektedir. Virüsün son dönemi oklüzyon cisimler (OB) oluşunca başlar. İlk olarak nükleokapsidi nükleer membranda çevreleyen oklüzyon virüsleri, BV ve ODV virüsleri arasındaki farklılıkları iyice artırarak oluşmaya başlar. Virionlar tamamlandığında bazıları P10 ve diğer proteinler OB'leri oluşturan ODV virüsleri etrafında polihedrin matriksi meydana getirirler. Bu matriks virüsü özellikle konakçının dışından gelebilecek olan abiyotik etkilere karşı korumak için işe yarar. Tırtıl lmek üzereyken kitin eksoskeletonu eriten kitinaz ve katepsin proteinleri belirir. Bu proteinler larvanın eridiğinin bir kanıtı ve bu da viral yayılımı genişletir çünkü artık böcek paramparça olmuştur. OB'ler açığa çıktıklarında başka bir konakçı tarafından yenip sıkls yeniden başlayana kadar kararlı kalabilirler (Rohrmann vd., 2008).

İlk viral proteinler üretildiğinde, viral genom büyür. Bu muhtemelen büyümenin başladığı yuvarlanan halka model aracılığıyla gerçekleşir ve başlama noktasını geçtiğinde bile DNA'yı bytmeye devam eder (Oppenheimer vd., 1997). Viral ve konakçı proteinlerin her ikisi de bu işlemde rol alırlar. Genomun büyümesi virojenik stroma denilen yerlerde oluşur. Bu yapıyı replike olmuş DNA ve virionun birlikte oluştuğu tahmin edilmektedir. Nükleusun 1.45 katlık artışının virojenik stroma sayesinde olduğu gözlenebilmektedir. Bunun viral üretim yapılandırılmasında rol oynayan aktin ve tubulin seviyelerindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir (Goley vd., 2006; Cheley vd., 1992).

1.1.2. Genomik Organizasyon ve Viral Proteinler

Bakülovirüs genomu 80 ile 180 kb arasında değişebilmektedir. Burada konu edilen AcMNPV virüsünün 134 kb byklğinde genomu vardır. Bu genomda yaklaşık 150 açık okuma zinciri (ORF) vardır. Diğer bütün virüsler gibi bakülovirüsler de genomlarından en üst seviyede faydalanırlar. Genlerin çoğu birbirleri ile üst üste gelir ve neredeyse hiç lüzumsuz DNA kalmaz. Genomda birkaç tane hrs (homolog bölgeler) bulunmaktadır. (Rohrmann vd., 2008).

Bakülovirüsler enfeksiyon başlangıcı için özellikle konak transkripsiyonu ve eviri translasyon sistemine ihtiyaç duyar. Konak RNA polimeraz II ya da protein kinaz

tarafından harekete geçirilen malum host mitojenin ayarı düştüğünde, virüs replikasyonu, transkripsiyonun engellenmesi ile durdurulur ya da aşırı derecede yavaşlatılır. Konakçı RNA polimerazı hrs de bulunan cAMP ve 12 O- tetradecanoylphorbol 13 asetatik yanıt elementlerini (CRE ve TRE) bağlayan konakçı faktörlerden etkilenirler. Bundan sonra konakçı düzeneği ilk viral transkripsiyonları oluşturur ve bunlarda ölü viral genleri harekete geçirir. Aynı anda virüs şifreli RNA polimeraz bakülovirüsüne geçiş yapar. Baculoviridae bu stratejiyi gerçekleştiren tek DNA virüs familyasıdır. Diğer sitoplazmatik DNA virüslerinin de kendi polimerazı vardır ancak onlar konak polimerazlar ve transkripsiyon faktörlerine direk ulaşamadıklarından dolayı kendilerine ait olanları kullanırlar. Bakülovirüs genomik DNA'sının transkripsiyonu herhangi viral protein olmadan başladığından transkripsiyonel aktivatörler ODV'lerin yapısında bulunur ve bu hızlı ve etkili enfeksiyon için oldukça önemlidir (Theilmann vd., 1993; Rohrmann vd., 2008).

Viral gen tanımı şu aşamalarla nitelendirilebilir; ilk başlangıç, başlangıç, son, en son. Bazı gen ve proteinler bu sınıflandırmaya göre isimlendirilir; örneğin ilk başlangıç grubunda olanlar "IE1" şeklinde isimlendirilmişlerdir. IE1 grubundaki genler transkripsiyonun önemli öncüsüdür ancak isminin aksine enfeksiyon boyunca aktiftirler.

1.1.3. Bakülovirüs Uygulamaları

Bakülovirüsler insan ve hayvanlara olan güvenirliliği ve konaklarının lepidopterayla sınırlı olması nedeniyle biyopestisid olarak kullanılmaktadırlar. Bu virüsler seralarda pestisid olarak oldukça etkilidirler. Bu yüzden bakülovirüslerden geliştirilen ticari ürün SPODX™ sebze ve çiçekleri haşerelerden korumada kullanılmaktadır (Szewczyk vd., 2006). Bakülovirüsler biyopestisid olarak faydalı olmalarına rağmen hayvanlara ya da çevreye toksisite yayan, besin zincirinde yığılmaya ve hayvanlarda direnç neden olan kimyasal pestisidler gibi dezavantajları yoktur (Mishra, 1998).

Bakülovirüslerin yaygın şekilde kullanıldığı bir diğer alan ise biyoteknolojik amaçlar için çok çeşitli proteinlerin yüksek derece ekspresyonunda kullanılan ekspresyon vektörleridir. Doğal şartlarda bazı proteinleri (polihedron ve p10) çok fazla üretebildiklerinden ökaryotik sistemde de memeli sistemi kullanım tehlikeleri olmadan fazla miktarda protein üretebilmek için oldukça uygundur. Yüksek ekspresyon doğal bir süreç olmasına rağmen transkripsiyon, translasyon ve en önemlisi post translasyonel

değişiklikleri (glikosilasyon, fosforilasyon ve katlanma) artırmak için araştırmalar hala devam etmektedir (Mishra, 1998).

1.2. Böceklerdeki Davranış Değişiklikleri

1.2.1. *for* Geninin Davranış Değişikliğindeki Rolü

Davranış, hayvanlar için, değişen şartlarla başa çıkarken hayatta kalmalarını sağlayan en önemli araçtır. Davranışın hayvanlarla sınırlı olduğu fikri, aslında karmaşık işaret girdileri, analizler ve sonuçlar gösteren bitkiler ve mikroorganizmalara da ayrılan bir dogmadır. Bazı bilim adamları bitkilerin zekaları hakkında bile tartışmaktadırlar (Trewaves vd., 2009).

En temel seviyede bakıldığında, davranış biyokimyasal sistem yolaklarındaki değişikliklerden meydana gelir. Bu birçok durumda belgelenmiştir, örneğin böceklerdeki davranışsal değişiklikler, bazı durumlarda, '*for*'a bağlanmıştır. Bu değişiklik böceğin davranışında ya da yiyecek arayışında sık sık meydana gelir. Bu davranışta parazitlerin ve mikroorganizmaların kendi avantajlarına olumlu bir etkisi olduğunun bulunması şaşırtıcı değildir. Ama bu etkiyi tartışmak için öncelikle davranışın kendi ev sahipliğinde nasıl değiştiğini bilmek zorundayız.

1.2.2. *Drosophila melanogaster*

Davranışsal düzenlemenin en iyi örneği meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) bulunmuştur. Bu böceğin larva ve yetişkinleri aktifler ve durgunlar şeklinde 2 davranışsal fenotip gösterir. Aktifler çok hareketlidirler ve yiyecek parçaları arasından çabucak geçebilirler. Durgunlar durağandırlar ve sadece yiyecek olmadığında aktiflere eşit olarak hareket ederler (Osborne vd., 1997).

Mutasyon çalışmalarıyla, *Drosophila* genomunda bulunan ve bağımsız protein kinaz kodlayan iki cGMP geninden biri olan *for*'un fenotipi belirlenmiştir. Sonraki araştırmalar PKG ve RNA protein seviyelerinin aktiflerde durgunlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir (Sokolowski vd., 1980; Osborne vd., 1997 ve 2001).

PKG'nin etkilediği, önerilen hareket mekanizması yiyecek kalitesi ve yiyecek arama stratejisini belirlemeyle ilişkilendirilir. Bir yetişkin sinek sukroz damlacığına beslenmek

için bırakıldığında, 30 saniye içinde aktiflerin hareketi ile, daha iyisini bulacaklarına ikna olmuş gibi tek sıra halinde yiyecekte ayrılırlar. Buna rağmen, durgunlar hareketi ile sineğin yüksek besin değeri kalitesinde olduğunu sanarak damlanın etrafını sarmaya çalışacaklardır. Doğada, aktif/durgun fenotipleri tam olarak %70 aktif ve %30 durgun olarak görülürler. Her iki fenotipde farklı durumlarda tercih edilebilir olmasından dolayı birbirinin varlığında zenginleşir. Yüksek yoğunlukta yetiştirme altında ya da besinin bol olduğu çevrelerde, fazla paylaşmasına gerek kalmadan iyi bir yiyecek bulma şansı daha fazla olduğu için aktifler allelinin seçildiği gözlenmiştir. Diğer yandan, düşük yoğunlukta besin altında ve tek tip yiyecek alanlarında yiyecek toplamak için daha az enerji harcadıklarından durgun daha tercih edilebilirdir (Osborne vd., 2001).

1.2.3. *Apis mellifera*

Bal arılarının (*Apis mellifera*) *for* benzeri, *Amfor*, da davranışsal hareketlerle ilişkilendirilir. Bu durumda, işçi (durgun) ve avcı (aktif) arasında farklar gözlenmiştir. Avcılar, meyve sineği aktif fenotipiyle benzer şekilde daha çok *Amfor* RNA düzeyine sahiptir.

İşçiler ve avcılar arasındaki tipik yaş farklılıklarını hariç tutmak için araştırmacılar, prekosiyo avcılar artsın diye varolan tüm avcıları önceden öldürerek değişimi işçiden avcıya sevk etmişler. Bu avcılar daha sonra aynı yaştaki işçilerden daha yüksek PKG mRNA seviyesine de sahip olmuşlar. PKG'nin doğrudan, seçici olarak PKG, 8-Br-cGMPyi aktive eden bir cGMP benzeri kullanarak yapılan davranışsal değişiklik içinde bulunup bulunmadığını araştırmak için son bir test yapılmış. 8-Br-AMP ile kontrolü karşılaştırıldığında, PKG seçici olarak aktive edildiği ve işçi bağımlı tutumda bir dozda avcı davranışları gösterdiği belirlenmiş. Bu, PKG'nin burada tekrarlayan davranışlarda bulunduğu da kabul edildiğini göstermiştir (Ben-Shahar vd., 2002).

1.2.4. *Pheidole pallidula*

Başka bir sosyal böcekte, kırmızı hasatçı karınca (*Pheidole pallidula*), *for* geni benzeri olan *ppfor* ifadesi işçi karıncanın davranışını da düzenler. Daha küçük işçiler yem ararken, daha büyük işçiler yuvayı korumak için yatkınlaştırılırlar. Hem küçük hem de büyük işçiler kovandan dışarıda çalışır ve aynı yaşta olgunlaşmaya ulaşırlar ama PKG

aktivite seviyeleri küçük ve büyük sınıflarda farklılık gösterir. Aktif fenotipin yüksek *for* seviyeleriyle ilişkilendirildiği meyve sineği ve bal arılarının aksine aktif karınca düşük *for* seviyelerine sahiptir.

Üsosyal böceklerin davranış çalışmalarında kullanmanın avantajı belli bir tipte incelenen bireyler doğru etki verildiğinde, davranışı değiştirebilmesidir. Lucas ve arkadaşları yem toplama ve savunma etkisiyle 2 tipi uyardı ve bir savunma ya da ‘major’ işaretiyle sunulduğunda PKG eyleminin yükseldiğini ve yem arama ya da ‘minor’ sinyaliyle düştüğünü görmüşlerdir.

İmmunokimya çalışmaları, minors ve majors arasındaki ifade örüntülerinde ince değişiklikler göstermiştir. Major’lar minorlarda olmayan beyin *for*’u ifade eden belli ön bölgelerine sahiptirler. Daha özel olarak, majorlarda reaktif olup minörlerde olmayan mantar vücut pedinkülü dışında ön yüzde kümelenmiş yaklaşık 5 hücre bulunmuştur. Mantar bölge ana duyumsal bütünleyici merkez olduğundan, bu farklılığın davranışsal fenotipe neden olması çok iyi olabilir (Lucas vd., 2009).

1.3. Patojen Kaynaklı Davranış Değişikliğinin Sebebiyeti

Davranış belirli parazitler tarafından değişikliğe uğratılabilir. Bu durum hastalık bulaşımını ve parazitin hayatta kalma süresini uzatabilmektedir. Bu konuda örnek çalışmalar yürütülmektedir. Örneğin, parazit yaban arısı *Hymenopimecis* konakçı örümceğin normal şartlarda sadece çiftleşme zamanı boyunca yaptığı koruyucu kozasını örmesine sebep olur. Larva bu kozada güven içerisinde pupa evresini geçirebilmektedir (Eberhard, 2000). Çoğu parazitler yem arama, hareket yeteneği, genel aktiviteleri etkileyerek konakçı davranışı üzerinde çok daha az önemli etkiye sahiptir. Bu durumların küçük bir kısmı moleküler biçimde incelenmekte ve sonuç olarak davranış değişikliği üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu hakkında çok az şey bilinmektedir. Aşağıda bazı patojenler ve bunların neden oldukları davranış değişiklikleri tartışılmıştır.

1.3.1. *Paragordius tricuspidatus*

P.tricuspidatus cırcır böceklerine hastalık bulaştırıcı bir tür kıl kurdudur. Bir kez hastalık bulaştığında cırcır böcekleri hastalık bulaşmamış olanlarında görülmeyen amaçsızca dolaşma davranışı sergilerler. Parazit, hastalık bulaştırmaya hazır olduğunda

cırcır böceği suya sempati duyar ve kendini boğarak parazitten kurtulur. Thomas ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada enfeksiyon durumunda cırcır böceğinin beyindeki psikolojik ve histomorfolojik değişimleri analiz etmeye çalışmıştır (Thomas vd., 2002). Saptanan çoğu değişiklik üreme ya da çevre faktörüyle ilintilidir (örn. Gündüz/gece). Torinin amino asit yoğunluğunda ve daha küçük çapta valine ve de tirozindeki değişimlerin davranış değişikliğiyle ilintili olduğu incelenmiştir. Fakat deneysel kurulumdan dolayı bu etkilerin dış etkenlerden kaynaklandığı gerçeği de göz ardı edilemez. Torin, mantar gövdelerindeki nöro yayılıma dahil olan böceklerde yaygın bulunan bir nöron uyarıcıdır. Nörotransmitter eksitasyon azaltımı ve nöromodülatör nitelikleri içermektedir ve memelilerde nörol üremeyi tetiklediği bilinmektedir. Enfeksiyonlu cırcır böceği beyinleri temel olarak yeni inter nörona dönüştüren nörojenezleri de göstermektedir. Bu sonuçları birleştirerek torin derecelerinin ve nörojenezin davranış değişikliğiyle bağıntılı olduğu hipotezi ortaya koyulmuştur fakat bunların parazit tarafından direkt olarak etkilenip etkilenmediği hala bilinmemektedir (Thomas vd., 2002).

1.3.2. Kuduz Virüsü

Davranış değişikliğine sebep veren en çok bilinen virüs durumu kuduzdur. Kuduz, en fazla endotermal hayvanları etkileyebilen negatif polariteli tek iplikli RNA virüsüdür. Bir kez enfeksiyon kapıldığında paralitik (atık) ve ensofalitik (asabi) olarak adlandırılan yan etkiler görülmeye başlar. Kızgın hayvanlar anında aşırı tükürük salgılama ve saldırgan davranışları sergilerler. Bu semptomlar enfeksiyonlu yaralar vasıtasıyla viral yayılımı artırır. Bu virüs beyindeki belirli nörol alıcıları azalttığından bu sadece bir yan etki değildir. Bir kez vücuda girdiğinde virüs hücrenin iç dengesini ve hayvan enfeksiyon durumunda olduğu sürece nöronu öldürmeden her bir hücreyi teker teker sinyal vermeden değiştirir. Bu etki, kendileri etki altına girmemiş ama bir çeşit ikinci haberci tarafından etkilenmiş beyin hücrelerinde fark edilebilir durumdadır. Bu da gösterir ki bu durum tamamen hücredeki direk viral varlık tarafından olmamaktadır. Saldırganlık ve aşırı tükürük salınımı apaçık bir biçimde virüs için yarar sağlamaktadır. Fakat onların yan etki mi yoksa asıl etki mi olduğu henüz açıklık kazanmamıştır. Bu iki semptomun yanı sıra hayvan iştahını kaybeder ve kordinasyon eksikliği çeker. Bunlar viral yayılımı artırmaz ve bu yüzden viral müdahalenin yan etkisi olarak kabul görürler. İlginçtir ki virüsün yayılımı

paralitik ve ensefalitik kurbanlardakiyle aynıdır. Son çalışmalar, davranıştaki değişikliklerin bağışıklık sistemindeki değişikliklerden kaynaklandığını öne sürmektedir. Paralitik kurbanlar çok daha güçlü tepkiler ve dolayısıyla daha düşük viral çoğalma dereceleri sergilemektedir. Bu da gösteriyor ki güçlü bir bağışıklık sistemi tepkisi davranış değişikliğini durdurabilir. Lakin davranış değişikliğine tam olarak neyin sebep olduğuna açıklık getirmek için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir (Leferve vd., 2009).

1.3.3. Kakugo Virüsü (KV)

Kakugo virüsü bal arılarına bulaşan yeni, patojenik olmayan pikorna virüslere benzeyen bir virüsdür. Bu virüs ilk olarak çıgırtkan kuşa (eşek arısına) saldırarak kadar saldırganlık gösteren işçi arılarda görülmüştür. Virüsün aşırı saldırganlık gösteren bireylerde bulunduğu ve bu davranışın konakçıdan ziyade virüsten kaynaklandığı gösterilmiştir.

Sonraki çalışmalarda zararsız ve bulaşıcı enfeksiyonlar karşılaştırılmış ve sadece zararsız enfeksiyon sırasında, agresif çalışan konak ve virüs arasında bir korelasyon bulunmuştur. Beyin içindeki virüs dağılımı yerinde melezleme ile incelenmiş ve bulgular, virüsün beyine aynı oranda bulaşmadığını ve son teorilerin tersine nöronal vücut ekseninde bulunabileceğini göstermiştir. Beynin cDNA mikro dizi analizleri, bir peptid'in, GB10708/HP30, enfeksiyon sırasında yüksek oranda ekspreslendiğini ortaya çıkarmıştır. Bu protein önce hemolenfteki bakteri yayılımı sırasında bağışıklık efektörü olarak tespit edilmiş ve bu yüzden peptidin manipülasyona ya da enfeksiyona direkt bir etkisinin olup olmadığı tartışılmaktadır. Her iki yolda, bir çok immunoregülatör efektörü gibi davranış üzerinde bir etki edebilir (Fujiyuki vd., 2009).

1.3.4. Bakülovirüs

Bakülovirüsler, böcek konakçılarında belirli bir hareket değişikliğine sebep olabilirler. Bakülovirüs enfeksiyonunda, *Lymantria monacha* aşırı hareket (hipermobilite) davranışı gösterir. Bu ağaç tepesi hastalığı (tree-top disease) ya da Wipfelkrankheit (Goulson, 1997; Hofmann, 1891) olarak adlandırılır. Başlangıçtaki aşırı hareketliliğin virüsün belirli bir bölgeye yayılmasını sağladığı varsayılır. Tırmanma davranışı,

sıvılaşmadan sonra virüsün bulaşmasını artırır, çünkü yağmur damlaları virüsü daha alttaki yapraklara bulaştırabilir (Raymond vd., 2005). Davranış değişikliğine sebep olan bir parazite yönelen bulgular bulunmasına rağmen, uyumsuzların konakçıya bağlı olduğu olasılıklar hala var. Hipermobilité, diğér larvaların, virüs enfeksiyonundan kaçınmak için bir kaçış tepkisi olarak sayılabilir çünkü böcekler genelde yan yana yaşarlar. Tırmanma, konağın daha çok solar radyasyona maruz bırakır ve bu da konakta vücut ısınmasına neden olur. Davranışsal ateş olarak bilinen bu fenomen enfeksiyon oranlarını yavaşlatmak için uygulandığı bilinen bir stratejidir. İltihaplı bir larva bitki üzerinde dolaştığında, onu yiyebilecek predatörlere daha çok maruz kalır ve bu yüzden virüsü diğér larvalardan uzaklaştırır. Bir larva açık havada bir bitkide ölürse, UV ışınları seçici bir baskı yapmak için virüsü hareketsizleştirir (Goulson, 1997). Buna rağmen bunun doğru ya da yanlış olduğu tartışılır. Tırmanış başladığında virüs zaten ölüme yakındır ve eğer konakçıya bağlıysa daha erken beklenebilir çünkü daha sonra ısınmak ve yenilmek için daha çok zaman vardır. *Bombyx mori* larvasındaki bu fenomenle ilgili çalışan bir grup, bir fosfatazın, Protein Tirozin Fosfatez, hipermobilitéde bulunduğunu göstermiştir. Bir PTP delesyon mutanıtı iltihaplı larvada hipermobilité eksikliği göstermiştir (Kamita vd., 2005).

1.5. *Spodoptera exigua* Çizgili Yaprak Kurdu

Çizgili yaprak kurdu türleri 10 farklı kelebek türünü içerir ve tarımsal ürünlerde genelde çok zararlıdırlar. Ayrıca kuşkonmaz otu kurdu, pancar kurdu ve benekli söğüt olarak da bilinen çizgili yaprak kurdu, muhtemelen tanınan en iyi türlerden biridir. Evrimsel soyu Asya'ya uzanmasına rağmen tüm dünyaya yayılmıştır. Fakat çok geniş bir konakçı alanına sahip olduğundan dünyanın birçok yerinde bulunmaktadır. Fasulye, şeker, marul, patates ve tahıl gibi önemli tarımsal ürünlerden beslenir. Özellikle zararlı bir özelliği de yaşlı larvaların bir yaprağı bir kere de yemek yerine bitkinin içinde yuva yapma eğiliminde olmasıdır (Mau ve Kessing, 2007).

Kelebekler sıcak mevsimlerde 1700 kadar yumurta bırakabilmektedirler (soğuk mevsimde yaklaşık 500 yumurta). İlk birkaç dönemdeki larvalar birlikte kümelenme eğilimindedirler, fakat olgunlaştıkça daha geniş bir alanı kaplamak için yayılırlar. Son larva dönemine olgunlaştıklarında yapraktan düşerler ve toprağın içinde pupaya girerler. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında, son dönem larvaların pupalaşmadan önce kendilerini yiyecek küpünün içine yuvaladıkları gözlenmiştir. Böceklerin biyolojik kontrolü,

indoxacarb, lufunuron, spinosad gibi pestisitler ile sınırlandırılmaktadır. Bu insektisidleri yaprağın altına püskürtmek önemlidir. Biyolojik kontrol son yıllarda biraz yer edinmiş olmakla birlikte hala kimyasal pestisitler kadar yaygın kullanılmamaktadırlar. Şu anda en önemli biyolojik kontrol materyalleri *Bacillus thuringiensis* ve polihidrozo virüsüdür (Ac ya da SeMNPV). Fakat bunlar sadece devreye uzanan yumurtada ve ilk iki instarda etkilidir (URL-1, 2009).

Bu tez davranışla alakalı olduğundan sinir sisteminin doğrudan dahil olması kesindir. *S. exigua* sinir sistemi, nerdeyse tüm böceklerde olduğu gibi, sinir kordlarına ayrılmış dorsal merkez beyin ve ventral ikiliden oluşur. Bir parçadaki her gangliyal çifti bir birleştirici ile birbirine sıkıca bağlı ve her iki gangliyal bir sonraki gangliyal ile bağlantılıdır. Beyin 6 gangliyal ile birlikte birleşir (3 çift) ve kafada dorsal uzanır. İlk çift, Protocerebrum, gözler ve oselus sinir sistemine bağlamakla görevlidir. Larva henüz bileşik göze sahip olmadığından, bu kısım tırtılların beyinde yoktur. İkinci çift, Deutocerebrum, duyargadan aldığı tüm girdileri işler. Son çift, Tritocerebrum, önceki cerebradan gelen tüm uyarıları birleştirir ve onu böcekteki gangliyalin geri kalanıyla bağlar. Bağırsağın altında kaynamış gangliyalin son yapısı, subözafagal gangliyon bulunabilir. Bu yapı böceklerin ağız yapılarını oluşturmak için kaynayan 3 bölümden oluşmuştur. Bu ayrıca çene kemiğinin sinir sistemiyle bağlantılı ana kısmıdır. Davranış ve beyin yapısı arasındaki bağ hakkında çok fazla şey bilinmemektedir fakat bir çok çalışmada protocerebrumdaki mantar gövdelerin davranışsal döngüde önemli oldukları gösterilmiştir (Fujiyuki vd., 2009).

1.6. *for* Geni ve Hipermobilité

Şimdiye kadar birçok davranış değişikliği ve farklı davranış interferansları üzerinde tartışılmıştır. Parazit kaynaklı değişiklikler hala tam olarak anlaşılmadığından çalışmalar doğal davranış düzenleme durumlarından elde edilen bilgilere bağlı gerçekleştirilmektedir. Hareketli olan davranış değişikliğinde en çok incelenen faktör *Drosophila* ve diğerlerindeki *for* genidir (Protein Kinaz G kodu). *S. exigua*'daki bakülovirüs enfeksiyonu hareketlerde (hipermobilité) değişikliğe neden olduğundan PKG'nın bakülovirüs kaynaklı hipermobilitéye dahil olan akıntı yönü faktörü olabilme ihtimali varsayılmaktadır.

Mevye sineği, karınca, arı konusunda da ele alındığı gibi *for* geni cGMP-bağımlı protein kinazı (PKG) kodlamaktadır. PKG ailesi yüksek devirli GMP seviyeleriyle aktive

edilen birçok efektör proteini kapsamaktadır. Örneğin, bu nitrik oksit ve natriüretik peptik tepkilemelerinde olabilir. Bu ailenin kontrol ettiği prosesler davranış değişikliği platelet aktivasyonu ve kas gevşemeleri kadar çeşitlidir (Browning vd., 2001). Genel anlamda PKG çeşitli substratlarla serin treonin fosfotransferaz olarak iş yapar. Bu fosfor grubunun eklenmesi proteinin fonksiyonlarını aktif ya da inaktif duruma getirebilir (Feil vd., 1995).

1.6.1. PKG'nin Yapısı

PKG ile ilgili birçok yapısal bilgi benzer ve geniş çapta incelenen cAMP-bağımlı protein kinazından (PKA) elde edilmiştir. Fakat PKA'nın aksine PKG komşu polipeptitlerin dimerlerinden oluşur; PKA ise düzenleyici ve katalitik altbirimlerden oluşan bir holoenzimdir. Düzenleyici ve katalitik altbirimler arasındaki bu belirgin fark PKG da görülmektedir ancak sadece bir polipeptit içindedir. Ayrıca PKG N-terminali dimerizasyondan sorumludur ve psödo substrat motifine sahiptir. Bu motifin PKG cGMP tarafından aktive edilmediğinde PKG'nın katalitik alanını kapattığı düşünülmektedir (Browning vd., 2001). Düzenleyici taraf farklı eğilimleri olan iki cGMP bağlayıcı kısım içerir ve sadece bu iki paket cGMP tarafından kımıldatıldığında, psödo substrat motifi serbest kalır, enzim aktifleşir (Feil vd., 1995). PKA'nın cAMP için cGMP üzerinden sadece 50 kat seçimi olmasına karşın PKG cGMP için cAMP üzerinden 100 kat seçim tercihine sahiptir.

Bazı PKG varyantları nükleer lokalizasyon sinyallerini, membran ankraj kısımlarını ve ilgili G-kinaz ankraj proteinlerini (GKAP) elde etmek için gösterilmiştir fakat bu sonuçlar ağırlıklı olarak memeli PKG'ları göstermek için oluşturulmuştur ve bu nedenle *S. exigua* PKG varyantlarıyla direkt olarak ilişkili değildir (Tanoue ve Nishioka, 2003; Scholten vd., 2007).

1.7. Antisens Teknolojisi

Antisens teknolojisi insan, hayvan ve bitkilerdeki hastalıkların daha spesifik tedavisi ve yeni keşifleri için ayrıca, fonksiyonel genomik çalışmalar için çok güçlü bir tekniktir. Antisens teknoloji olarak bilinen yöntemde, antisens RNA molekülleri hedef genin RNA mesajına spesifik olarak bağlanarak gen ifadesinin moleküler düzenlenişine engel olmaktadır. Hastalıkların oluşumunda büyük bir paya sahip olan proteinlerin üretimini

durdurmak için bu teknoloji, oligonükleotidler olarak adlandırılan modifiye olmuş ya da olmamış DNA/RNA segmentlerinin kullanımını içermekte ve hücre içinde, nükleus ve protein sentez bölgeleri arasındaki genetik bilginin iletimini bloke etmektedir (Antisense Technologies, 2005). Antisens nükleik asit dizilerinin hedef olacak spesifik mRNA'ya bağlanması veya hibridizasyonu, genin genetik mesajının kesilmesine yol açmaktadır. Bir genin genetik mesajının hücresel proses ile kesilmesi "Knock-Down" veya "Knock-Out" olarak isimlendirilir. Bu proses, bu genin işleyişini saptamak için araştırmacılara olanak sağlamıştır. Diğer bir önemli antisens teknolojisi ise "RNA interferans" olarak adlandırılır. Antisens alanındaki araştırmalar RNAi (RNA interferans)'nin keşfi ile hız kazanmıştır. Doğal olarak oluşan bu mekanizma sekansa spesifik olup ilk kez *Caenorhabditis elegans* nematodunda keşfedilmiştir.

Çoğu ilaçlar proteinlere bağlanırken, antisens moleküller kendilerine tamalayıcı olan hedef RNA ile eşleşirler. Antisens oligonükleotidler mRNA'nın translasyonunu bloke eder veya RNAaz-H ile mRNA'nın degradasyonuna neden olurlarken, ribozim ve DNA enzimleri hedef RNA'yı keserler. RNAi yaklaşımları, RISC ile etkileşen siRNA (small interfering RNA) molekülleri ile gerçekleştirilir (Kurreck, 2003).

1.7.1. RNA İnterferans (RNAi)

İlaç sanayi, tedavi amaçlı gen baskılanması için her geçen gün kendini yenilemektedir. Daha önceki araştırmalar, antisens oligonükleotid ve ribozimleri kapsayan sekansspesifik RNA baskılanması üzerineydi. Bazı pozitif sonuçlar, bu ilaç platformunda elde edilirken, stabilite, hedefi bloke etme potansiyeli, hücreye iletimi ve hedef sekans seçimi gibi teknik konular, klinik olarak ilaçların etkinliğinin gelişimini yavaşlatmıştır. Son yıllarda, nükleik asit bazlı gen inhibisyon yaklaşımlarının klinik olarak gelişiminde yeniden bir etki yaratma potansiyeline sahip olan RNA interferans (RNAi), gen regülasyonunun yeni bir mekanizması olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır (Uprichard, 2005).

RNAi, bitkilerde, solucanlarda, mayalarda ve insanlar arasında yüksek oranda korunmuş, doğal olarak oluşan biyolojik bir işlemdir. Hücre içinde iki bölümden oluşan bir yol izine sahiptir. Hücrede oluşan öncül dubleks RNA molekülü ilk olarak, Dicer endonukleaz ile 21-23 nükleotidlik kısa fragmentlere ayrılır. siRNA (short interfering RNA) olarak bilinen bu efektör RNA'lar, RNA uyarıcı protein kompleksi ile etkileşir

(RNA inducing silencing protein kompleks; RISC). Bu protein kompleksi, siRNA'nın bir ipliğini lider sekans olarak kullanarak, hedef homolog RNA'ları kesmektedir. Bitkilerde, RNAi hücre savunmasında rol oynar; virus infeksiyonundan, transpozonlardan (sıçrayıcı gen) ve tekrarlayıcı sekansların uygun olmayan ifadenenmesinden, hücreyi korumaktadır.

Memeli hücreleri de benzer savunma sistemine sahiptir. Bu endogenik RNA'lar, veya miRNA (microRNA), dicer tarafından siRNA efektörlerine dönüştürülür ve çeşitli hücrel proseslerde örneğin, çoğalma, apoptozis ve farklılaşmada görev yapan genlerin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. siRNA molekülleri, kimyasal olarak sentezlenip ekzogenik olarak memeli hücrelerine verildiğinde, hücrel RISC kompleksine maruz kalır ve siRNA'ya homolog olan RNA'ların parçalanmasına aracılık eder (Uprichard, 2005).

RNAi, gen işleyişinin validasyonu ve hızlı identifikasyonunda, hedef ilaç keşfinde, biyolojik kaynak olarak devrim yapmış, hatta 2002 yılında, "Science Magazine" tarafından "yılın keşfi" olarak nitelendirilmiştir ve bazı şirketler, RNAi bazlı tedaviler geliştirme yönünde adımlar atmıştır (Uprichard, 2005).

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tezde *Spodoptera exigua pkg* geninin susturulmasına yönelik moleküler çalışmalar planlanmıştır. Bu çalışmada virüsün konak canlıda oluşturduğu davranış değişikliğinden sorumlu olduğu düşünülen cGMP protein kinaz (*pkg*) geni rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu genin RNAi tekniği kullanılarak baskılanabilmesi ve konaktaki etkilerinin gözlenmesi için oluşturulacak viral tabanlı sistemin oluşturulması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

2.1.1. Kimyasallar ve Besiyerler

Çalışmada kullanılan besiyerler, kimyasal maddeler ve enzimler değişik firmalardan sağlanmıştır. Bunlardan LB (Luria Bertani) Broth, LB agar, casein hydrolysate, bacto-yeast extract, sodium chloride, tryptic soy agar, ethilenediaminetetraacetic acid (EDTA) Merck'ten, tris base, sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium acetate, sodium hydroxide, fetal bovine serum (FBS), ethidium bromide Sigma'dan temin edildi.

2.1.2. Ticari Kitler ve Enzimler

CloneJET™ PCR Cloning kiti ve GeneJET Plasmid Miniprep kiti Fermentas'dan, Illustra™ GFX Gel Purification kiti GE Healthcare'den, Gateway Cloning kiti ve Pure Link™ HiPure Plasmid DNA Purification kiti Invitrogen'den temin edildi.

Taq Polimeraz Promega'dan, Phusion Polimeraz Finnzymes'den, T₄ DNA ligaz, BP Clonase II ve LR Clonase II Invitrogen'den temin edildi.

2.1.3. Hücreler, Plazmidler ve Virüsler

Çalışmada kullanılan pFastBac Dual *polh* Δ *p10* plazmidi, *Escherichia coli* bakteri hücresi ve *Spodoptera frugiperda* (Sf9) böcek hücreleri Dr. M. Van Oers'dan (Wageningen University, Virology Laboratory) temin edildi.

AcMNPV dsRNA anti *gfp* (yeşil floresan protein) rekombinant virüs ve AcMNPV dsRNA anti *pkg* (cGMP protein kinaz) rekombinant virüs Dr. M. Van Oers'dan (Wageningen University, Virology Laboratory) temin edildi.

2.1.4. Primerler

Tablo 2. *pkg* ve *gfp* genlerinin susturulması için tasarlanan primerler

İsim	Sıra (5' → 3'):	Açıklama
attB₁ - FW <i>pkg</i> RNAi	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATCCG CCAGGCTGAATAC	
attB₂ - RV <i>pkg</i> RNAi	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <i>AATGCAT</i> CAAGGCAAGTCTCCA	*NsiI
attB₁-FW <i>gfp</i> RNAi	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACAACA CTTGTCACTACTTTCA	
attB₂-RV <i>gfp</i> RNAi	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <i>AATGCAT</i> GTATAGTTCATCCATGCC	*NsiI
İe1-FW	<i>GACTCGAGT</i> CGATGTCTTTGTGATGC	*XhoI
İe1-RV	GG <i>ATGCAT</i> GTCACTTGGTTGTTACG	*NsiI

*Kalın ve italik punto ile belirtilen bölgeler primere eklenen kesim bölgelerini göstermektedir.

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1 M TRIS HCL: 12,11 g tris 50 mL deiyonize suda (ddH₂O) çözüldü. pH'ı 8 ayarlandı ve hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

0,5 M EDTA: 18,6 g EDTA 50 mL ddH₂O çözüldü. pH'ı 8'e ayarlandı ve hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

3 M Sodium Acetate: 40,8 g sodium acetate 50 mL ddH₂O çözüldü. pH'ı 5,2 ayarlandı ve hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

TENS Tamponu: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, % 0,5 SDS ilave edilerek karıştırıldı.

TE Tamponu: Stok Tris ve EDTA çözeltilerinden 100 mL'de 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA olacak şekilde hazırlandı.

50X TAE Tamponu: 242 g tris base, 57.1 mL glacial acetic acid, 22.6 gr EDTA bir litre ddH₂O çözüldü.

Luria Bertani (LB) Broth: 10 g casein hydrolysate, 5 g bacto-yeast extract, 5 g NaCl bir litre ddH₂O çözüldü ve otoklavlanarak steril edildi.

Luria Bertani (LB) Agar: 10 g casein hydrolysate, 5 g bacto-yeast extract, 5 g NaCl, 15 g agar bir litre ddH₂O çözüldü ve otoklavlanarak steril edildi.

2.2. Metod

2.2.1. Hücrelerin Üretilmesi

Sf9 hücreleri 27 °C de %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ihtiva eden Grace'in böcek besiyerine % 1'lik NaCl ve 1000X Gentamisin eklenerek hazırlanan TN-MFH besiyerinde büyütüldü.

2.2.2. *Spodoptera exigua pkg* Geninin dsRNA Kodlayan AcMNPV ile Susturulması

Bu deneyde *Spodoptera exigua pkg* geninin susturulması amacı ile Monique van Oers tarafından hazırlanmış olan ve genomunda *pkg* genine karşı dsRNA üreten AcMNPV dsRNA anti *pkg* bakmidi kullanılmıştır. Ayrıca enfeksiyonun ve susturulmanın gözle gözlenebilmesi amacı ile *p10* promotörü altına *gfp* geni yerleştirilmiş AcMNPV *p10 gfp* bakmidi ve bu *gfp*'yi susturabilecek dsRNA üreten AcMNPV dsRNA anti *gfp* bakmidi kullanılmıştır.

Deney T25 flasklarda gerçekleştirildi. Altı adet T25 flaskın her birine 1×10^6 Sf9 hücre 4 mL FBS ve Gentamisin içeren Grace'nin böcek besiyeri içerisinde bırakıldı ve 1 gece 27°C de inkübe edildi. Üç flaskdaki hücreler MOI 1, diğer 3 flaskdaki hücreler ise MOI 5 konsantrasyonunda AcMNPV *p10 gfp* virüsü ile enfekte edildiler. AcMNPV *p10 gfp* ile enfekte edilen bu hücrelerde *gfp* ve *pkg* genlerinin susturulmalarını gözlemek için, farklı MOI'deki AcMNPV *p10 gfp* ile enfekte flaskların birer taneleri AcMNPV dsRNA anti *gfp* virüsü ile birer taneleride AcMNPV dsRNA anti *pkg* virüsü ile MOI=10 konsantrasyonunda koenfekte edildiler. Kontrol olarak AcMNPV *p10 gfp* virüsü ile farklı MOI'lerde enfekte edilen birer flask hücre diğer virüsler ile koenfeksiyon yapılmadı. Enfeksiyon karışımı ependorf tüplerde hazırlandı. Bunun için ependorf tüplere 1ml besiyeri ve MOI 1 / 5 konsantrasyonunda AcMNPV P10 *gfp* virüsü ve bunlarında üzerine MOI 10 konsantrasyonunda AcMNPV dsRNA anti *pkg* veya AcMNPV dsRNA anti *gfp* virüslerinden bırakıldı. 1 ml besiyeri ihtiva eden tüplere, daha önce konsantrasyonları EPDA (End Point Dilution Assay) yöntemi ile belirlenmiş AcMNPV dsRNA anti *pkg*

(6×10^8), AcMNPV dsRNA anti *gfp* (6×10^8) ve AcMNPV *p10 gfp* ($1,2 \times 10^{10}$) virüslerinden sırasıyla 16 μ l, 16 μ l, 5 μ l, 1 μ l ilave edildi. Tüpler nazikçe karıştırıldı ve hazırlanan enfeksiyon karışımı damla damla flasklara aktarıldı. Hücreler 2 saat 27°C de 2,5 hızında sallayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüm enfeksiyon karışımı uzaklaştırıldı ve 4 mL FBS ve Gentamisin içeren Grace'nin böcek besiyeri ilave edilerek 27°C de inkübe edildi.

Enfeksiyonu takip eden 24., 48., 72. ve 96. saatlerde hücrelerin durumları ışık ve floresan mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı.

2.2.3. Hairpin (Firkete) Yapıyı Taşıyan Bakmidlerin Oluşturulması

2.2.3.1. Hairpin Oluşturacak *pkg* Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

PrimerSelect (DNASTAR) programı kullanılarak *pkg* genine özgü primerler *Nsi*I kesim bölgesini içerecek şekilde oluşturuldu. Oluşacak PCR ürününün klonlamasını Gateway klonlama sistemi ile klonlamayı düşündüğümüz için, bu sistemde primerin önüne *Nsi* I kesim bölgesi eklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle primeri dizayn ederken başına *Nsi* I kesim bölgesi eklendi. Genin çoğaltılmasında hata olmasını engellemek için hata düzeltme aktivitesine sahip phusion DNA Polimeraz (Finnzymes) enzimi kullanıldı. PCR reaksiyonu için tüpe;

Kalıp DNA	: 1 μ L
5 \times Phusion tamponu	: 4 μ L
10mM dNTP karışımı	: 0,4 μ L
10 μ M attB1 FW <i>pkg</i> -RNAi	: 1 μ L
10 μ M attB2 RV <i>pkg</i> -RNAi	: 1 μ L
Phusion DNA polimeraz	: 0,2 μ L
H ₂ O	: 12,4 μ L

karışımı bırakıldı. PCR reaksiyonu, 98°C'de 30 saniyelik ilk denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde 98°C'de 10 saniye, 45°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve son aşama olan 72°C'de de 10 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. PCR ürünü, Illustra™ GFX Gel Purification kiti (GE Healthcare) kullanılarak izole edildi. Mikrosantrifüj tüplerine

bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 10 mg jel parçası için 10 µl jel çözme tamponu kullanıldı. Karışım 60°C'de yaklaşık 15 dakika jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. Bir süre sonunda bağlama tamponu ve jel karışımı GFX kolonlara aktarılarak 12.000xg'de 30 saniye santrifüj edildi ve sıvı atıldı. Kolon 1 kez 500 µl yıkama tamponuyla yıkandı. Kolon, sonrasında temiz bir ependorf tüpüne alınarak uygun 10-50 µl elüsyon tamponu kolona homojen yayılacak şekilde eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifugasyonla kolondan DNA süzülde. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu % 1'lik agaroz jelde elektroforezi ile kontrol edildi ve 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 1'lik agaroz jelde DNA'nın nisbi konsantrasyonu belirlendi (Lambda DNA Marker (Promega) ve GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Yukarıda anlatıldığı şekilde PCR ürünü jelden temizlendi.

2.2.3.2. Hairpin Oluşturacak *gfp* Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

PrimerSelect (DNASTAR) programı kullanılarak *gfp* genine özgü primerler *NsiI* kesim bölgesini içerecek şekilde oluşturuldu. Genin çoğaltılmasında hata olmasını engellemek için hata düzeltme aktivitesine sahip phusion DNA Polimeraz (Finnzymes) kullanıldı. PCR reaksiyonu için tüpe;

Kalıp DNA	: 0,5 µL
5× Phusion tamponu	: 4 µL
10mM dNTP karışımı	: 0,4 µL
10 µM attB1 FW <i>gfp</i> -RNAi	: 1 µL
10 µM attB2 RV <i>gfp</i> -RNAi	: 1 µL
Phusion DNA polimeraz	: 0,2 µL
H ₂ O	: 12,9 µL

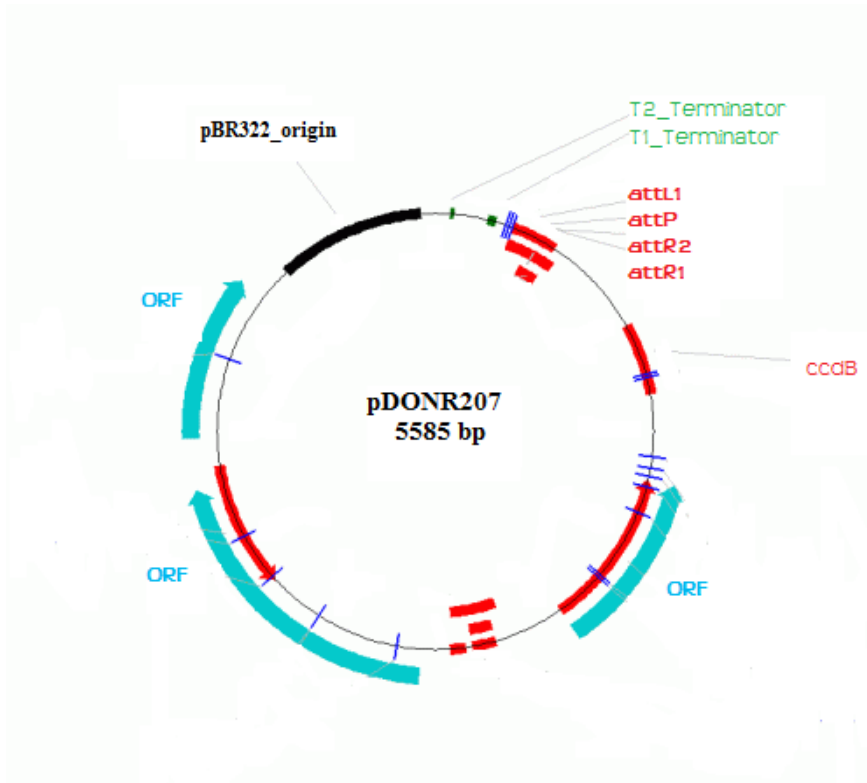
karışımı konuldu. Reaksiyon toplam 20 µL olarak hazırlandı. PCR reaksiyonu, 98°C'de 30 saniyelik denatürasyondan sonra 30 döngü olacak şekilde 98°C'de 10 saniye, 50°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve son aşama olan 72°C'de 10 dakika bekletilerek tamamlandı. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Yukarıda anlatıldığı şekilde PCR ürünü jelden temizlendi.

2.2.3.3. PCR ürünlerinin Gateway Transfer Vektörüne (pDONR207-765 ng) Klonlanması

PCR ürünlerinin klonlanması için Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix kiti (Invitrogen) kullanıldı. Gateway klonlama sistemi iki aşamalı bir klonlama stratejisine sahiptir. Gateway klonlamanın ilk aşaması olan BP Reaksiyonu için karışım hazırlandı. Her gen için ayrı birer tüpe;

attB-PCR ürünü (35 ng)	: 4 µL
Donor vektör (pDONR207-765 ng)	: 1 µL
TE Tamponu, pH 8.0	: 3 µL
BP Clonase™ II enzimi	: 2 µL

reaksiyon karışımı bırakıldı ve 25° C'de 1 saat inkübe edildiler. Karışımlara 1'er µL Proteinaz K solusyonu eklendi ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildiler.



Şekil 3. Gateway-Transfer Vektörü

2.2.3.4. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması

Petriye ekilmiş *E. coli* DH5 α hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen LB Broth besiyerine aşılandı ve 37°C’de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C’de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dk buz üzerinde bekletildi. Ardından 4°C’de 4.000×rpm hızında 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti soğuk % 10’luk gliserolde çözüldü ve 5.000×rpm’de 4 °C’de 15 dk santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10’luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompotent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl’lik hacimlerde) ve -80 °C’de saklandı.

2.2.3.5. Elektrotransformasyon

Gateway sistemi ile yukarıda klonlama reaksiyonunu yaptığımız rekombinant plazmidleri aktarmak için elektrokompotent DH5 α hücreleri kullanıldı. Kompotent *E. coli* hücrelerinin bulunduğu tüpler buz üzerine alındı ve bu hücrelerin üzerlerine 1 µL BP reaksiyon karışımından bırakıldı ve karıştırıldı. Karışım elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve kuvvetler elektroporator cihazına yerleştirildi. Kuvvetler cihazda 200 ohm, 1,5-2K ve 25mF’de 3-4 sn bekletildi. Ardından kuvvetin içeriği 1ml LB Broth besiyerine transfer edildi ve 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda hücreler 6.000×rpm’de 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hücreler 100 µl LB Broth besiyerisinde süspansiyon edildi ve petri kaplarında bulunan gentamisin içeren LB Agar besiyerisi üzerine cam bagelele yayıldı. Petriler 37°C’de 1 gece inkübe edildi.

2.2.3.6. *pkg* ve *gfp* Genlerini Taşıyan Rekombinant Klonların Koloni PCR ile Seçilmesi

Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden koloni PCR metodu ile rekombinant klonlar araştırıldı. Kalıp DNA olarak direk koloni kullanıldı. Bu işlemde kürdan veya pipet ucu koloniye dokundurularak bir miktar bakteri alındı ve 30 µL steril su içinde bu bakteri çözüldü ve 95°C’de 10 dakika bu karışım bekletildi ve 8000×rpm’de 1 dakika santrifüj

edilerek süpernatanın 3 μL 'si kalıp DNA olarak kullanıldı. Bu reaksiyon klasik PCR koşullarında *Taq* polimeraz (Promega) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı toplam 20 μL 'lik hacimde 4 μL 5X *Taq* tamponu, 0,4 μL 10 mM dNTP, 1,2 μL 25 mM MgCl_2 , 1 μL 10 μM pDONR207- FW, 1 μL 10 μM pDONR207-RV ve 0,1 μL *Taq* polimeraz (Promega) karışımını içerecek şekilde hazırlandı.

PCR reaksiyonu, 3 dakika 93°C'de başlangıç denatürasyonunun ardından, genin çoğaltılması ve zincirlerin ayrılması için 30 saniye 94°C'de, primerin bağlanması için 30 saniye 55°C'de, sentez için 1 dakika 72°C'de 30 döngü ve son sentez aşaması olan 72°C'de de 10 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

2.2.3.7. Pozitif Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu

Koloni PCR ile pozitif olarak belirlenen klonlardan kit (GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit, Fermentas) kullanılarak saf plazmid DNA'ları izole edildi. Bunun için klonu ihtiva eden 3 ml gece kültürleri 7.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 μL süspansiyon solusyonunda çözüldü ve üzerine 250 μL parçalama solusyonu ilave edildi. Tüpler 4-5 kez alt üst edildikten sonra 350 μL bağlanma solusyonu ilave edildi ve aynı şekilde tüpler 4-5 kez alt üst edilerek 13.000xrpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kittede bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzülde. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerine toplanması için kolonların üzerine 30 μL TE tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 13.000xrpm 2 dakika santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçülerek belirlendi.

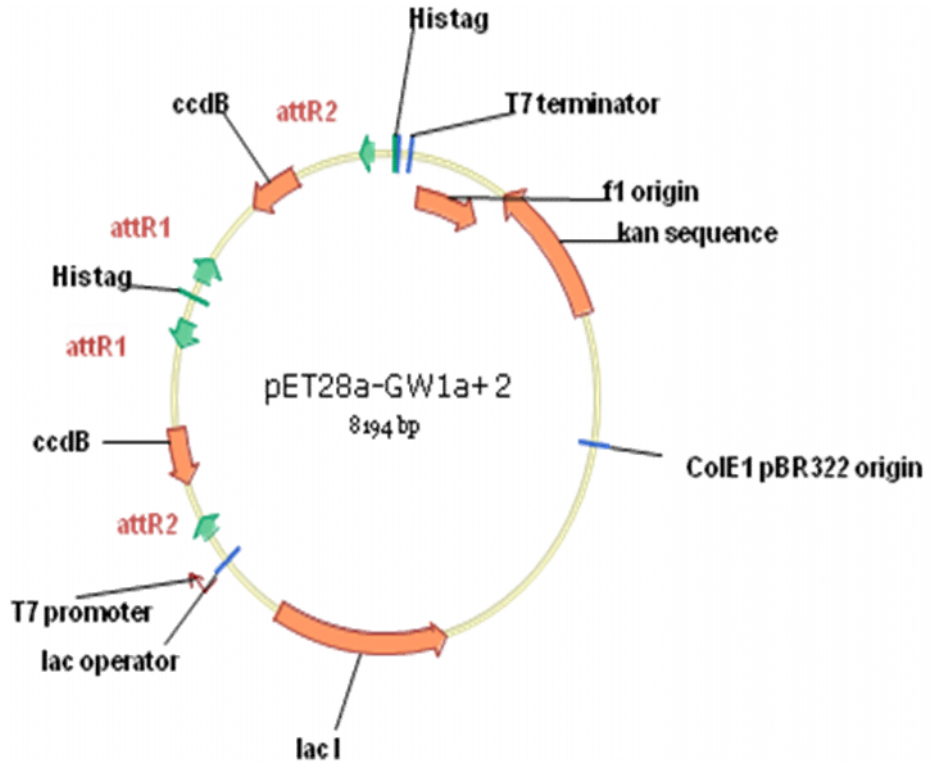
2.2.3.8. Gateway-Transfer Vektöründeki Genlerin Gateway-Hedef Vektöre (pET28a-GW1a+2) Klonlanması ve Koloni PCR ile Klonların Seçimi

Gateway klonlama sisteminin ikinci aşaması olan LR reaksiyonu için karışım hazırlandı. Her gen için ayrı birer tüpe;

Giriş Klonu (150 ng)	: 4 µL
Hedef Vektör (150 ng)	: 1 µL
TE Tamponu, pH 8.0	: 3 µL
LR Clonase™ II enzimi	: 2 µL

reaksiyon karışımı bırakıldı ve 25° C’de 1 saat inkübe edildi. Karışıma 1 µL Proteinaz K solusyonu eklendi ve 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan reaksiyon karışımından elektrotransformasyon gerçekleştirildi.

BP reaksiyonunda da gerçekleştirildiği gibi inkübasyon neticesinde oluşan klonların doğruluğunu kontrol etmek için T₇- FW ve T₇-RV primerleri kullanılarak aynı PCR şartlarında koloni PCR gerçekleştirildi.



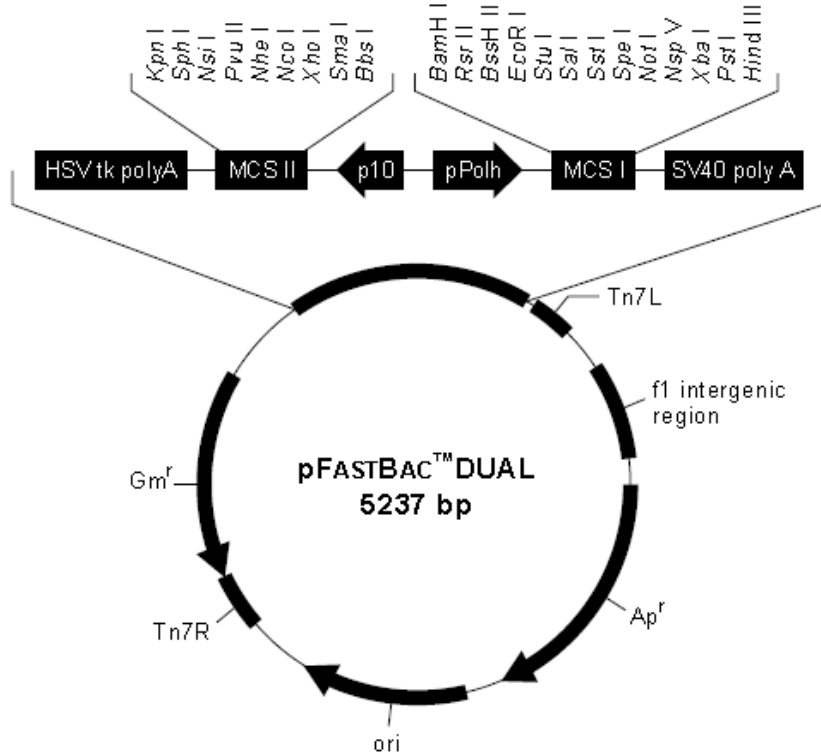
Şekil 4. Gateway-Hedef Vektörü

2.2.3.9. Rekombinant Hedef Vektörlerden Plazmid DNA İzolasyonu ve Bunların Restriksiyon Analizi

Koloni PCR sonucu pozitif olarak belirlenen klonlardan gece kültürleri hazırlandı. Bu kültürlerden saf plazmid DNA'ları izole edildi. İzole edilen plazmid DNA'larının *pkg* ve *gfp* genlerine ait DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmid DNA'ları *NsiI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 30 μ L DNA, 4 μ L *NsiI*, 4 μ L enzime ait 10X tamponu ve 2 μ L H₂O olacak şekilde 40 μ L'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildiler. Enzim muamelesi ile oluşturulan ürünler, % 1'lik agaroz jelde elektroforez edildikten sonra oluşan bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüplerine alındı ve ürünün jelden temizlenmesi illustra™ GFX Gel Band Purification kiti (GE Healthcare) ve kitin içinde bulunan kullanma yöntemi takip edilerek gerçekleştirildi.

2.2.4. pFastBac Dual Vektörüne OpMNPV ie1 Promotorunun Klonlanması

Rekombinant bakmidde *pkg* ve *gfp* genlerinin erken bir promotor olan OpMNPV ie1 promotoru altında ekspres edilmelerine karar verildi. Bu nedenle transfer plazmidini bu promotoru ihtiva edecek şekilde hazırlandı.



Şekil 5. pFastBac Dual Vektörü

2.2.4.1. OpMNPV ie1 Promotorunun PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

OpMNPV ie1 promotorunu ihtiva eden transfer vektörümüzü hazırlamak için öncelikle OpMNPV ie1 promotoru bulunduğu plazmidten PCR ile çoğaltılması gerekmektedir.

Bunun için PrimerSelect (DNASTAR) programı kullanılarak OpMNPV ie1 promotor bölgesine özgün primerler *XhoI/NsiI* kesim bölgelerini içerecek şekilde oluşturuldu. PCR reaksiyonu için tüpe;

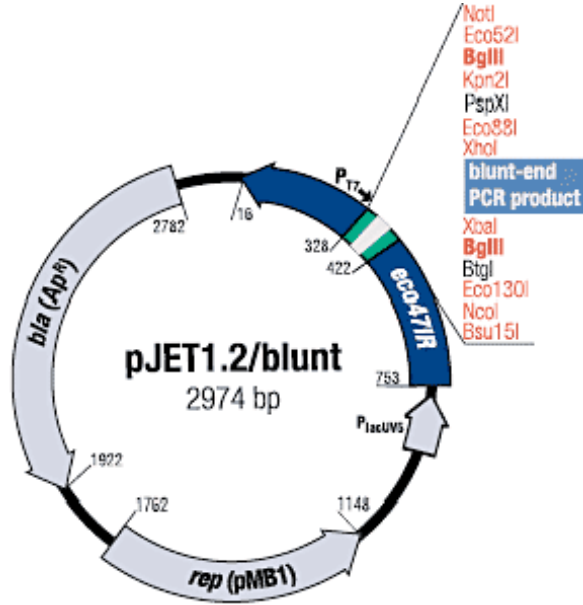
Kalıp DNA	: 0,4 µL
5× Phusion tamponu	: 4 µL
10mM dNTP karışımı	: 0,4 µL
10 µM ie1-FW	: 1 µL
10 µM ie1-RV	: 1 µL
Phusion DNA polimeraz	: 0,2 µL
H ₂ O	: 13 µL

karışımı bırakıldı. PCR şartları, 98°C’de 30 saniyelik denatürasyondan sonra 30 döngü olacak şekilde 98°C’de 10 saniye, 50°C’de 30 saniye, 72°C’de 1 dakika ve son aşama olan 72°C’de de 10 dakika olarak ayarlandı. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1’lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

2.2.4.2. OpMNPV ie1 Promotor Bölgesinin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması

PCR ile çoğaltılan OpMNPV ie1 promotor bölgesini ihtiva eden bant agaroz jelden kesildi ve Illustra™ GFX Gel Band Purification kiti (GE Healthcare) kullanılarak yukarıda belirtildiği gibi temizlendi.

Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pJET1.2/blunt (Şekil 6) vektörüne (Fermentas) 3:1 oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pJET1.2/blunt) hazırlanarak yapıştırıldı.



Şekil 6. pJET1.2/blunt Vektörü

Reaksiyon 1µl pJET1.2/blunt vektörü, 5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz, 1,5 µl H₂O ve 1,5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 10 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Ligasyon karışım 4°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

Ligasyon ürününden 1 - 3 µL alınarak kompetent *E.coli* DH5α hücrelerine transform edildi. Oluşan kolonilerden gece kültürleri hazırlandı.

2.2.4.3. Miniprep Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA'ların izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Yukarıda belirlenen klonlardan oluşturulan gece kültürleri 14.000xg'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM N NaOH, % 0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14.000xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl % 100'lük etanol ilave edilerek 14.000xg'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH₂O'da çözüldü.

İzole edilen plazmid DNA'ların OpMNPV ie1 promotor bölgesine ait DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için plazmid DNA'ları öncelikle *NsiI* DNA restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA, 0,5 µl *NsiI*, 1,5 µl enzime ait 10X tamponu ve 3 µl H₂O olacak şekilde 15 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından karışım % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Doğru DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. Bu klonların 2 tanesi seçildi, bunlardan GeneJET™ Plasmid Miniprep Kiti (Fermentas) kullanılarak plazmid DNA izole edildi. Bu klonların doğru nükleotid dizisini içerip içermediği DNA dizi analiziyle kontrol edilmiştir. Plazmid DNA'lardan 150 ng/µL konsantrasyonda 10 µL hazırlandı ve dizi analizine gönderildi (Eurofin, Germany).

2.2.5. pFastBac Dual ie1 Vektörünün Oluşturulması

pFastBac Dual (pFBD) vektörüne ie1 promotor bölgesini klonlayabilmek için vektörü uygun şekilde hazırlanması gerekmektedir. Bunun için pFastBac Dual (pFBD) vektörü *NsiI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. 2 µL DNA, 3 µL *NsiI*, , 3 µL *XhoI*, , 3 µL enzime ait 10X tamponu ve 19 µL H₂O olacak şekilde 30 µL'lik hacimde reaksiyon hazırlandı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Bu arada sekans sonucu doğrulanan pJET OpMNPV ie-1 vektörü *NsiI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. 30 µL DNA, 5 µL *NsiI*, , 5 µL *XhoI*, , 5 µL enzime ait 10X tamponu ve 5 µL H₂O olacak şekilde 50 µL'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

Yukarıda anlatıldığı gibi enzim muamelesi ile oluşturulan ürünler % 1'lik agaroz jelde elektroforez edildikten sonra oluşan bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüplerine alındı ve ürünün jelden temizlenmesi illustra™ GFX Gel Band Purification kiti (GE Healthcare) ve kitin içinde bulunan kullanma yöntemi takip edilerek gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Jelden temizlenen DNA fragmentleri, 3 oranında pFastBac Dual vektörü 1 oranında da OpMNPV ie-1 promotor fragmanı olacak şekilde bir araya getirildiler. Reaksiyon 1 µL pFBD vektörü, 5 µL 2x ligasyon tamponu, 1 µL T₄ DNA ligaz (Promega) ve 3 µL DNA fragmenti bir araya getirilerek 10 µL'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Ligasyon karışımı 4 °C'de 16 saat inkübe edildi.

Ligasyon ürünleri *E.coli* DH5 α hücrelerine elektrotransformasyonla aktarıldı ve inkübasyon neticesinde oluşan kolonilerin doğruluğunu tespit etmek için yukarıda anlatıldığı gibi ve şartlarda koloni PCR gerçekleştirildi.

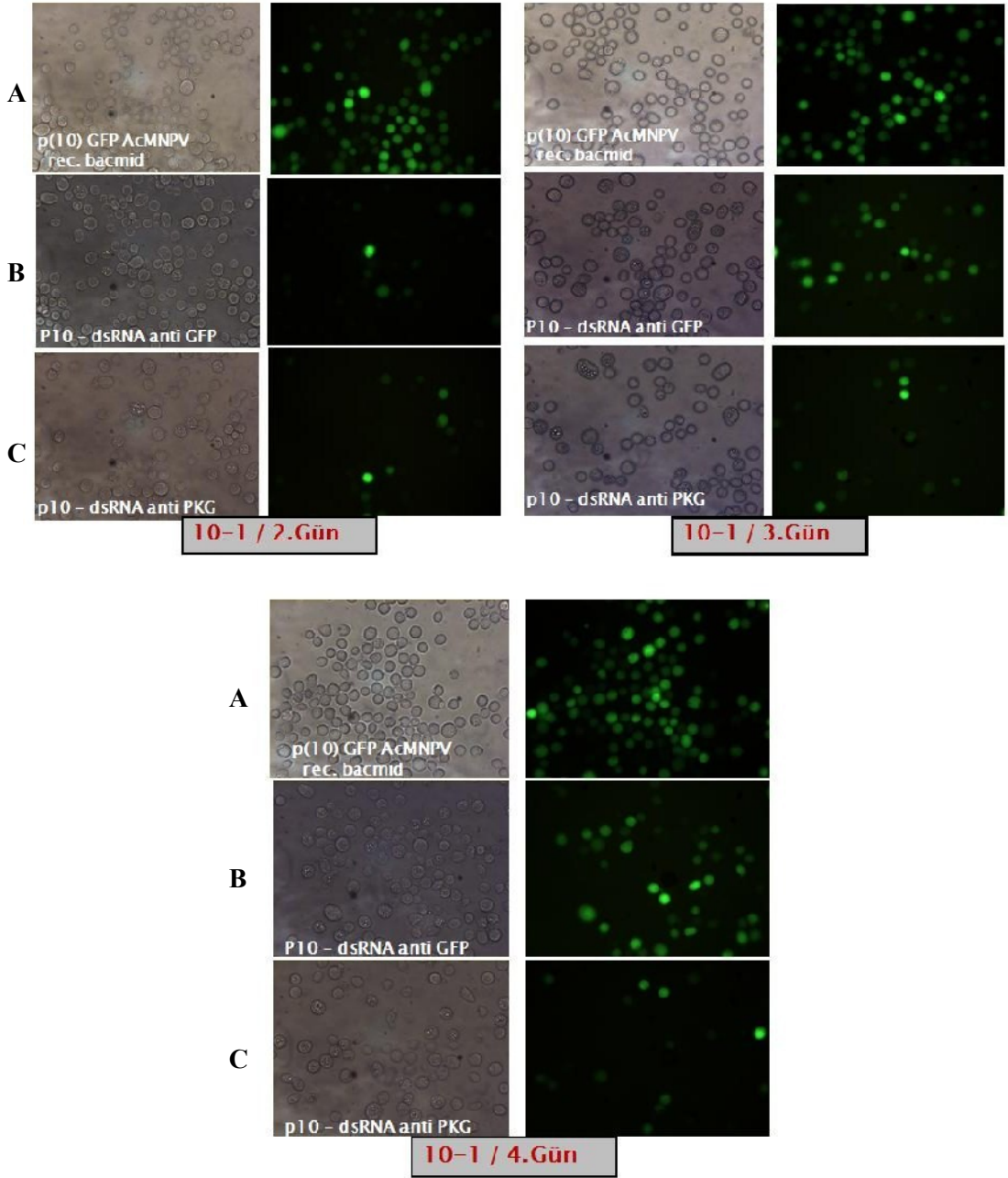
İkinci olarak restriksiyon analizi ile koloni PCR sonucu belirlenen pozitif klonların doğruluğu kontrol edildi. Bunun için bu klonlardan kit (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) kullanılarak saf plazmid DNA'ları izole edildi. İzole edilen plazmid DNA'ları *XhoI* ve *NsiI* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. 30 μ L DNA, 5 μ L *NsiI*, 5 μ L *XhoI*, 5 μ L enzime ait 10X tamponu ve 5 μ L H₂O olacak şekilde 50 μ L'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından karışım %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi ve ürünler yukarıda anlatıldığı şekilde Illustra™ GFX Gel Purification kiti (GE Healthcare) kullanılarak izole edildi.

3. BULGULAR

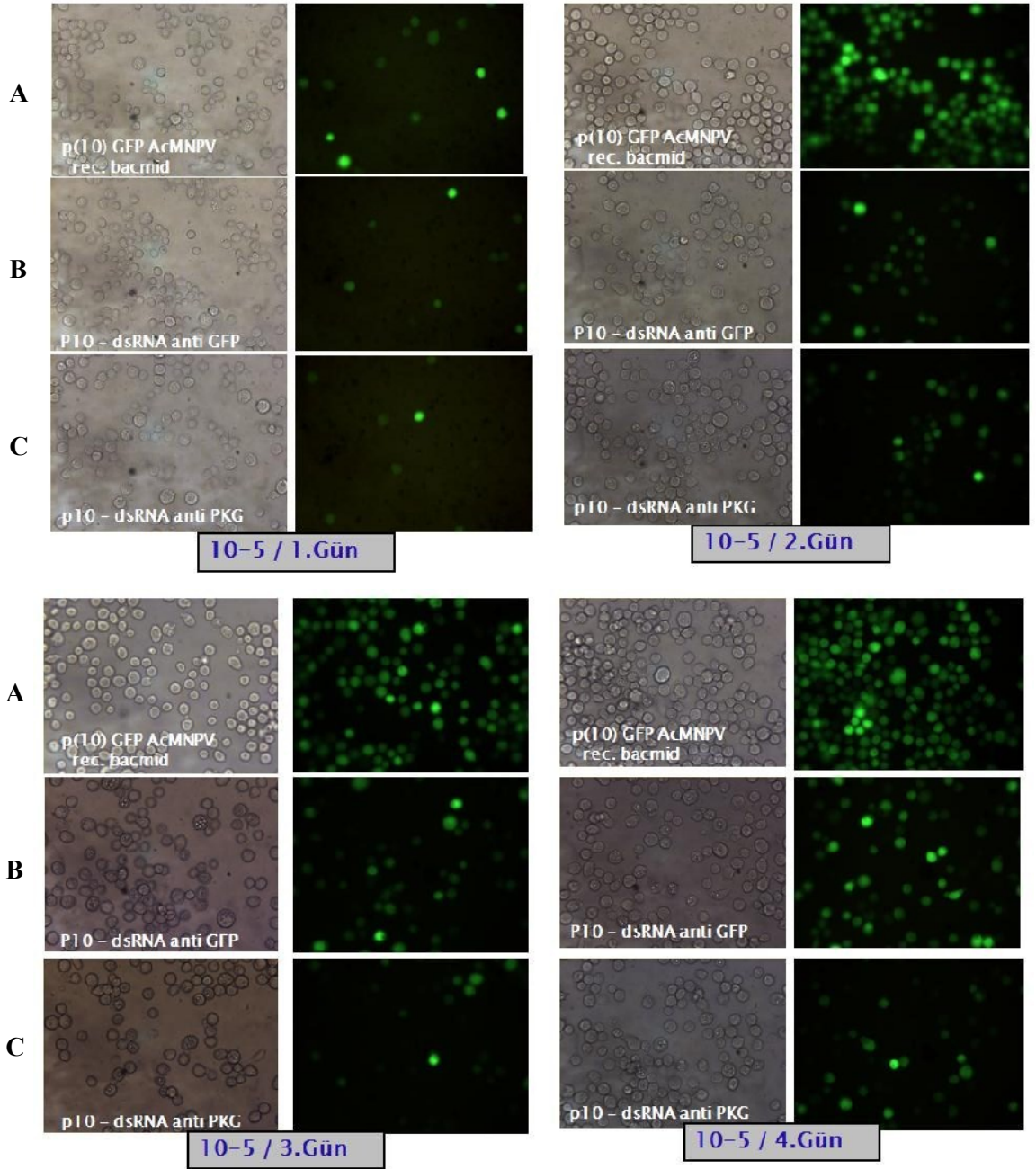
3.1. *pkg* ve *gfp* Genlerine Karşı dsRNA Kodlayan AcMNPV Virüsü ile Ko-enfeksiyon

Spodoptera exigua pkg geninin oluşturulmuş bu gene karşı dsRNA üreten *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) ile susturulmasını gözlemlemek amacı yapılan bu deneyde, AcMNPV *p10 gfp* ile MOI 1 konsantrasyonunda enfekte hücrelerde 24. saatte, *gfp* ekspresyonu gerçekleşmezken, MOI 5 konsantrasyonunda enfekte hücrelerde 24. saatte *gfp* ekspresyonu gözlemlenmiştir. Enfeksiyonu takip eden 24. saatte MOI: 10-1 (AcMNPV dsRNA anti *pkg* MOI 10, AcMNPV dsRNA anti *gfp* MOI 10, AcMNPV *p10 gfp* MOI 1) için hücrelerde *gfp* ekspresyonunun gerçekleşmezken MOI: 10-5 (AcMNPV dsRNA anti *pkg* MOI 10, AcMNPV dsRNA anti *gfp* MOI 10, AcMNPV *p10 gfp* MOI 5) *gfp* ekspresyonu gözlemlendi fakat dsRNA anti *gfp* ve dsRNA anti *pkg* ile enfekte edilen hücrelerin ekspresyon seviyelerinde herhangi bir farklılık görülmedi. 48. saatte polihedrin yapıların oluşmaya başladığı her iki enfeksiyonda da görüldü ve yine *gfp* ekspresyon seviyelerinin aynı olduğu gözlemlendi. 72. ve 96. saatlerde her iki enfeksiyonda yapılan gözlemlerde ise dsRNA anti *pkg* ile enfekte olan hücrelerde *gfp* ekspresyonunun dsRNA anti *gfp* ile enfekte olan hücrelere göre daha da az olduğu ve hücrelerde aynı zamanda polihedrin sayısında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 7; Şekil 8).

Deney sonucuna göre enfeksiyondan sonra 3.gün ve 4.gün sonunda dsRNA kullanılarak *pkg* geninin baskılandığı belirlendi.



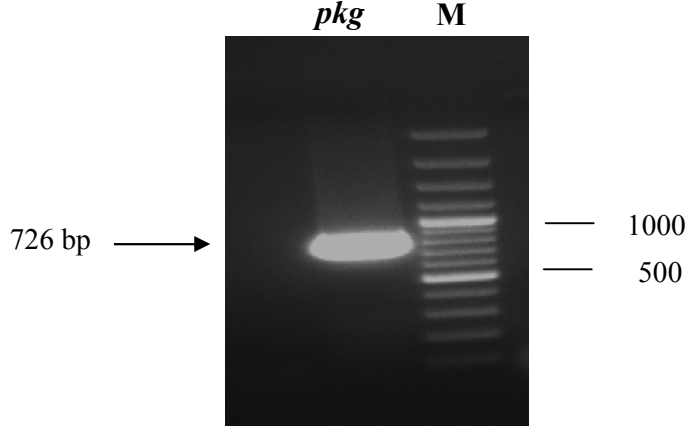
Şekil 7. Düşük bakmid enfeksiyonu durumunda *pkg* geninin dsRNA kullanılarak susturulması. A; Kontrol (*p10 gfp* AcMNPV rec. bakmid, MOI:1), B; *p10 gfp* AcMNPV rec. bakmid (MOI:1) ve AcMNPV dsRNA anti *gfp* (MOI:10), C; *p10 gfp* AcMNPV rec. bakmid (MOI:1) ve AcMNPV dsRNA anti *pkg* (MOI:10)



Şekil 8. Yüksek bakmid enfeksiyonu durumunda *pkg* geninin dsRNA kullanılarak susturulması. A; Kontrol (*p10 GFP AcMNPV rec. bacmid*, MOI:5), B; *p10 GFP AcMNPV rec. bacmid* (MOI:5) ve AcMNPV dsRNA anti *gfp* (MOI:10), C; *p10 GFP AcMNPV rec. bacmid* (MOI:5) ve AcMNPV dsRNA anti *pkg* (MOI:10)

3.2. Hairpin Oluşturacak *pkg* Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

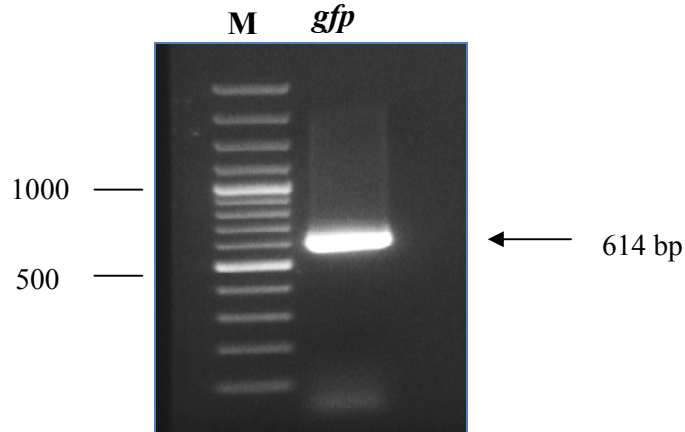
Spodoptera exigua pkg geni, dizayn edilen uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapıldı. 726 bp büyüklüğünde ki *pkg* bantı agaroz jel üzerinde belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. PCR ile çoğaltılmış *S. exigua pkg* geninin agaroz jel görüntüsü, M: 1 kb DNA Ladder (Promega)

3.3. Hairpin Oluşturacak *gfp* Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

gfp geni, dizayn edilen uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapıldı. 614 bp büyüklüğündeki *gfp* geni bantı agaroz jel üzerinde belirlendi (Şekil 10).

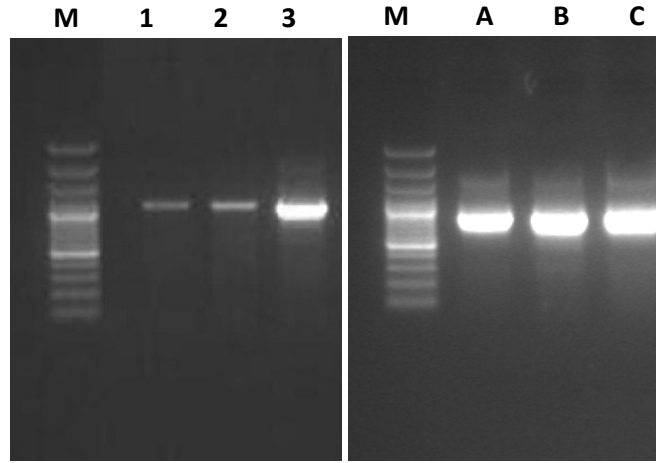


Şekil 10. PCR ile çoğaltılmış *gfp* geninin agaroz jel görüntüsü, M: 1 kb DNA Ladder (Promega)

3.4. Gateway Klonlama

3.4.1. BP Reaksiyonu

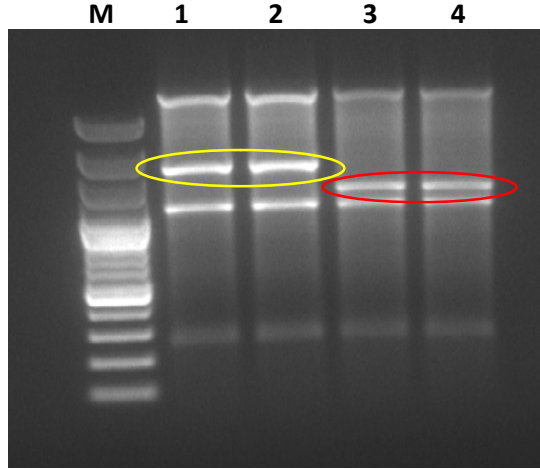
PCR ile çoğaltılan *pkg* ve *gfp* genleri jelden temizlenerek pDONR207 klonlama vektörüne aktarıldılar. *pkg* ve *gfp* genlerini ihtiva eden pozitif klonlar koloni PCR yöntemiyle belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Koloni PCR ile belirlenen pozitif klonların agaroz jel görüntüsü, M: 1 kb DNA Ladder (Promega), 1-2-3: *pkg* geni, A-B-C: *gfp* geni

3.4.2. LR Reaksiyonu

BP Reaksiyon sonrası koloni PCR ile belirlenen doğru klonlardan kit (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) kullanılarak saf plazmid DNA'ları izole edildi. İzole edilen plazmidler, pET28a- GW1a+2 ekspresyon vektörüne LR Clonase™ II enzimi vasıtası ile aktarıldı. Bu reaksiyonda *pkg* ve *gfp* genlerinin buldukları pDONR207 vektöründen pET28a- GW1a+2 vektörüne rekombinasyon ile aktarılması beklenmektedir. Bu genleri ihtiva eden rekombinant pET28a-GW1a+2 vektörleri restriksiyon analizi ile belirlendi ve agaroz jelde elektroforez yapıldı (Şekil 12).



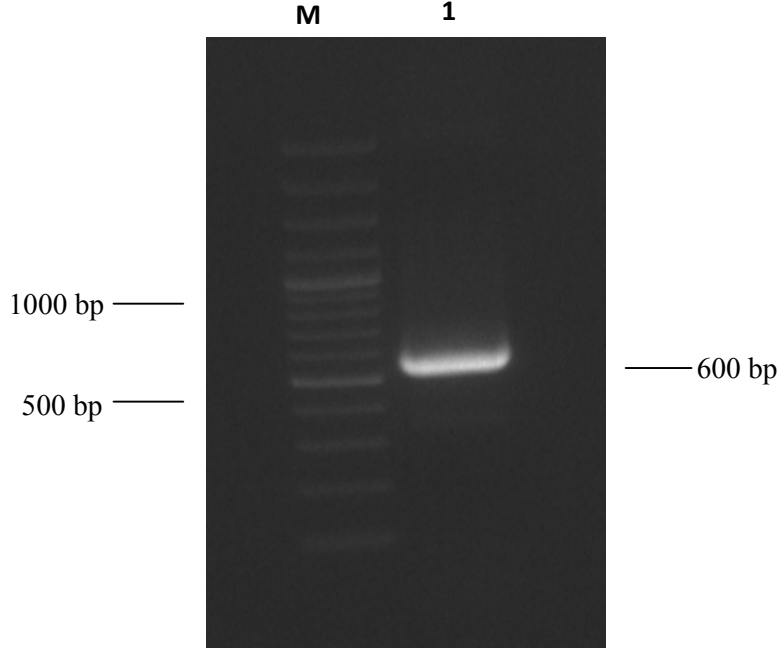
Şekil 12. *NsiI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pET28a-GW1a+2, *pkg* ve *gfp*'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (1 ve 2: pET28aGW1a+2 + *pkg*'nin *NsiI* kesim sonucu, 3 ve 4: pET28a-GW1a+2 + *gfp*'nin *NsiI* kesim sonucu, M: 1 kb DNA Ladder (Promega))

3.5. pFastBac Dual Vektörüne OpMNPV ie1 Promotorunun Klonlanması

Bacmid oluşturmak için kullanılacak transfer vektöründe (pFastBac Dual) *pkg* ve *gfp* genleri erken transkripsiyon gerçekleştiren bir promotor olan OpMNPV ie1'in önüne klonlanmasına karar verildi. Bunun için öncelikle OpMNPV ie1 promotoru bulunduğu yerden PCR ile çoğaltılarak pFastBac Dual vektörüne klonlandı.

3.5.1. OpMNPV ie-1 Promotorunun PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

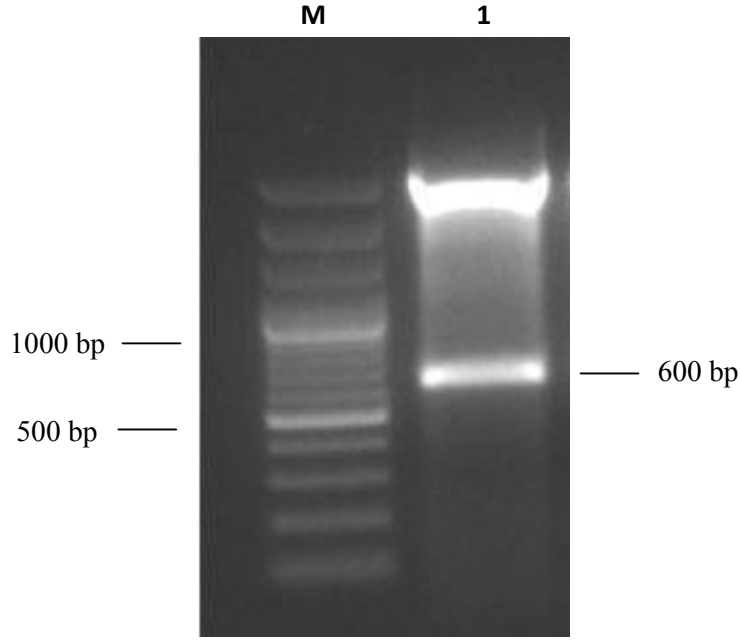
OpMNPV ie1 promotor bölgesi uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapıldı. Beklenen 600 bp civarındaki bant agaroz jelde görüntülendi (Şekil 13).



Şekil 13. PCR ile çoğaltılmış OpMNPV ie1 promotorunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb DNA Ladder (Promega), 1: OpMNPV ie1 promotor bölgesi

3.5.2. OpMNPV ie1 promotor bölgesinin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması

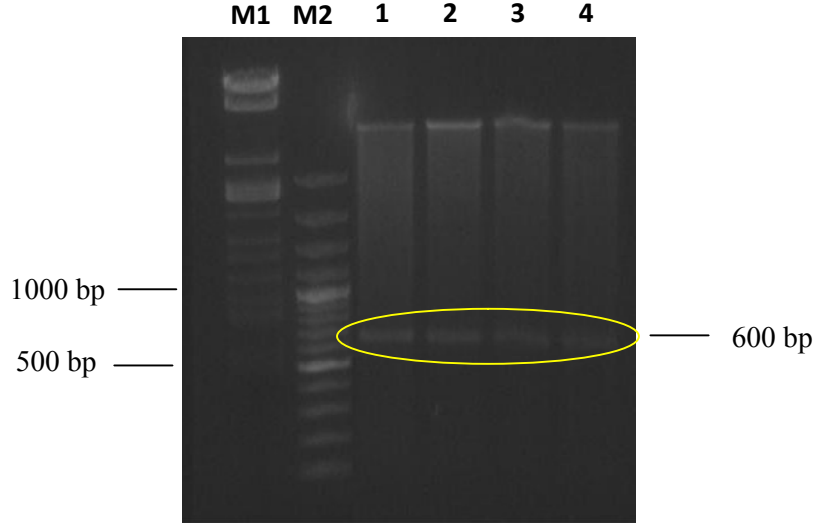
OpMNPV ie1 promotor bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarıldı. ie1 promotor bölgesinin pJET1.2/blunt klonlama vektöründeki mevcudiyeti restriksiyon analizi ile teyit edildi (Şekil 14). Klonlanan fragmenti içerdiği belirlenen klonun nükleotid sırasının doğruluğunun belirlenmesi için dizin analizi (Eurofins) yapıldı. Elde edilen nükleotid sırası NCBI web adresindeki blast programı kullanılarak değerlendirildi ve yanlış içermediği belirlendi.



Şekil 14. *XhoI/NsiI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pJET1.2/blunt ve *ie1*'in %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1: pJET1.2/blunt'ın *XhoI* ve *NsiI* kesim sonucu, M: 1 kb DNA Ladder)

3.5.3. pFBD *ie1* Vektörünün Oluşturulması

Klonlanan *ie1* promotörü nükleotid dizilimini doğru içeren klondan kit kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmış *ie1* promotörü pFBD *polh Δp10* vektörüne aktarılmak üzere *XhoI/NsiI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezine tabii tutuldu. Bu arada pFBD *polh Δp10* vektörü de aynı enzimler ile kesildi. *XhoI* ve *NsiI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör ve aynı enzimler ile kesilmiş *ie1* promotörü birbirine yapıştırıldı.



Şekil 15. *XhoI/NsiI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pFBD *polh* Δ *p10* vektörü ve iel'in %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1,2,3,4: pFBD *polh* Δ *p10* vektörünün *XhoI* ve *NsiI* kesim sonucu, M: 1 kb DNA Ladder)

4. TARTIŞMA

Bazı patojenler, konaklarında davranışsal değişimlere neden olabilir. Bu olgu patojenin bulaşması veya hayatta kalma olanağını arttırıcı durumları ortaya çıkarabilir. Bu konu üzerinde çeşitli örneklerle çalışılmıştır. Örneğin, parazit yabancı larvaları *Hymenoepimecis sp.* Konak örümceklerin normalde sadece kur sırasında yaptıkları koruyucu koza ağı örmelerini sağlar ve bunu pupa dönemlerini geçirmek için kullanırlar. Birçok parazitin konak davranışı üzerinde belirgin etkileri olduğu belirlenmiştir. Yiyecek arama, hareket yeteneği veya genel aktivitelerinde bu etkiler görülmektedir. Bunların çok azının moleküler düzeyde mekanizmaları araştırılmış ve bu davranış değişiklikleri altında yatan gerçekler hakkında oldukça sınırlı bilgiler elde edilmiştir (Eberhard, 2000).

Virüsler konak davranışı üzerinde oldukça etkili klinik sendromlarla birlikte davranışsal değişimlere neden olurlar. Bunun en bilinen örneği kuduz virüsüdür. Kuduz virüsü, bulaştığı canlıda sebep olduğu saldırganlık ve aşırı tükürük salgısı salınımının açıkça virüsün yayılışına katkı sağladığı bilinmektedir (Lefevre vd., 2009).

Diğer bir viral örnekte bal arılarında ölümcül olmayan enfeksiyona neden olan pikorna benzeri virüslerden Kakugo virüslerdir (Iflavirüsler). Bu virüs, ilk olarak işçi bal arılarının (*Apis mellifera L.*) beyin dokularında keşfedilmiştir. Bu virüsle enfekte olan işçi arılar saldırgan olmaktadır. Bu saldırgan işçi bal arıları en tehlikeli düşmanı dev eşek arılarına (*Vespa mandarinia japonica*) saldırmaktadır. Bu davranışın sadece viral enfeksiyon olan bireylerde görülmesi, bunun virüs enfeksiyonu nedeniyle ortaya çıktığını düşündürmüştür (Fujiyuki vd., 2009).

Bakülovirüslerle enfekte olan böcekler de, enfeksiyon sonucu davranış değişikliklerinin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu davranışsal değişimler böceğin aşırı aktif hareketi ve bulunduğu yerden dikey doğrultuda (bitkinin) en üst noktaya tırmanmasıdır. Bu olgu “Wipfelkrankheit” (Ağaç tepesi hastalığı) olarak adlandırılmıştır (Goulson, 1997; Hofmann, 1891). Bu davranışın temelinde virüsün daha geniş bir yayılma imkanı hipotezi öne sürülmektedir. Tırmanma davranışı, virüs enfeksiyonu sonucunda sıvılaştıran larvanın vücudunun damlalar halinde alt bölgelerde bulunan yapraklara dağılarak daha geniş bir alana yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Raymond vd., 2005).

Her ne kadar parazitlerin davranış değişiklerine neden olduğu düşünülse de bu adaptasyonlarda konak canlının etkin olabileceği kuvvetle muhtemeldir. Bir başka görüőe göre ise larvalarda görülen hızlı hareket yeteneği ve tırmanma davranışı yeni nesillere viral partiküllerin ulaşmasını ve dolayısıyla da enfeksiyonu baskılamak için konak canlı tarafından gerçekleştirilen bir davranış olabilir. Tırmanma canlıyı daha fazla güneş kaynaklı UV ışınlarına maruz bırakacaktır. Bu olgu davranışsal ateş (behavioral fever) olarak adlandırılır. Konağın bu mekanizmayı viral enfeksiyonu düşürme amaçlı yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca tırmanma sonucunda bitkinin üst bölgelerinde bulunacak olan larvalar avcılara daha açık hale gelecek ve dolayısıyla avlanarak yeni neslin bulunacağı bölgeden uzaklaştırılmış olacaktır. Bu durumda virüs bulunduğu ortamdan uzaklaştırılmış olacaktır. Çünkü virüsler avcının sindirim sistemindeki asidik ortama dayanıklıdır. Son olarak, konak için savunma mekanizması olarak düşünülen teori ise larvaların güneş ışınlarına açık şekilde maruz kaldıkları durumda UV ışınları virüsleri inaktif hale getirmesiyle inaktif virüslerin yayılmalarına rağmen enfeksiyona neden olmaları imkanını ortadan kaldırmaktadır (Goulson, 1997). Dikkate alınması gereken en önemli noktalardan biriside larvanın tırmanmaya enfeksiyon başlangıcının hemen ardından mı yoksa geç bir aşamasında mı başladığıdır. Çünkü enfeksiyonun hemen ardından ortaya çıkacak bir tırmanma davranışı konak kaynaklı bir davranışsal hareket olduğu görüşünü desteklerken enfeksiyonun geç safhasında görülecek bir tırmanma davranışı viral kaynaklı bir kontrolü işaret edecektir. Bu iki teorinin temelinde eğer enfeksiyonun başlangıcında larva tırmanma davranışı gösteriyorsa, avcılar tarafından tüketilmesi veya UV ışınlarına maruz kalarak enfeksiyonun baskılanması şansı daha fazla olacaktır. Bu teorilerde görüldüğü gibi davranışsal değişimlerin kaynağı hakkında farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu etkileri parazitin, konağın veya her ikisinin mi birlikte oluşturduğu araştırılmalıdır. Burada görüldüğü üzere viral enfeksiyon sonucu böcekte meydana gelen davranışsal değişikliklere neden olan mekanizmaların kaynağı henüz net olarak bilinmemektedir.

Ancak son yıllarda bakülovirus grubuna dahil *Bombyx mori* nükleopolihedrovirüsle (BmNPV) ipek böceği (*Bombyx mori*) larvalarında gerçekleştirilen çalışmalarda BmNPV tarafından kodlanan protein tirozin fosfataz (*ptp*) geninin konağın aşırı aktif hareket etmesinde etkili olduğu belirlenmiştir *ptp* geni uzaklaştırılan BmNPV'nin enfekte ettiği ipek böceği larvalarında aşırı aktif hareket etme davranışı gözlenmediği ortaya konulmuştur (Kamita vd., 2005).

Davranış, canlılarda farklı yaşam koşullarını göz önünde bulundurduğumuzda yaşamlarını sürdürmelerinde en önemli etkenlerden birisidir. Davranış en temel manada canlıda meydana gelen biyokimyasal değişimler sonucunda ortaya çıktığı ve biyokimyasal bir dizi olayın sıralı olarak kontrollü bir şekilde düzenlediği bir olgudur. Örneğin böceklerde davranışsal değişimlerin çeşitli türlerde *for* (foraging=Besin arama) geni ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Buradaki değişimler besin arama ve hareketlilik üzerinde görülmektedir. Parazitlerin ve mikroorganizmaların bu değişimleri kendi avantajlarına kullanmaları oldukça yaygın karşılaşılan bir olgudur. Tabi ki tüm bu olguları tartışabilmemiz için konağın kendisinde olan tüm bu değişimlerin kaynağını bilmemiz temel olarak gereklidir.

Davranışın düzenlemesi mekanizmaları üzerinde en detaylı çalışmaların gerçekleştirildiği canlı sirke sineği *Drosophila melanogaster*'dir. Sirke sineği larvaları ve erginlerinde iki farklı davranış tipi gösteren bireyler bulunmaktadır. Bu bireylerin gösterdikleri davranışsal fenotipler hareketli ve durgun olarak adlandırılmaktadır. Hareketli fenotip besin arama davranışında aşırı aktif davranış gösterirken durgun fenotip sadece besin tükendiği durumda yeni besine yönelmek üzere hareket etmektedir (Osborne vd., 1997). Yapılan genom haritalama çalışmaları sonucunda *Drosophila* genomunda *dg2 (for)* geni (cGMP bağımlı protein kinazlardan, *pkg*) tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar PKG, RNA ve protein düzeyinin hareketli fenotipte durgun fenotipe oranlar daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Sokolowski vd., 1980; Osborne vd., 1997 & 2001). Benzer durum bal arılarında da (*Apis mellifera*) tespit edilmiştir. Bal arılarında *for* geni homoloğu *Amfor* olarak adlandırılan gen tespit edilmiştir. Bu durumdaki farklılık *Drosophila*'da olduğu gibi işçi balarılar (hareketli) *Amfor* RNA düzeyinin, dişi arılardakinden (durgun) yüksek olduğu belirlenmiştir (Ben-Shahar vd., 2002).

Kırmızı karıncalarda (*Pheidole pallidula*) bulunan *for* geninin homoloğunun (*ppfor*) örneklerin aksine bir davranışsal düzenlemede etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu karıncalarda yuvanın korunmasından sorumlu karıncalar da yüksek PKG aktivitesi gözlemlenirken, küçük işçi karıncalar yuvadan uzak mesafelerde aktif besin arama görevine sahip olmasına rağmen düşük PKG aktivitesi göstermektedir (Lucas vd., 2009).

Yüksek sosyal yapıya (eusocial) sahip böceklerde bu tip araştırmaların gerçekleştirilmesinin temel nedeni, bu tip böceklerde görev paylaşımı olmasıdır. Bu sosyal yapıda böcekler farklı gruplarda farklı görevlere özelleşmiştir. Bu durumda belli gruba

dolayısıyla belli göreve sahip bir böceğe uygun sinyal verilmesi koşulunda rolü değiştirebilmektedir.

Burada da görüldüğü gibi farklı davranışsal değişimler canlılar aleminde bulunmakta ve farklı ilişkiler içermektedir. Mikroorganizma kökenli davranış değişimleri henüz tam olarak anlaşılamadığından, bu çalışmada davranışların düzenlenmesinde etkileri olduğu tespit edilen moleküller (PKG v.b.) üzerine odaklanılması hedeflenmiştir.

Drosophila ve diğer örneklerde açıklandığı gibi, davranış değişimlerinde etkili olduğu bilinen faktör Protein Kinaz G kodlayan *for* genidir. Bakülovirüs enfeksiyonu *S. exigua*'da aşırı aktif hareket davranışına neden olması sebebiyle, konak PKG'nin bakülovirüs enfeksiyonu sonucu *S. exigua*'da ortaya çıkan davranışta etkili bir faktör olduğu hipotezi ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada *Spodoptera exigua pkg* geninin susturulması için kullanılacak olan firkete yapıda dsRNA üreten viral bakmid (viral tabanlı sistemin) yapısının oluşturulması hedeflemiştir. Bu yapının oluşturulmasında kullandığımız strateji RNAi teknolojisidir.

İlk olarak Monique van Oers tarafından oluşturulmuş ve *pkg* ve *gfp* genlerine karşı dsRNA üreten bacmidlerin bu genlerin susturulmasında etkili olduğu belirlenmiş ve buradan hareketle bu genleri susturmada daha farklı bir sistem olan firkete yapıda dsRNA'ların etkinliğini test etmek amacı ile firkete yapıda dsRNA üreten bacmidlerin inşasına karar verilmiştir. Bunun için öncelikle *S. exigua pkg* genine özgü firkete dsRNA'ları üretecek viral bakmidin oluşturulmasında kullanılacak plazmid vektörler hazırlandı. Bu vektörler hem *pkg* genine hem de genin susturulma verimliliğini test edebilmek için kullanılacak olan yeşil floresan protein genine (*gfp*) özgü olarak üretildi. Vektörler bakmid rekombinasyonunda kullanılacaktır. Böcek hücreleri olarak *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücreleri kullanılmıştır.

İleriki çalışmalarda oluşturulacak PKG-RNAi virüsler ile *S. exigua* larvaları enfekte edilerek larvalardaki *pkg* transkripsiyon seviyeleri QPCR ile northern blot ile test edilecek ve viral enfeksiyonun *S. exigua*'da görülen davranışsal değişimlere etkisinin biyokimyasal temeli aydınlatılmış olacaktır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda *Spodoptera exigua pkg* genin RNAi tekniği kullanılarak susturulduğu belirlendi ve konaktaki etkilerinin gözlenmesi için viral tabanlı sistem oluşturuldu.

Monique van Oers tarafından oluşturulmuş ve *pkg* genine karşı dsRNA üreten AcMNPV virüsü ile gerçekleştirilen enfeksiyondan sonra 3. ve 4. gün sonunda *pkg* geninin susturulduğu belirlendi. Daha sonra *pkg* geninin susturulmasında daha farklı sistemlerin test edilmesi amacı ile *pkg* genine karşı firkete yapıda dsRNA üreten bakmidin inşası için gerekli plazmid vektörler hazırlandı.

6. ÖNERİLER

Tezin tartışma bölümünde de belirtildiği gibi bazı patojenler, konaklarında davranışsal değişimlere neden olabilirler. Bakulovirüs enfeksiyonu *S. exigua*'da aşırı hareket davranışına neden olması sebebiyle, konak PKG'nin bakulovirüs enfeksiyonu sonucu *S. exigua*'da ortaya çıkan davranışta etkili olup olmadığının belirlenmesi oldukça önemlidir.

İleriki çalışmalarda *pkg* genin susturulması için oluşturulmuş firkete yapı, pFastBac Dual ie1 vektörüne klonlanılarak bakulovirüs ekspresyon sisteminde rekombinant bakmidler oluşturulabilir. Elde edilen PKG-RNAi virüsler ile *S.exigua* larvaları enfekte edilerek larvalardaki *pkg* transkripsiyon seviyeleri QPCR ile test edilebilir. Böylece *S. exigua*'da görülen davranışsal değişimlerin etkisinin biyokimyasal temeli aydınlatılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B. ve Robinson, G. E., 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. Science, 296, 741-744.
- Bergold, G. H., 1947. Die isolierung des polyeder-virus und die natur der polyeder, Zeitschrift für Naturforschung, 2B, 122-143.
- Blissard, G. W., 1996. Baculovirus-insect cell interactions. Vlak, J. M., De Gooijer C. D., Tramper J., Miltenburger H. G., eds. Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects, AA Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 73-93, pp.
- Browning, D. D., Mc Shane, M., Marty, C. and Ye, R. D., 2001. Functional Analysis of Type 1 cGMP- dependent Protein Kinase Using Green Fluorescent Fusion Proteins. Journal of Biological Chemistry, 276, 13039-13048.
- Cheley, S., Kosik, K. S., Paskevich, P., Bakalis, S. and Bayley, H., 1992. Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells, Journal of Cell Science, 102, 739-752.
- Eberhard, W. G., 2000. Spider manipulation by a wasp larva. Nature, 406, 255-256.
- Feil, R., Kellermann, i. and Hofmann, F., 1995. Functional cGMP-dependent protein kinase is phosphorylated in its catalytic domain at threonine-516, Biochemistry, 34, 13152-13158.
- Federice, B.A., 1999. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. Methods in Biotech, 5, 301-320.
- Fujiyuki, T., Matsuzaka, E., Nakaoka, T., Takeuchi, H., Wakamoto, A., Ohka, S., Sekimizu, K., Nomoto, A. and Kubo, T., 2009. Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L, Journal of Virology, 83, 11560-11568.
- Friesen, P.D. and Miller L. K., 2001. Insect viruses, Knipe D. M., Howley P. M., eds. Fields Virology, Volume 1, Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 599-628, pp.
- Goley, E. D., Ohkawa, T., Mancuso, i., Woodruff, i. B., D'Alessio, i. A., Canda, W. Z., Volkman, L. E. and Welch, M. D., 2006. Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein, Science, 314, 464-467.
- Goulson, D., 1997. Wipfelkrankheit: Modification of host behaviour during baculoviral infection, Oecologia, 109, 219-228.

- Herniou, E. A., Luque T., Chen X., Vlaskovic J. M., Winstanley D., Cory J. S., O'Reilly D. R., 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. Journal of Virology, 75, 8117-8126.
- Hofmann, O., 1891. Die Schlafsucht (Flacherie) der Nonne (*Liparis monacha*) nebst einem Anhang. Insektentötende Pilze mit besonderer Berücksichtigung der Nonne, P Weber, Frankfurt.
- IDT Tutorial 2005, Antisense Technologies, 1-12.
- Kamita, S. G., Nagasaka, K., Chua, i. W., Shimada, T., Mita, K., Kobayashi, M., Maeda, S. and Hammock, B. D., 2005. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 2584-2589.
- Keddie, B. A., Aponte, G. W. and Volkman, L. E., 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. Science, 243, 1728-1730.
- Kurreck, J., 2003. Antisense Technologies improvement through novel chemical modifications. European Journal of Biochemistry, 270, 1628-1644.
- Lefevre, T., Adamo, S. A., Biron, D. G., MissA©, D., Hughes, D. and Thomas, F., 2009. (Chapter 3 Invasion of the Body Snatchers. The Diversity and Evolution of Manipulative Strategies in Host-Parasite Interactions. In Advances in Parasitology, 45-83, pp.
- Lucas, C. and Sokolowski, M. B., 2009. Molecular basis for changes in behavioral state in ant social behaviors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 6351-6356.
- Mau, R. F. L. and Kessing, i. L. M., *Spodoptera exigua* (Hubner). <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/spodopte.htm>, 12/04/2007.
- Mishra, S., Baculoviruses as biopesticides. <http://www.ias.ac.in/currsci/nov251998/articles18.htm>, 05/08/1998.
- Ohkawa, T., L.E. Volkman and Welch, M. D., 2008. Baculovirus-mediated actin polymerization : a role in entry and secondary transmission. American Society for Virology 27th Annual Meeting.
- Oppenheimer, D. I. and Volkman, L. E., 1997. Evidence for rolling circle replication of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus genomic DNA. Archives of Virology, 142, 2107-2113.
- Osborne, K. A., De Belle, i. S. and Sokolowski, M. B., 2001. Foraging behaviour in *Drosophila* larvae: Mushroom body ablation. Chemical Senses, 26, 223-230.

- Osborne, K. A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R. A., Coulthard, A., Pereira, H. S., Greenspan, R. i. and Sokolowski, M. B., 1997. Natural behavior polymorphism due to a cGMP- dependent protein kinase of *Drosophila*. Science, 277, 834-836.
- Peng, K., van Oers M. M., Hu Z., van Lent J. W. and Vlak. J. M., 2010. Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. Journal of Virology, 84.
- Raymond, B., Hartley, S. E., Cory, i. S. and Hails, R. S., 2005. The role of food plant and pathogen- induced behaviour in the persistence of a nucleopolyhedrovirus. Journal of Invertebrate Pathology, 88, 49-57.
- Rohrmann, G. F., 2008. *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology.
- Scholten, A., Fuss, H., Heck, A. i. R. and Dostmann, W. R., 2007. The hinge region operates as a stability switch in cGMP-dependent protein kinase I. FEBS Journal, 274, 2274-2286.
- Sokolowski, M. B., 1980. Foraging strategies of *Drosophila melanogaster*: A chromosomal analysis. Behavior Genetics, 10, 291-302.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I. and Lobo De Souza, M., 2006. Baculoviruses - Re-emerging biopesticides. Biotechnology Advances, 24, 143-160.
- Tanoue, S. and Nishioka, T., 2003. Molecular characterization of a membrane-bound cGMP dependent protein kinase from the silk moth *Bombyx mori*. Insect Molecular Biology, 12, 621-629.
- Theilmann, D. A. and Stewart, S., 1993. Analysis of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus trans-activators IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies. Journal of General Virology, 74, 1819-1826.
- Theilmann, D. A. Blissard G. W., Bonning B, Jehle J. A., O'Reilly D. R., Rohrmann G. F., Thiem S., Vlak J. M., 2005. *Baculoviridae*. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A., eds., Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, Academi Press, 177-185.
- Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P. and Renaud, F., 2002. Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? Journal of Evolutionary Biology, 15, 356-361.
- Trewavas, A., 2009. What is plant behaviour? Plant, Cell and Environment, 32, 606-616.

Uprichard, S. L. 2005. The therapeutic potential of RNA interference. FEBS Letters, 579, 5996-6007.

URL_1, <http://www.youtube.com/user/infoagrocom#p/search/1/gBAmuiHAfu4>. 26 Ekim 2009.

Zanotto P. M., Kessing B. D. and Maruniak J. E., 1993. Phylogenetic interrelationships among baculovirus: evolutionary rates and host associations. Journal of Invertebrate Pathology, 62, 147-164.

Zummer, M. and Faulkner, P., 1979. Absence of protease in baculovirus polyhedral bodies propagated in vitro. Journal of Invertebrate Pathology, 33, 383-384.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu 1991-1996 yılları arasında Trabzon Dumlupınar İlköğretim Okulu'nda, Ortaokulu 1996-1999 yılları arasında Trabzon Cumhuriyet Ortaokulu'nda ve liseyi 1999-2003 Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2004-2005 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında bu bölümden ikincilikle mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.