

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜSE AİT AMV133 KODLU AÇIK
OKUMA ZİNCİRİNİN HOMOLOG REKOMBİNASYONLA SİLİNMESİ VE
REKOMBİNANT VİRÜS OLUŞTURULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

İnci CEVHER

EKİM 2011

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜSE AİT AMV133 KODLU AÇIK
OKUMA ZİNCİRİNİN HOMOLOG REKOMBİNASYONLA SİLİNMESİ VE
REKOMBİNANT VİRÜS OLUŞTURULMASI**

İnci CEVHER

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05. 09. 2011
Tezin Savunma Tarihi : 06. 10. 2011**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

İnci CEVHER tarafından hazırlanan

**AMSACTA MOOREI ENTOMOPOKSVİRÜSE AİT AMV133 KODLU AÇIK
OKUMA ZİNCİRİNİN HOMOLOG REKOMBİNASYONLA SİLİNMESİ VE
REKOMBİNANT VİRÜS OLUŞTURULMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20/09/2011 gün ve 1422/5-a sayılı

kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06/10/2011 tarihinde yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ


olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU



Üye : Doç. Dr. Ersan KALAY



Üye : Doç. Dr. Kazım SEZEN



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei* Entomopoksvirüsüne ait AMV133 Kodlu Açık Okuma Zincirinin Homolog Rekombinasyonla Silinmesi ve Rekombinant Virüs Oluşturulması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez süresince yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na ve tezin geliştirilmesinde ve planlanmasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tez yazım sürecinde ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Kazım SEZEN’e, tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan Araş. Gör. Emine ÖZŞAHİNE’e, laboratuvar çalışma arkadaşlarımdan Dr. Hacer MURATOĞLU’na, maddi manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşım yüksek biyolog Hüseyin TEPE’ye, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma ve tez süresince bana her konuda destek veren aileme minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Aynı zamanda, tez çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu’na (TÜBİTAK) teşekkür ediyorum.

İnci CEVHER
Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Amsacta moorei* Entomopoksvirüse Ait AMV133 Kodlu Açık Okuma Zincirinin Homolog Rekombinasyonla Silinmesi ve Rekombinant Virüs Oluşturulması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 05/09/2011

İnci CEVHER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
2. Giriş	1
1.2. Poxvirüsler	4
1.2.1. Poxvirüslerin Sistematığı.....	4
1.2.2. Poxviridae Familyasının Genel Özellikleri	4
1.3. Entomopoxvirüsler ve Genel Özellikleri	7
1.3.1. Sferoidler	8
1.3.2. Spindiller	9
1.3.3. Yapısal Polipeptitler	9
1.4. Entomopoxvirüslerde Genom Özellikleri.....	9
1.5. Entomopoxvirüslerde Replikasyon.....	10
1.6. <i>Amsacta moorei</i> Entomopoxvirüs (AmEV	12
1.7. AMV133	13
1.8. Viral Lipazlar.....	14
1.9. Çalışmanın Amacı	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini	17
2.2. Virüslerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Tayini.....	17
2.3. AMEV DNA İzolasyonu	18
2.4. Rekombinant Vektörlerin Hazırlanması	19
2.4.1. Geçici Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	19
2.4.1.1. Promotorunu Taşıyan AMV133 Geninin PCR ile Çoğaltılması	19
2.4.1.2. Elektrokompotent DH5α <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	19

2.4.1.3.	AMV133 Geninin Agaroz Jelden Temizlenmesi ve pJET-2T Vektörüne Klonlanması.....	20
2.4.1.4.	Elektrotransformasyon.....	21
2.4.1.5.	AMV133 Genini Taşıyan Klonların Elde Edilmesi.....	21
2.4.1.6.	AMV133 Genini İhtiva Eden Klonların Restriksiyon Analizleri.....	22
2.4.1.7.	AMV133 Genini İhtiva Eden Klonların Dizi Analizi.....	22
2.4.2.	Homolog Rekombinasyonda Kullanılacak Vektörün Hazırlanması.....	23
2.4.2.1.	US-DS Askı Bölgelerini İhtiva Eden Rekombinant pBluescript SK(-) Klonların Elde Edilmesi	23
2.4.2.2.	Gfp'nin PCR ile Çoğaltılması ve pGEMT-Easy Vektörüne Klonlanması	23
2.4.2.3.	Gfp Taşıyan pGEMT-Easy İhtiva Eden Klonların Restriksiyon Analizleri	25
2.4.2.4.	US-DS Askı Bölgelerini Taşıyan pBluescript SK(-) Vektörüne GFP Klonlanması.....	26
2.4.2.5.	Elektrotransformasyon.....	26
2.4.2.6.	US-DS Askı Bölgelerini ve Gfp'nini Taşıyan pBluescript Klonlarının Elde Edilmesi.....	27
2.4.2.7.	US-DS Askı Bölgelerini ve Gfp'yi Taşıyan pBluescript Klonların Dizin Analizi	27
2.4.2.8.	US-DS Askı Bölgelerini ve Gfp'yi Taşıyan pBluescript Klonların Restriksiyon Analizleri	28
2.5 .	Rekombinant Virüsün Oluşturulması	28
2.5.1.	pSK-AmΔLip/ <i>gfp</i> , Geçici Ekspresyon Vektörü ve Yaban Tip AMEV'nin Ld Hücrelerine Transfeksiyonu.....	29
2.5.2.	Plak Deneyi ile Rekombinant AMEV'nin Seçimi.....	31
3.	BULGULAR	33
3.1.	Virüslerin Üretimi.....	33
3.2.	Geçici Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	33
3.3.	Lipaz Geni (AMV133) Çıkartılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması	34
3.4.	Plak Deneyleri ile Rekombinant Virüsün Seçimi.....	37
3.4.1.	Sadece Transfer Vektör ile Yapılan Plak Deneyleri.....	38
3.4.2.	Transfer Vektörün Yanında Geçici Ekspresyon Vektörünün Kullanıldığı Plak Deneyleri	38
4.	TARTIŞMA.....	40
5.	SONUÇLAR.....	43
6.	ÖNERİLER	44
7.	KAYNAKLAR.....	45

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOKSVİRÜSE AİT AMV133 KODLU AÇIK OKUMA ZİNCİRİNİN HOMOLOG REKOMBİNASYONLA SİLİNMESİ ve REKOMBİNANT VİRÜS OLUŞTURULMASI

İnci CEVHER

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

2011, 51 Sayfa

Amsacta moorei Entomopoxvirüs (AmEV) Poxviridae familyasına ve Entomopoxviridae subfamilyasına ait bir böcek virüsüdür. AmEV ‘nin tüm genom analizinin yapıldığı çalışmada AMV133 kodlu açık okuma zincirinin muhtemel bir lipaz kodladığı ileri sürülmüştür. Önemli böcek zararlıları üzerinde yüksek derecede patojenik etki göstermektedir. Bunun yanında, AmEV gen ekspresyon ve gen terapi vektörü olarak kullanılabilmekte ve insan virüslerinin mekanizmalarının anlaşılmasında çalışılabilecek model virüs olması bakımından büyük öneme sahiptir.

AMV133 genini silmek için transfer vektör ve geçici ekspresyon vektörün oluşturuldu. Deneyler iki farklı grup halinde yapıldı. Birinci grup, hem transfeksiyon hem de plak deneylerinde sadece transfer vektörün kullanıldığı gruptur. İkinci grup ise, transfer vektörünün yanında geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı gruptur.

AMV133 geni homolog rekombinasyon ile AmEV genomundan silindi. Oluşturulan rekombinant virüs Am Δ Lip/*gfp* olarak isimlendirildi. Yapılan çalışmalarda, ikinci grup transfeksiyon solüsyonunda daha fazla *gfp* gözlemlendi, aynı zamanda plak deneylerinde de ikinci grupta daha fazla rekombinant virüs gözlemlendi. Ancak, her iki grupta oluşturulan rekombinant virüsler çoğaltılamadı. Bu da, *lipazın* AmEV için önemli bir gen olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Am Δ Lip/*gfp*, *Amsacta moorei* Entomopoxvirüs (AmEV), lipaz, böcek virüsü, homolog rekombinasyon.

Master Thesis

SUMMARY

DETECTION OF AMV133 ORF OF *AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOXVIRUS BY
HOMOLOG RECOMBINATION AND CONSRUCTION OF RECOMBINANT VIRUS

İnci CEVHER

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Remziye NALÇACIOĞLU
2011, 51 Pages

Amsacta moorei Entomopoxvirus (AmEV) is an insect virus that belongs to Poxviridae family and Entomopoxviridae subfamily. After analysis of complete genomic sequence of AmEV, ORF AMV133 was suggested to be a putative triacylglyceride lipase gene. It has a high level pathogenic effect on insect pests. Furthermore, AmEV can be used as gene expression and gene therapy vectors, and has great importance as model virus for studying the mechanism of human viruses.

Transfer vector and transitory expression vector was constructed to delete AMV133 gene. Assays were made as two different group. First group is that solely transfer vector was used both transfection and plak assays. Second one is that transfer vector and also transitory expression vector were used in that assays.

AMV133 gene was deleted from AmEV genom by homolog recombination. Consructed recombinant virus was named as Am Δ Lip/*gfp*. At works which were made, it has been observationed that in second group transfection solution has more *gfp*. At the same time, second one has more recombinant virus in plaque assays. However, constructing recombinant viruses were not increased, and this is also show that lipase is an essential gene for AmEV.

Key Words: Am Δ Lip/*gfp*, *Amsacta moorei* Entomopoxvirus (AmEV), lipase, insect virus, homolog recombination.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Poksvirüslere ait genel görünüm	5
Şekil 2.	Vaksinya virüs replikasyonunun şematik görünümü.....	6
Şekil 3.	Entomopoxvirüs şematik görünümü.....	8
Şekil 4.	Entomopoxvirüslerin replikasyonunun şematik görüntüsü	11
Şekil 5.	Geçici ekspresyon vektörünün oluşturulması.....	20
Şekil 6.	Rekombinant virüsün oluşturulması.....	29
Şekil 7.	Hem transfer vektörün hem de geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı transfeksiyon işlemi	31
Şekil 8.	Geçici ekspresyon vektörün jel görüntüsü.....	34
Şekil 9.	Transfer vektör ile birlikte geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı transfeksiyon görüntüsü.....	34
Şekil 10.	Homolog rekombinasyonda kullanılmak üzere transfer vektörün jel görüntüsü	35
Şekil 11.	Sadece transfer vektörün kullanıldığı transfeksiyon görüntüleri.....	35
Şekil 12.	Transfer vektörün yanında geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı ikinci kez çoğaltılan transfeksiyon solüsyonu görüntüsü transfeksiyon görüntüleri	36
Şekil 13.	Sadece transfer vektörünün kullanıldığı ikinci kez çoğaltılan transfeksiyon solüsyonu görüntüsü	36
Şekil 14.	Homolog rekombinasyondan sonra oluşan DNA dizisi	37
Şekil 15.	pSK-AmΔLip/ <i>gfp</i> ile transfeksiyondan sonra Ld652 hücreleri.....	38
Şekil 16.	pSK-AmΔLip/ <i>gfp</i> ile pJET-promotor+AMV133'ün transfeksiyonundan sonra Ld652 hücreleri.....	39

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik özelliği	4
Tablo 2. Bazı Coleopteran entomopoxvirüslerin morfolojik özellikleri.....	8
Tablo 3. AMV133 - PCR deneyinde kullanılan primerler.....	19
Tablo 4. Homolog rekombinasyon için kullanılan primerler.....	25

SEMBOLLER DİZİNİ

A+T	: Adenin ve Timin Nükleotit
AMEV	: <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs
AMV133	: AMEV'nin 133 Kodlu Açık Okuma Zinciri
bp	: Baz Çifti
ddH₂O	: İki Kere Damıtılmış Su
DH10β	: <i>Escherichia coli</i> 'nin Bir Alt Türü
DH5α	: <i>Escherichia coli</i> 'nin Bir Alt Türü
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
EPDA	: End Point Dilution Assay
EPV	: Entomopoksvirüs
FBS	: Fetal Bovine Serum
GFP	: Yeşil Floresan Protein
gfp	: Yeşil Floresan Protein Kodlayan Gen
HCl	: Hidrojen Klorik Asit
ICTV	: Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi
IL-2	: İnterlökin-2 geni
IPTC	: İzopiripil beta-D-tiyogalaktosid
LB	: Luria Bertani
Ld652	: <i>Lymantria dispar</i> 'dan Böcek Hücre Kültürü
M	: Molar
mM	: Milimolar
MOI	: Multiplicity of Infection
mRNA	: Mesajcı RNA
ORF	: Açık Okuma Zinciri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: H İyon Konsantrasyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: RNA Parçalayıcı Enzim

rpm	: Dakikadaki Dönme Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS İçeren Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TENS	: Tris-HCl, EDTA, NaOH ve SDS İçeren Tampon
vAmΔLip/gfp	: Lipaz Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
VV	: Vaksinya Virüs
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat Derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tanımlanan hayvan türlerinin % 97'sini böcekler oluşturmaktadır ve bunların %99,5'inin hem doğaya hem de insana faydalı olduğu bilinmektedir. Var olduğu bilinen yaklaşık 1 milyon 300 bin böcek türünün sadece % 0,5'i doğa ve insana zarar vermektedir. Sayıca az görülmesine rağmen oldukça büyük etkileri vardır. Böceklerde doğal enfeksiyon meydana getiren çeşitli mikrobiyal etmenler vardır (Tanada ve Kaya, 1993; Boucias ve Pendland, 1998; Charles vd., 2000). Böceklerin hastalanmalarına ve ölümlerine sebep olan böcek virüsleri bu etmenlerin başında gelmektedir (Hunter-Fujita vd., 1998; Miller ve Ball, 1998).

Böcek virüslerinin, doğa ve insana olumlu etkilerinin yanında olumsuz etkileri de vardır. Olumsuz etkileri, bal arıları gibi, insanlara ve çevreye faydalı olan böceklerin virüsler yüzünden hastalanıp ölmeleri olarak ifade edilebilir. Olumlu etkileri ise, fındık kurdu, sivrisinek gibi, çeşitli tarım ve orman ürünlerini aynı zamanda insan sağlığını etkileyen zararlı böcekler ile virüsler sayesinde mücadele edilebilmesidir. Böylece böcek virüsleri, zararlı böceklere karşı mücadelede kullanılan önemli biyolojik mücadele ajanı materyali haline getirilmiştir (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000; Sezen ve Demirbağ, 2005). Böcek virüslerinin etkili ve hedefi sınırlı biyolojik kontrol ürünleri olarak bilinmeleri (Sezen ve Demirbağ, 2005), önemli proteinlerin üretildiği gen ekspresyon vektör sistemlerini oluşturmaları (Jarvis., 2003; Ikonomou vd., 2003; Stanbridge vd., 2003), insan sağlığını tehdit eden virüslerin enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılmasında model (Sezen ve Demirbağ, 2005) ve gen tedavisinde gen transfer vektörü (Sezen ve Demirbağ,2005) olarak kullanılabilmeleri bilim adamlarının böcek virüslerini çalışmalarında önemli etken oluşturmuştur.

Tez konusu olan lipazlar, virüslerde ve hücre faaliyetlerinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Virüslerde bulunan lipaz genlerinin kodladıkları lipaz enzimleri virüslerin konaklarının lipit metabolizmasını bozarak, bağışık sistemlerinden kurtulmasını sağlayarak, lipit yolu üzerindeki metabolitleri ilgili replikasyonları için kullanabilmelerini, konağa girmelerini, konaktan çıkarken membran kazanmalarını sağlayarak veya viral DNA'yı geç endozomdan kurtararak parçalanmalarını engellemeleri gibi roller üstlenmiştir

(Baek vd., 1997; Wall vd., 1997; Zadori vd., 2001; Kamil vd., 2005; Grieger vd., 2006). Ayrıca, poksvirüslerin bütün enfeksiyon evresinin sitoplazmada meydana gelmesi bu virüsleri diğer ökaryotik DNA virüslerinden ayıran bir özelliğidir.

Böceklere özel bir grup olan Entomopoksvirüsler (EPV), 1963 yılında ilk kez Vago tarafından keşfedilmiştir (Vago, 1963) ve yaygın olarak bulunan zirai bakımdan oldukça zararlı olan Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera takımlarına ait böceklerden de izole edilmeleri, *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları ve moleküler biyolojileri üzerinde yapılan çalışmalar bu virüslere önem kazandırmaktadır (King vd., 1998). Sivrisinekler, çekirgeler ve ağustos böcekleri gibi en önemli zararlıların mikrobiyal kontrolünün bu takımlardan yeni Entomopoksvirüsler'in izole edilip tanımlanmasına bağlı oldukları belirtilmektedir (King vd., 1998).

Amsacta moorei Entomopoksvirüs (AMEV) Poxvirinae familyasına bağlı olan Entomopoxvirinae altfamilyasına ait, önemli bazı tarım zararlısı böcekleri enfekte edebilen ve hücre kültüründe kolaylıkla büyüeyebilen bir böcek virüsüdür (Googwin vd., 1990; Hall ve Moyer, 1991; Winter vd., 1995). Ayrıca ekonomik öneme sahip böceklerde enfeksiyona neden olmaktadır. EPV'ler pek çok zararlı tür için, özellikle bakülovirüslerin izole edilmediği çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisineklere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülür. EPV'ler bakülovirüslerle karşılaştırıldıklarında, en önemli dezavantajı konaklarını öldürme sürelerinin uzun olmasıdır. Bu sorunun EPV genomuna yabancı genler yerleştirilerek genetik olarak değiştirilmiş EPV'lerin oluşturulmasıyla aşılması mümkündür (Sezen ve Demirbağ, 2005).

Poksvirüslerin çeşitli özellikleri bu virüslere ekspresyon vektörü olarak geniş kullanım alanı sağlamıştır (Moss, 1996). Bu özelliklerinden bazıları, geniş konak spektrumuna sahip olmaları, oldukça yüksek ekspresyon sağlamaları, büyük miktarda DNA alma kapasiteleri, rekombinant virüslerin oluşturulması ve kolay izole edilebilmeleridir (Moss, 2001). Ekspresyon poksvirüs promotorları veya bakteriyofaj RNA polimerazları ve akraba promotorları kullanılarak başarılmaktadır (Moss, 2001). Son zamanlarda entomopoksvirüsler biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmaya da başlanmıştır. Bu tür bir çalışmada, *A. moorei* entomopoksvirüsüne (AMEV) ait sferoidin (*sph*) kodlama bölgesi çıkartılıp yerine kloramfenikol asetil transferaz (*cat*) geni yerleştirilmiş ve rekombinant AMEV-cat transfeksiyonu, AMEV ile enfekte olmuş Ld652 hücrelerinde rekombinant proteinin üretimiyle sonuçlanmıştır (King vd., 1998). Benzer bu tür çalışmalarda, interlökinler, sitokinler, büyüme faktörleri,

interferonlar, enzimler ve yapısal proteinleri kodlayan genler, büyük DNA fragmentlerini yapısına alabilen poksivirüs vektörlerine klonlanıp ekspresyonları yapabilmektedir. Bir diğer çalışmada kanser gen tedavisinde kullanılan interlökin-2 geni (IL-2) vaksinia virüs ekspresyon vektörüne klonlanıp (pMJ601) büyük miktarda ekspresyonu sağlanmıştır (Hengjun vd., 2001).

Lepidoptera larvalarının enfeksiyon süresi hızlıdır ve 1 - 3 hafta arasındadır. Hastalık semptomları konaklar arasında çeşitlilik göstermektedir. AMEV ile enfekte olmuş *Estigmene acrea* larvaları enfeksiyonun geç saatlerine kadar hareket ve denge eksikliği gibi çok küçük belirtiler göstermesi örnek verilebilir. EPV enfeksiyonlu *Elasmopalpus lignosellus* larvalarında ise renkler kahverenginden kırmızıya dönüşmektedir ve hemolenfin sferoidlerle dolmasından dolayı hemolenf beyazımsı-mavi bir renk almaktadır (Mitchel vd., 1983).

Son yıllarda Entomopoksivirüsler Orthoptera grubu böceklerden olan çekirgelerden de izole edilmektedir ve ayrıca bugüne kadar bakülovirüslerin izole edilmediği bu grup böcekler için entomopoksivirüslerin gelecekte potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olacağı düşünülmektedir. Afrika ve Asya'da çok büyük ekonomik zarara sebep olan *Locusta migratoria*'dan izole edilen entomopoksivirüsler çok önemlidir. Virüsle enfekte olmuş böceklerin larval büyümesi ve gelişme oranında önemli seviyede bir gerileme görülmektedir.

Pek çok sivrisinek türünün de EPV enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Henry ve Jutila (1966) tarafından izole edilen *Melanophlus sanguinipes* EPV'nin aynı cinse ait pek çok türü enfekte ettiği gözlemlenmiştir (Oma vd., 1986). Bir çok virüs izolatu *Ips typographus* (kabuk böceği; Wegensteiner vd., 1995), bir çekirge türü olan *M. sanguinipes* (Beaudoin vd., 1994) ve *Adoretus versutus* (kakao zararlısı, McGuire vd., 1991) gibi çeşitli zararlılar için potansiyel biyokontrol ajan olarak önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında, homolog rekombinasyonla rekombinant AMEV oluşturulmuştur ve daha önceki biyoinformatik çalışmalar sonucunda (Bawden vd., 2000) fonksiyonel bir lipaz olabileceği ileri sürülen AMV133 kodlu ORF'nin virüsün çoğalması üzerine etkisi tespit edilmiştir.

1.2. Poksvirüsler

1.2.1. Poksvirüslerin Sistematığı

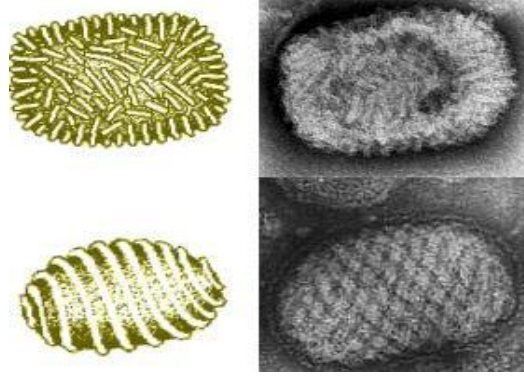
Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi'nin (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) yaptığı sınıflandırmaya göre Poxviridae familyası Chordopoxvirinae (omurgalıları enfekte eden poxvirüsler) ve Entomopoxvirinae (böcekleri enfekte eden poksvirüsler) olmak üzere iki alt familyadan oluşmaktadır (Tablo 1) (URL-1, 2010).

Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik özelliği

Familya	Altfamilya	Cins	Prototip
Poxviridae	Chordopoxvirinae	Orthopoxvirüs	Vaccinia, Variola
		Parapoxvirüs	Orf, Pseudocowpox
		Avipoxvirüs	Fowlpoxvirüs
		Carpipoxvirüs	Sheeppox
		Leporipoxvirüs	Myxoma
		Suipoxvirüs	Swinepox
		Molluscipoxvirüs	<i>Molluscum contagiosum</i>
	Yatapoxvirüs	Yaba maymun tümör	
	Entomopoxvirinae	Entomopoxvirüs A	<i>Melolontha melolontha</i> EPV
		Entomopoxvirüs B	<i>Amsacta moorei</i> EPV
Entomopoxvirüs C		<i>Chrionimus luridus</i> EPV	

1.2.2. Poxviridae Familyasının Genel Özellikleri

Poksvirüsler, oldukça pleomorfik, tuğla biçimli (uzunluğu 220-450 nm, genişliği 140-160 nm, kalınlığı 140-260 nm) veya düzenli spiral filamentlere (çapı 10-20 nm) sahip ve ovoid (uzunluğu 250-300 nm, çapı 160-190 nm) yapıda, genellikle tubüler veya globular üniteler içeren lipoprotein yüzey membranına sahiptir (Murphy vd., 1995; Cann, 2005) (Şekil 1).



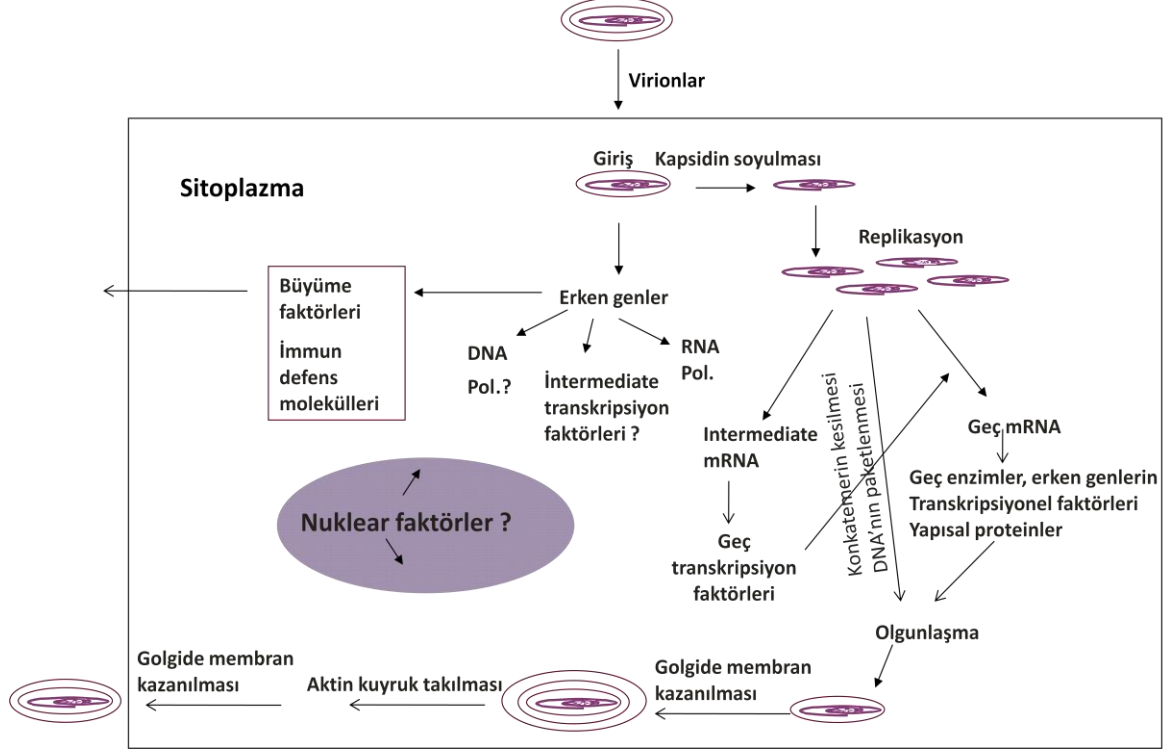
Şekil 1. Poksvirüslere ait genel görünüm. A) Orthopoks virüsler'in tuğla şeklindeki şematik ve elektron mikroskobu görüntüsü, B) Parapoks virüsler'in ovoid şeklindeki şematik ve elektron mikroskobu görüntüsü (Murphy vd., 1995).

Virion parçacığının protein içeriği ağırlığının yaklaşık %90'ını oluşturur. Cinslere göre değişen, virüs genomu tarafından 150-300 protein kodlanmaktadır ve bunların yaklaşık 100 tanesi virionda bulunmaktadır. Virüs parçacığı, RNA transkripsiyonu, DNA replikasyonu, protein-nükleik asitlerin modifikasyonu için gerekli birçok enzime sahiptir (Carter ve Saunders, 2007). Zarflı virionlar, virion parçacığının etrafını saran çift tabakalı lipit arasına yerleşmiştir ve virüs tarafından kodlanan polipeptitlere sahiptir. Virion parçacığının ağırlığının yaklaşık %4'ü lipitlerden, %3'ü ise karbonhidratlardan oluşmaktadır (Murphy vd., 1995). Poks virüs genomları, tek parçalı, çift zincirli DNA içermektedir ve virionun genomu ağırlığının yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır.

Konak hücrelere giriş, virion hücreye tutunduktan sonra plazma membranı ve viral yüzey membranı arasındaki kaynaşma sayesinde gerçekleşmektedir. Virüs zarfının varlığında, membranlar arasındaki kaynaşma, viral özün hücre sitoplazmasına salınması ve daha ileri derecede virüs zarfının soyunmasından sonra meydana gelmektedir. Plazma ve vakuolar membran arasındaki kaynaşma durumunda görülen endositoz da mümkün olmaktadır (Moss, 1991; Murphy vd., 1995).

Poliadenillenmiş mRNA transkriptleri, genomun %15'ini oluşturmaktadır ve virüs özündeki çoklu alt ünitelere sahip RNA polimeraz enzimleri sayesinde, her iki DNA zincirinden de sentezlenmektedir. Transkriptler, konak ribozomları tarafından translasyona uğratılmak üzere virüs özünden çıkarılır. Erken virüs moleküllerinin sentezi esnasında, konak makro moleküllerinin sentezi durdurulur. Virüsler, konak hücre sitoplazmasında

çoğalmaktadır (Şekil 2) ve bunun sonucunda viroplazma veya virüs faktörleri olarak adlandırılan bazofilik (B-tipi) inklüzyonlar oluşmaktadır.



Şekil 2. Vaksinia virüs replikasyonunun şematik görünümü

Genomda, çeşitli promotorların yönettiği Açık Okuma Zincirleri (ORF) bulunmaktadır. Bu promotorlar, zamana bağlı olarak, genomun soyunması öncesinde veya esnasında ifade edilen *erken genler*, DNA replikasyonu sırasında ifade edilen ve geç genlerin transkripsiyonunu ayarlayan *ara genler* ve replikasyon sonrasında ifade edilen ve birçok virion proteinini kodlayan *geç genler* olmak üzere üç sınıf genin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Moss, 1991; Broyles, 2003) (Şekil 2).

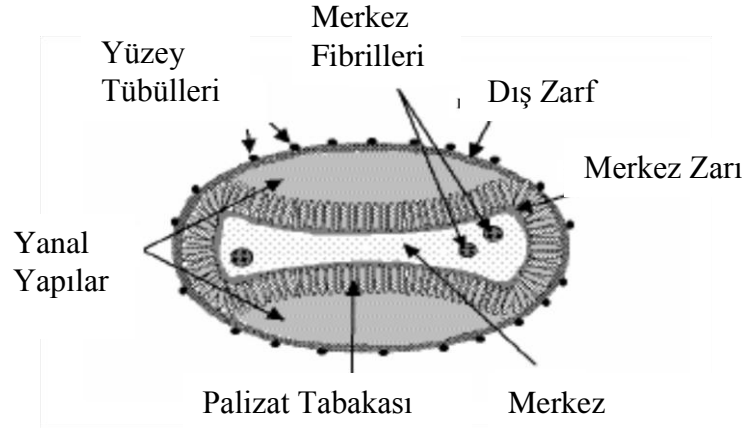
Erken protein sentezi, genellikle geç gen ifadesi esnasında azalmaktadır. Ancak bazı genler, ilk önce erken promotordan ifade edilmeye başlar ve daha sonra geç promotordan ifade edilmeye devam etmektedir (Murphy vd., 1995).

1.3. Entomopoksvirüsler ve Genel Özellikleri

Coğrafik olarak geniş bir alana yayılmış olan ve onlarca böcek türünden izole edilen Entomopoksvirüsler ilk kez Vago (1963) tarafından “yeni bir böcek virüsü” olarak açıklanmıştır. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV), Tablo 1’de gösterildiği gibi poksvirüsleri Chordopoxvirinae ve Entomopoxvirinae olmak üzere iki alt familyaya ayırmıştır (Moss, 2001). Entomopoxvirinae virüs morfolojisi, konak türü ve genom hacmi bakımından 4 cinsten oluşmaktadır ve her bir cins, bir tip türle temsil edilmektedir. Alphaentomopoxvirüsler Coleoptera grubu (*Melolontha melolontha* EPV), Betaentomopoxvirüsler Lepidoptera grubu (*Amsacta moorei* EPV) ve Orthoptera grubu (*Melanoplus sanguinipes* EPV), Gammaentomopoxvirüsler Diptera grubu (*Chironomus luridis* EPV) böcekleri enfekte eden virüsleri kapsamaktadır (Arif ve Kurstak, 1991; Goodwin vd., 1991; Moyer, 1999).

Böcekleri enfekte eden virüsler arasında yapısal farklılıklar bulunmaktadır. Fakat, EPV’ler, orthopoksvirüslere benzer yapısal özelliklere sahiptir ve omurgalı poksvirüs gen homolojileri gösterdikleri bulunmuştur (Bawden vd., 2000). Bu gen homolojileri iki grup arasında gen regülasyonunda benzerlik sağlamaktadır. *Amsacta moorei* EPV (AMEV) hücre kültüründe replike olabilen sadece birkaç EPV’den biri olduğundan dolayı, bu virüslerin çoğunluğunu moleküler seviyede anlayabilmek açısından AMEV üzerinde yapılan çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır (Langridge, 1983; Goodwin vd., 1990).

Entomopoksvirüs virionları oval şekle sahiptir, 150-470 nm uzunluğunda ve 165-300 nm genişliğindedir, morfolojik olarak omurgalı poksvirüslerine benzerlik göstermektedir (Arif, 1995), ayrıca DNA genomu virionun merkezinde bulunmaktadır. A cinsi virüsler tek yan yapılı konkav bir merkez şeklinde, B cinsi virüsler iki yan yapı ile çevrili silindirik bir merkez şeklinde ve C cinsi virüsler bikonkav bir merkez şeklindedir. (Şekil 3).



Şekil 3. Entomopoxvirüs şematik görünümü

Entomopoksvirüsler genellikle konak böceğin yağ dokusu hücrelerinde, bazen de hemositlerde çoğalmaktadır (Lipa, 1975). Entomopoksvirüslerin oluşturduğu sferoid yapıları ışık mikroskopunda kolayca ayırt edebilmek için Giemsa ve Buffalo Black B gibi basit boyama yöntemleri kullanılmaktadır.

1.3.1. Sferoidler

Enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında büyük oval şekilli sferoidlerin oluşumu EPV'lerin en önemli karakteristik yapısıdır. Bu yapılar 5-20 μm boyunda ve orijinal olarak "sferule" olarak adlandırılmaktadır ve sferoidler parakristal bir ağ içine gömülü virüsleri içeren elektronca yoğun yapılardır. Tablo 2'de bazı Coleopteran EPV'lerin morfolojik özellikleri gösterilmiştir (Arif vd., 1991).

Tablo 2. Bazı Coleopteran entomopoksvirüslerin morfolojik özellikleri

Konak	Virüs ölçüleri (nm)	Inklüzyon yapı (μm)	Virüs şekli	Merkez şekli	Spindil
<i>Anomala cuprea</i>	440x250	5x8	"	"	var
<i>Aphodius tasmaniae</i>	380-430x250-300	5-12	"	"	"
<i>Demodema boranensis</i>	420x230	8-11	"	"	"
<i>Dermolepida albohirtum</i>	420-450x220-240	3-5	"	"	yok
<i>Figulus sublaevis</i>	330x90	1-5	"	"	var
	366-416x255-286	3,5-11	"	"	"

Tablo 2'nin devamı

<i>Geotrupes sylvaticus</i>					
<i>Melolontha melolontha1</i>	450x250	10-24	Oval	TYYK*	“
<i>Melolontha melolontha2</i>	450x250	5,7x11,4	“	“	“
<i>Othnonius batesi</i>	470x265	5-10	“	“	“
<i>Phyllopertha horticola</i>	400x240	6-25	“	“	“

*TYYK: Tek yan yapılı konkav

1.3.2. Spindıllar

Cins A virüsler ve bazı Lepidoptera grubu üyelerin EPV'leri ile enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında ikinci bir protein yapı olarak bulunan spindıllar 1-15 µm boyunda, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında veya sferoid içinde virüs partikülleriyle beraber görülmektedir. Şu ana kadar bu yapılar hiçbir Orthoptera veya Diptera konaklarında gözlemlenmemiştir. İlk kez Bergoin vd., (Bergoin vd., 1970) tarafından çalışılan ve fusolin proteini tarafından oluşturulan bu yapılar sferoidlerden çok farklıdır. Spindıllar bilateral simetriye sahip oldukları için sferoidlerden kolayca ayrılırlar. Spindılların virion taşımamaları sferoidlerden ayrılan diğer önemli özelliğidir.

1.3.3. Yapısal Polipeptitler

EPV virionlarının protein yapısı SDS-PAGE ile belirlenmiştir ve yaklaşık 40 yapısal proteine sahip olan bir virionun 12-250 kDa arasında değişen ağırlığa sahip olduğu gözlemlenmiştir (Bilimoria vd., 1980; Langridge vd., 1982; Mitchel vd., 1983; Levin vd., 1993).

1.4. Entomopoksvirüslerde Genom Özellikleri

Entomopoksvirüsler çift zincirli, büyük, doğrusal ve yaklaşık 225 kb'lık bir genoma sahiptir (Hall vd., 1990; Arif, 1995). Virüs genomu, iki membran veya bir ya da iki yan yapı ile çevrili nükleotid yapı içinde bulunmaktadır ve bu yapılar dış virion zarı ile

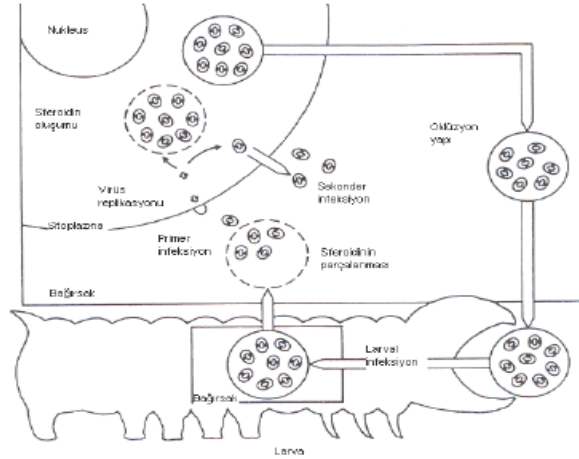
çevrilidir. Halen daha genom organizasyonu bakımından çok az şey bilinen EPV genlerinin birkaçı tanımlanmış sıraları belirlenmiştir (King vd., 1998). Sadece *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arctiidae) ve *Melanolpus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae)'den izole edilen AMEV ve MsEPV'nin genomları tamamen aydınlatılmıştır (Afonso vd., 1999; Bawden vd., 2000). DNA hibridizasyon çalışmaları neticesinde, 3 Orthoptera EPV genomunun yüksek oranda baz sırası homolojisi gözlemlenirken MsEPV DNA'sı ile vaccinia virüs, Coleoptera ya da Lepidoptera orjinli EPV DNA'ları arasında ya çok düşük ya da hiç homoloji bulunmadığı gözlemlenmiştir (Landridge vd., 1983).

Araştırmalarda AMEV protein sentez modeli karakterize edilmiştir ve viral proteinler iki grupta toplanmıştır. Enfeksiyondan 3 saat sonra *erken proteinler*, 12 saat sonra ise *geç proteinler* belirlenmiştir. Sferoidin sentezinin en erken 15. saatte başladığı ve 72. saate kadar devam ettiği gözlemlenmiştir (Winter vd., 1995). İsatın- β -thiosemikarbazon (IBT), 1- β -D-arabinofuranozilsitozin (Ara-C) ve fosfonoasetik asit (PAA) Orthopoxvirüs inhibitörlerinin tümünün vaccinia virüs ile enfekte olmuş hücrelerde geç gen ekspresyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir ve bu inhibitörler poksvirüs replikasyon döngüsünün erken (DNA sentezinden önce) ve geç (DNA sentezinden sonra veya aynı anda) fazlarını belirlemek için kullanılmaktadır (Winter vd., 1995).

1.5. Entomopoksvirüslerde Replikasyon

Entomopoksvirüs replikasyonu hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda çalışılmıştır. Virüs ile enfekte edilen hücrelerin sahip olduğu en önemli özelliği sferoid yapıları meydana getiren bir protein yapı içerisinde olgun virionların gömülü olmasıdır.

EPV'lerin böcek larvasındaki replikasyonu Şekil 4'te şematik olarak gösterilmektedir (King vd., 1998).



Şekil 4. Entomopoksvirüslerin replikasyonunun şematik görüntüsü

Larval enfeksiyon, inklüzyon yapıların alkali ortama sahip bağırsakta çözülmesi ile başlamaktadır (Hengjun vd., 2001). Serbest kalan virionlar, mikrovillusların membranı ile virion dış membranı arasında gerçekleşen füzyon yolu ile bağırsak epitelyum hücrelerine geçerek primer enfeksiyonu meydana getirmektedir. Hücre sitoplazmasındaki virüs replikasyonundan sonra virionların bir kısmı, sferoid içine gömülmeden membrandan tekrar dışarı çıkarak diğer dokularda enfeksiyon oluşturmaktadır. Diğer virionlar da sitoplazmada sferoidin proteininden meydana gelen sferoid içerisine gömülmektedir. Replikasyon en çok yağ dokusu içinde gerçekleşmesinin yanında pek çok dokuda da gerçekleşir (King vd., 1998). Entomopoxvirüs DNA'sının replikasyonu erkenci virüs proteinlerine ihtiyaç duymaktadır. EPV replikasyonu ile ilgili ilk bilgiler enfekte olmuş konaklardan alınan dokulardan elde edilmiştir.

Replikasyonu takiben inklüzyon yapıların oluşumu 8-10 gün almaktadır. Gömülü virion sayısı aynı konağın farklı hücrelerinde farklılık gösterir. Elektronca yoğun bölgeler viroplazm olarak bilinir ve DNA replikasyon yeri olarak aydınlatılmıştır (Granados vd., 1970).

Coleoptera grubu böceklerin EPV enfeksiyonunda spindil adı verilen ikincil inklüzyon yapılar da oluşmaktadır. Spindiller ya bağımsız yapı olarak bulunurlar ya da olgun virionlarla birlikte sferoidlere gömülürler (Gauthier vd., 1995). Viral replikasyonun ilk kısmı yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasında gerçekleşirken, inklüzyon yapılar ve hücre dışı virionlar aynı zamanda kas ve genital doku hücrelerinde, sinir hücrelerinde, epidermis ve hemositlerde gözlemlenebilir (Robert vd., 1968; Henry vd., 1969). Enfekte

olmuş larvalardaki inklüzyon yapılar, sferoidin matrikse gömülü halde viral parçacıkları bulundurur (Arif ve Kurtsak, 1991). Tomurcuklanan virüslerin çevreye dağılması, böceğin kusması, dışkılaması ve ölü larvanın etrafa dağılmasıyla meydana gelmektedir (Goodwin vd., 1991).

Granados ve Naughton tarafından tespit edilen *Estigmene acrea* (BTI-EAA) hücre suşu (Granados vd., 1975) ve Goodwin vd., tarafından tespit edilen *Lymantria dispar* (IPLB-Ld652) hücre suşunun (Goodwin vd., 1990) AMEV için iki üretken suş olduğu tespit edilmiştir. *E. acrea* hücreleri AMEV ile enfekte edildiğinde olgun sferoidler gözlemlenmektedir. AMEV'nin *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinde de replike olduğu gösterilmiştir (Aloui vd., 1996). Hücre kültüründe görünen replikatif olaylar *in vivo*'da görünenlerle benzerlik göstermektedir. *E. acrea* hücrelerinde yapılan çalışmalarda, hücrelerin yuvarlaklaşması 12-24 saat sonra, sitoplazmanın tanecikli bir hal alması 48 saat sonra ve sferoid oluşumu ise 72 saat sonra meydana geldiği gözlemlenmiştir (Marlow vd., 1993).

1.6. *Amsacta moorei* Entomopoxvirüs (AMEV)

AMEV doğal olarak *Amsacta moorei*'den izole edilen, hücre kültüründe rahatça üretilen ve çalışılabilen (Becker vd., 2008), cins B'ye ait entomopoksvirüslerdendir. *Estigmene acrea* (Hall ve Hink, 1990) ve *Lymantria dispar* (Arif ve Moyer, Basılmamış sonuçlar) gibi tarımsal bakımdan zararlı böcekleri de enfekte ettikleri raporlanmıştır.

Biyokontrol materyallerine ilginin artması ve bakülovirüslerin izole edilmediği (Sezen ve Demirbağ, 2005), zirai açıdan oldukça zararlı türlerden izole edilmeleri EPV'lerin replikasyonlarını daha iyi anlama ve potansiyel biyolojik kontrol materyali olarak geliştirme çabalarını artırmaktadır (King vd., 1998). Virüsün biyolojik kontrol amaçlı kullanılabilmesi, gen ekspresyon ve gen terapi vektörü olarak kullanılabilmesi için virüse ait morfolojik, biyolojik ve moleküler özelliklerinin bilinmesi gerekir. Bu amaçla AMEV'nin tüm genom analizi yapılmıştır (Bawden vd., 2000). Genomun 232,392 bazdan oluştuğu ve biyoinformatik analizlere göre muhtemel 292 ORF (açık okuma zinciri) bulunduğu ifade edilmiştir. Muhtemel genlerin fonksiyonel analizleri bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilmektedir (Peterson vd., 1997; Becker vd., 2004; Li vd., 2005; Means vd., 2006; Mitsuhashi vd., 2007; Becker vd., 2008). Go ve Yu (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, biyoinformatik analizlerle AMEV ORF'lerinin 38 tanesinin protein

kodlamadığı belirlenmiş ve protein kodlayan ORF sayısı 254 olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda A + T içeriği %82.2 olarak hesaplanmış ve AMEV poksvirüsler içerisinde A + T oranının en yüksek olduğu virüs olarak ifade edilmiştir (Bawden vd., 2000).

AMEV gen ifadesini sağlayan promotor elemanlarına sahiptir. AMEV genlerinin 133 tanesinin erken veya potansiyel olarak erken gen olabileceği düşünülmekte ve 158 tanesinin ise geç veya potansiyel geç gen motifine sahip olduğu bilinmektedir. Promotor veya düzenleyici elemanlar genomu oluşturan 179 genden sadece 15'inde tanımlanmamıştır. Erken (E) veya potansiyel erken genler (E?), translasyonel başlangıç kodunun 100 baz çifti yukarısındaki TGAATXXXXA veya TGAAAXXXXXA sıralarını içeren genler olarak tanımlanmaktadır (Bawden vd., 2000). Geç gen (L) olarak ise translasyonel başlangıç dizisindeki TAAATG sırasını taşıyan AMEV ORF'leri düşünülmektedir (Weir ve Moss, 1984; Rosel ve Moss, 1985; Bertholet vd., 1986; Davison ve Moss, 1989a). Potansiyel geç genler ise, başlangıç kodununun 100 bp yukarısında TAAAT veya TAAAAT sırasına sahip olan genler olarak düşünülmektedir (Roseman ve Hruby, 1987).

1.7. AMV133

AMV133 ORF'sinin lipit hidroliziyle virülans bir gen olarak fonksiyon görmesi muhtemel bir triaçilgliserol lipaz enzimini kodlayabileceğini göstermektedir (Bawden vd., 2000). AMEV konaklarında lipitlerin depolandığı (Bawden vd., 2000) yağ hücreleri de dahil olmak üzere (Arif ve Kurtsak, 1991) birçok bölgede enfeksiyon oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Poksvirüsler, konak savunma mekanizmasına karşı serpinler ve sitokin reseptörleri gibi bir grup immunomodülatör proteinleri kodlamaktadır (Turner ve Moyer, 2002), ayrıca membran yapısını değiştiren özel viral bileşenlere sahiptir (Baek vd., 1997). Bu anlamda, AMV133 viral lipazlar bölümünde anlatılan fonksiyonlardan birini veya birkaçını da üstlenerek viral enfektivite için önemli bir gen olabileceği düşünülmektedir. Poksvirüslerin virüs replikasyonu veya enfektif projeni virüslerin üretilmesine etki etmeyen çok sayıda geni mevcuttur (Wall vd., 1997) ve vaccinia virüste en az 55 gen doku kültüründe enfeksiyonu etkilemeksizin delesyona uğraması buna örnek verilebilir. Bu genlerin doğal konaklarını enfekte ettikleri sürecin ilk başında fonksiyon gördükleri düşünülmektedir.

Lineer viral genomun merkezinde hayati genler, terminal kısımlarında ise hayati olmayan genler yer almaktadır ve bu hayati olmayan genlerin önemli bir kısmının kodladıkları proteinler konağın spesifik anti-viral sürecini blokladıkları açıktır (Wall vd., 1997). Bu proteinler epidermal büyüme faktörlerinin etkilerini taklit eder (Twardzik vd., 1985) veya tümör nekrosis faktör, interlökin 1 β , interferon- α/β , interferon- γ gibi immun sistemde anahtar rol oynayan sitokinlere bağlanıp inaktive ederler (Springs, 1994). Bu tip proteinlerin karakterizasyonu virüs ve konağı arasındaki karmaşık etkileşimleri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır, ayrıca virüs enfeksiyonlarının atlatılabilmesi için hayati olan bağışık fonksiyonların tanımlanmasına yardım etmektedir (Wall vd., 1997). Biyokontrol amaçlı kullanılacak bir virüs hazırlanırken de bu bağışık sistemi başarılı bir şekilde aşabilecek virüsler oluşturmak için önemli bilgiler vermektedir.

1.8. Viral Lipazlar

Lipaz enzimleri trigliseritlerin rutin metabolizmasından hücre sinyalleri ve bağışık aktivitenin aracılığına kadar biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir (Kamil vd., 2005). *Bombyx mori* (ipek böceği)'nin sindirim sıvısından izole edilen lipazın nukleopolihedrovirüse karşı antiviral etki gösterdiği (Ponnuvel vd., 2003), yılan zehirinden (Villarrubia vd., 2004) ve anne sütünden (Naarding vd., 2006) izole edilen lipazın anti-HIV etkisi gösterdiği bulunmuştur. Buradan da çıkarılabileceği gibi organizmalar lipazı kendi ihtiyacı doğrultusunda çeşitli amaçlar için kullanmaktadır. Virüslerin sahip olduğu lipaz genleri için hücrenin lipaz regülasyonunu değiştirmek şartıyla hücrenin bağışık cevabını baskılamak (Girod vd., 2002), virüsün hücreye girişini gerçekleştirmek (Baek vd., 1997), virüs partikülünün hücre içinde sindirilmeden kurtulmasını sağlamak (Grieger vd., 2006) gibi çeşitli görevleri olduğu ifade edilmiştir.

Literatürde virüslerde bulunan lipaz genleri ile yapılan çalışmalarda bu genlerin bazı virüslerin enfektivitesinde oldukça önemli role sahip olduğu (Baek vd., 1997; Wall vd., 1997; Zadori vd., 2001; Grieger vd., 2006), bazılarında ise hücre kültüründe olmasa bile konaktaki enfeksiyonunda önemli rol oynadığı ifade edilmiştir (Kamil vd., 2005). Vaccinia virüslerde lipaz fonksiyonu gösteren yapısal bir protein olan p37 enfeksiyonun meydana gelmesinde oldukça önem taşımaktadır. Bu genin delesyonu yapıldığında virüsün enfeksiyonu gerçekleştiremediği gözlemlenmiştir (Baek vd., 1997). p37 virüsün membran füzyonunu ve/veya membran kazanmasını sağlamaktadır (Baek vd., 1997). p37'nin

delesyonu sağlandığında vaccinia virüs dış zar oluşumunu tamamlayamamış ve hücre dışı virüs üretilmemiştir (Blasco ve Moss, 1991), ayrıca yaban tip virüsün hücreden hücreye geçme yeteneği p37'nin delesyonu ile kaybedilmektedir (Blasco ve Moss, 1991). Vaccinia virüs ile enfekte olmuş hücrelerin plazma membranları düşük pH'da birbirleriyle füzyona uğramakta, ancak p37 delesyonuna uğratıldığında bu özellik kaybedilmektedir. p37 transgolggi membranının sitozolik yüzeyi ile birleşmekte, virionun çift membran kazanmasını sağlamaktadır (Baek vd., 1997) ve bu veriler p37'nin membran füzyon sürecinde rol oynadığını göstermektedir (Baek vd., 1997).

Poxvirinae familyasından ektomelia virüsün kodladığı lipaz enzimi virüsün enfektivitesi ve konaklar arası transmisyonunda enfeksiyon boyunca virüse bazı seçici avantajlar sağlamaktadır. Hücrenin bağışık cevabının oluşmasında görevli aracı molekülleri bloke etmesi bu avantajlara örnek olarak verilebilir (Wall vd., 1997). Lipoksigenaz yolu lipaz enzimlerinin rol oynadığı bir yoldur ve konak için inflamasyon aracıdır. Bu virüsler lipoksigenaz metabolit spektrumunu değiştirecek genler içermektedir ve bu genlerden biri de lipaz genidir. Orthopoxvirüslerde lipoksigenaz yolunun virüs replikasyonu için gerekli olduğu ifade edilmiştir (Palumbo ve Buller, 1991) ve bu yol ürünleri virüs replikasyonu için kullanılmaktadır (Palumbo vd., 1993). Orthopoxvirüslerin dışındaki poksivirüslerde enfeksiyon sırasında membran yapısı değişmektedir ve spesifik viral bileşenler bu değişimden sorumludurlar. Vaccinia'da lipaz aktivitesi gösteren p37'nin bu görevi de yaptığı ifade edilmektedir (Baek vd., 1997). Parvovirüslerde ve Adeno-bağımlı virüslerde lipaz aktivitesi gösteren VP1 kapsid proteini viral genomu geç endozom/lizozomdan kurtararak, nukleusa taşınmasını sağlamakta ve bu genin delesyonu ile viral enfektivite son derece düşmektedir (Zadori vd., 2001; Girod vd., 2002; Grieger vd., 2006). Virüslerin lipaz enzimlerine olan ilgisine bir başka örnek de insan sitomegalovirüs verilebilir. Virüs genomunda lipaz enzimi kodlayan bir gen taşımamaktadır, ancak virionda lipaz enzimi bulunmaktadır. Virüs olgunlaşırken konak enzimlerinden seçici olarak sadece fosfolipaz 2 enzimini viriona almaktadır (Allal vd., 2004). Omurgasızları enfekte eden AMEV ve MsEPV entomopoksivirüslerinin tüm genom analizi yapılmış ve birbirine oldukça benzer amino asit sırasına sahip muhtemel lipaz geni taşıdıkları biyoinformatik analiz ile belirlenmiştir (Afonso vd., 1999; Bawden vd., 2000). Diğer virüslerde olduğu gibi AMEV'ye ait *lipaz* geninin de yapısal bir gen olma ve virüs enfektivitesinde rol oynama ihtimali vardır. Ayrıca, bu genin virüs enfektivitesinde rol oynayabileceği de düşünülmektedir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Poxviridae familyasına ait Entomopoxvirinae altfamilyasından Entomopoxvirüs B cinsi üyesi olan *Amsacta moorei* entomopoxvirüs (AMEV)'ün genom haritasının 2000 yılında Bawden vd. tarafından belirlenmesi sonucunda virüsün moleküler biyolojisinin anlaşılması için gereken bilgiler elde edildi.

Bu bilgiler ışığında; bu tez çalışmasında, virüs replikasyonunda ve enfektivitesinde önemli rolü olabileceği düşünülen AMEV'ye ait lipaz geninin homolog rekombinasyon ile virüste delesyona uğratılması ve rekombinant virüs oluşturulması hedeflenmiştir. Ayrıca, AMV133 kodlu ORF'nin virüsün çoğalması üzerine etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini

Lymantria dispar böceğinden geliştirilen Ld652 hücreleri ve yaban tip *Amsacta moorei* entomopoksvirus (AMEV) (Roberts ve Granados, 1968) Prof. Dr. Basil M. Arif (Great Lakes Forestry Centre, Sault Ste Marie, ON P6A 2E5, Canada)'ten temin edildi.

2.2. Virüslerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Tayini

Ld hücreleri 28 °C'ye ayarlanmış etüvde, %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma, Kat No: F-0643) içeren besiyeride (%45 Grace's Insect Medium, GIBCO, Kat No: 11605-045; %45 Excell (TM) 420, Biosciences, Kat No: 14420C) özel hücre kültürü kapları (Corning) içerisinde büyütüldü ve haftada iki kez hücrelerin pasajlanması işlemi gerçekleştirildi ve AMEV, Ld hücrelerinde çoğaltıldı.

Virüs çoğaltma işlemi için, konak olarak Ld652 hücre kültürü kullanıldı. Daha önce, AMEV'nin bu böcek hücre kültüründe çoğaldığı gösterilmiştir (Goodwin vd., 1990). Hücreler AMEV ile büyük ölçekli hücre kültürü kaplarında (75 cm²'lik flasklar) enfekte edildi. Enfekte edilmiş hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. Elde edilen her bir virüse ait süspansiyondaki virüsün konsantrasyonu, 60 gözlü hücre kültürü kapları (Terasaki kapları; Corning) kullanılarak EPDA (End Point Dilution Assay) metoduna göre belirlendi (Darling vd., 1998).

Deneye başlarken, 10 adet mikrosantrifüj tüpü, 1'den 10'a kadar numaralandırıldı. Virüs, 9. tüpe kadar büyüme besiyerisi içerisinde 1/10 oranında seyreltildi. 10. tüp, kontrol olarak kullanıldı ve buna sadece besiyeri bırakıldı. Bu arada 1,5-2x10⁶ hücre/ml olarak süspansiyon haline getirilen Ld652 hücrelerinden, 10 tüpün her birine 90 µl eklendi ve karıştırıldı. Yeni pipet ucu kullanarak, Terasaki kabının her satırına (A'dan F'ye doğru) aynı konsantrasyonda olacak şekilde, 10 µl hücre-virüs karışımından eklendi. Virüssüz kuyudan (10. tüp) başlayarak, en yoğun virüs süspansiyonun olduğu kuyuya (1. tüp) doğru bir sıra takip edildi. Terasaki kabının kapağı kapatılarak, ıslatılmış peçetelerle birlikte bir

kutuya yerleştirildi ve 28°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyon belirtileri netleşinceye kadar inkübe edildi.

EPDA deneyinin sonuçları, her bir gözdeki enfekte olmuş tek bir hücrenin dahi olup olmamasına göre her kuyuya + (artı) veya – (eksi) değer verilerek kayıt edildi. Virüs konsantrasyonu, aşağıdaki EPDA formülü ve elde edilen değerler kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Titer (pfu/ml)} = 10^{(a+x)} \times 100/\text{ml}$$

n = enfeksiyon değerinin %50 veya %50'den büyük olduğu en yüksek seyreltme,

a = log n,

b = n. seyreltiğin % değeri,

c = n. değer altındaki % değeri,

x = (b-%50) / (b-c).

2.3. AMEV DNA İzolasyonu

T75 flasklarındaki Ld652 hücrelerine AMEV enfeksiyonu yapıldı. Enfeksiyon için 4 gün beklendi. T75 flasklara 15 ml besiyeri konuldu. Hücreler 1000 g'de 15 dakika çöktürüldü. Sıvı kısım atıldıktan sonra pellet 9 ml TE ile çözüldü. 30 µl β-merkaptoetanol, 100 µl proteinaz K, 0.4 ml 5M NaCl ve 1 ml % 10 SDS eklendi. 37°C'de 5 saat inkübe edildi. Gece boyu +4°C'de saklandı. 15 ml (1:1) oranında fenol kloroform eklendi. 300g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni ependorfa aktarıldı ve fenol kloroform uzaklaştırılmış oldu. Bu işlem iki kere tekrar edildi. Bundan sonraki işleme buz üzerinde devam edildi. 3M NaOAc pH 7.0'dan süpernatantın 1/10'u kadar eklendi. Son hacmin 2.5 katı %100 EtOH eklenip karıştırıldı. DNA'nın çökmesi için -20°C'de 1 saat bekletildi. 16000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. 5 dakika pellet kurutuldu. 200 µl dH₂O 'da çözüldü. +4°C'de 1 gece beklettikten sonra homojenize için karıştırıldı.

2.4. Rekombinant Vektörlerin Hazırlanması

2.4.1. Geçici Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

2.4.1.1. Promotorunu Taşıyan AMV133 Geninin PCR ile Çoğaltılması

Promotor taşıyan AMV133 geni, dizayn edilen primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Tablo 3).

Tablo 3. AMV133- PCR deneyinde kullanılan primerler

Primer Adı	Sıralar
AMV133 Rw	5'-GGAAAATATTTAGAAATTTAA-3'
AMV133 Fw	5'-GGGGATCCGTAATTATTTGTT-3'

PCR reaksiyonu için (fusion);

DNA	: 1.5 µL		
Fw	: 1.5 µl	10 X Buffer	: 5 µl
Rw	: 1.5 µl	dNTP	: 1.5 µl
dH ₂ O	: 37,5 µl	<i>Taq</i> DNA Polimeraz	: 0.5 µl

PCR reaksiyonu 94°C'de 2 dakika'lık ilk denatürasyonun ardından, 30 döngü halinde 94°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 7 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde elektroforez edildi

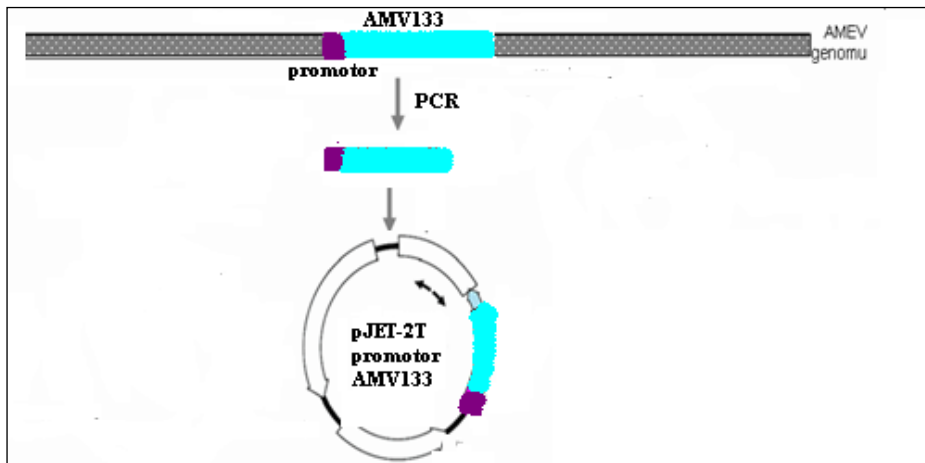
2.4.1.2. Elektrokompotent DH5α *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Petriye ekilmiş DH5α *E. coli* hücrelerinden tek bir koloni alınıp, NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37°C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden, 1:100 oranında LB Broth besiyerine aşılama yapıldı. Hücreler 37°C'de, yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 OD olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4°C'de, 4.000 rpm hızında, 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez steril 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 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompetent hücreler, mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50µl'lik hacimlerde) ve -80°C'de saklandı.

2.4.1.3. AMV133 Geninin Agaroz Jelden Temizlenmesi ve pJET-2T Vektörüne Klonlanması

Elektroforez edilen PCR ürünlerinin oluşturdukları bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüplerine alındı ve ürünün jelden temizlenmesi "Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma kiti (Macherey-Nagel)" ve kitin içindeki kullanma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 10 mg jel parçası için 30 µl bağlanma tamponu (NT1) ilave edildi. Karışım 50°C'de 15 dakikadan az olmayacak şekilde jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. Bu süre sonunda erimiş solüsyon toplama tüplerinde bulunan kolonlara aktarıldı, 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Kolonlara 600 µl yıkama tamponu (NT3) ilave edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Kolonlara 200 µl NT3 ilave edildi ve 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne biriken sıvı atıldı. Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 25 µl "Elution tamponu" (NE) eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Kolonlar atıldı. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.



Şekil 5. Geçici ekspresyon vektörünün oluşturulması

Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pJET-2T vektörüne klonlandı. Reaksiyon;

1 µl pJET-2T vektörü

1,5 µl 10× ligasyon tamponu

1 µl T4 DNA ligaz

11,5 µl DNA fragmenti biraraya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi.

Karışım 22°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı ve elektrotransformasyon yapıldı.

2.4.1.4. Elektrotransformasyon

Lipaz geninin translyasyona uğramayan DNA sıralarının klonlandığı plazmidleri hücreye aktarmak için, elektrokompotent DH5α hücreleri kullanıldı. Kompetent *E. coli* hücrelerinin bulunduğu tüpler, -80°C'den buz üzerine alındı ve bu hücrelerin üzerlerine, 1-3 µl ligasyon karışımından konuldu ve karıştırıldı. Karışım elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve kuvvetler elektroporator cihazına (BioRad) 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. İnkübasyon sonucunda hücreler 6.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hücreler, 200 µl LB Broth besiyerisinde süspansiyon edildi ve petri kaplarında bulunan, 1/1000 oranında ampisilin antibiyotiği içeren LB Agar besiyerisi üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerden gece kültürleri hazırlandı. Hatalı olabilecek kolonileri de göz önünde bulundurarak her bir klonlama için yaklaşık 10 koloni seçildi.

2.4.1.5. AMV133 Genini Taşıyan Klonların Elde Edilmesi

Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000×rpm'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 N NaOH, % 0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH5.2) ilave edildi ve 10 dakika buz üzerinde bekletilerek 5 dakikada bir alt üst

edilerek karıştırıldı. 14.000×rpm’de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %96’lık etanol ilave edilerek 14.000×rpm’de 3 dakika santrifüj yapıp süpernatant döküldü. Çökeltiye % 70’lik 500 µl etanol ilave edilerek 14.000×rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant döküldü. Pellet 37°C’de 10 dakika kapakları açık bir şekilde kurutuldu. Kuruyan çökelti 50 µl ddH₂O’da çözüldü.

2.4.1.6. AMV133 Genini İhtiva Eden Klonların Restriksiyon Analizleri

İzole edilen plazmit DNA’ların hedef DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA’ları Bgl 11 restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 8 µl DNA, 0,5 µl Bgl 11, 2,5 µl enzime ait 10X tamponu ve 14 µl dH₂O olacak şekilde 25 µl’lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Ardından % 1’lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

2.4.1.7. AMV133 Genini İhtiva Eden Klonların Dizi Analizi

AMV133 için doğru olduğu gözlenen klonlar tespit edildi. Bu klonlardan kit (Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega) kullanılarak saf plazmit DNA’ları izole edildi. Bunun için 5 ml kültür 14.000×rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 µl resüspansiyon tamponunda vortekslenerek çözüldü, üzerine 250 µl parçalama tamponu (cell lysis) ilave edilip alt üst edildikten sonra 10 µl alkalın proteaz ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip üzerine 350 µl nötralizasyon solusyonu ilave edildi. 10 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kitle bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar 750 µl yıkama tamponu ile 1 dakika 14000x rpm’de santrifüj edilerek yıkandı. 250 µl yıkama tamponu ile 2 dakika 14000x rpm’de santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA’nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 50 µl ddH₂O ilave edildi 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 14.000×rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplandı. Böylece, virüsün çoğalması için önemli olduğu düşünülen lipaz, homolog

rekombinasyonla virüsten silindiğinde replikasyonun gerçekleşmesini sağlamak amacıyla oluşturulan rekombinant geçici ekspresyon vektörü transfeksiyonda kullanılmak için stoklandı. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 100-200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek Macrogen Firmasına (Kore) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi.

2.4.2. Homolog Rekombinasyonda Kullanılacak Vektörün Hazırlanması

2.4.2.1. US-DS Askı Bölgelerini İhtiva Eden Rekombinant pBluescript SK(-) Klonların Elde Edilmesi

US-DS askı bölgelerini ihtiva eden klonlardan kit (Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega) kullanılarak saf plazmit DNA'ları izole edildi. Bunun için 5 ml kültür 14.000×rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 µl süspansiyon tamponunda çözüldü, üzerine 250 µl parçalama tamponu ve 10 µL alkalın proteaz ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 350 µl nötralizasyon solusyonu ilave edildi. 10 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 50 µl H₂O ilave edildi, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 14.000×rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu.

2.4.2.2. Gfp'nin PCR ile Çoğaltılması ve pGEMT-Easy Vektörüne Klonlanması

pDU20*gfp* transfer vektöründen PCR yöntemiyle, sferoidin promotörüyle beraber çoğaltılan *gfp* geni, jelden temizlendi ve sferoidin promotörü altında *gfp* genini içeren bu parça, pGEMT-Easy vektörüne klonlandı. Oluşturulan yeni vektör, pG-*gfp* olarak isimlendirildi.

pG-*gfp* klonlarından 5 ml gece kültürü atıldı. Bu klonlardan kit (Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega) kullanılarak saf plazmit DNA'ları izole edildi. Bunun için 5 ml kültür 14.000×rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 µl süspansiyon tamponunda çözüldü, üzerine 250 µl parçalama tamponu ve 10 µl alkalın proteaz ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 350 µl nötralizasyon solusyonu ilave edildi. 10 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kittede bulunan ve içerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 50 µl H₂O ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu.

PCR işlemi için, 3' → 5' ekzonükleaz (hataları doğrulama) aktivitesine sahip olan Phusion (FINNZYMES, Kat No: F-530S) marka DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntüledi (Tablo 4).

<u>PCR Karışımı</u>	<u>PCR Koşulları</u>
1 µl Kalıp DNA	95°C'de 3'
1,5 µl Fw	
1,5 µl Rw	95°C'de 1'
1,5 µl dNTP	65°C'de 30''
1 µl MgCl ₂ 50mM	72°C'de 1'
10 µl HF Tampon 5x	
0,5 µl Phusion DNA polimeraz	72°C'de 7'
33 µl ddH ₂ O	4°C

2, 3, ve 4. basamaklar 35 döngü halinde yapılmıştır.

Klonlama işlemi için, AMV133GFPFw ve AMV133GFPRw primerlerindeki kesme bölgeleri değil, pGEM-T Easy vektördeki *EcoR* I kesme bölgesi kullanıldı.

Tablo 4. Homolog rekombinasyon için kullanılan primerler. Altı çizili kısımlar enzim kesme bölgelerini göstermektedir

Primer Adı	Primer Sırası
AMV133GFPFw	<i>Sac</i> I 5'-GCATCGAG <u>GAGCTCT</u> ACTGTGCGAAACATCTAACG-3'
AMV133GFPRw	<i>Pac</i> I 5'GCATCGAT <u>TAAATTA</u> AAAATTCTCACTTGTACAGCTC-3'

2.4.2.3. Gfp Taşıyan pGEMT-Easy İhtiva Eden Klonların Restriksiyon Analizleri

İzole edilen plazmit DNA'ların hedef DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA'ları *Eco*RI restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 7 µl DNA, 0,5 µl *Eco*RI (promega), 2 µl enzime ait 10X tamponu ve 10,5 µl RNaz'lı H₂O (1:25 oranında RNaz:H₂O) olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Ardından % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

Elektroforez edilen kesim reaksiyonunun oluşturduğu gfp bandı jelden kesilip mikrosantrifüj tüplerine alındı ve ürünün jelden temizlenmesi "Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma kiti (Macherey-Nagel)" ve kitin içindeki kullanma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 10 mg jel parçası için 30 µl bağlanma tamponu (NT) ilave edildi. Karışım 50°C'de 15 dakikadan az olmayacak şekilde jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. Bu süre sonunda erimiş solüsyon toplama tüplerinde bulunan kolonlara aktarıldı, 14.000×rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Kolonlara 600 µl yıkama tamponu (NT3) ilave edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Yıkama işlemi iki kere tekrarlandı. Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. "Elution tamponu" eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Kolonlar atıldı. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. DNA dizi analizi yaptırılarak *gfp*'nin DNA'sı doğrulandı.

2.4.2.4. US -DS Askı Bölgelerini Taşıyan pBluescript SK(-) Vektörüne *gfp* Geninin Klonlanması

İzole edilen rekombinant plazmit DNA'larına *gfp* geninin ligasyonunu sağlamak için, her iki DNA sırası da aynı enzimle kesilmek zorundadır. Bunun için uygun olan, *EcoRI* enzim kesme bölgesidir. Kesim için kullanılan *EcoRI* bölgesi, pSK-AMV133USDS'de pSK (-) vektör ve pG-*gfp* için de pGEMT-Easy vektör çoklu klonlama bölgesinde mevcuttur. Bu yüzden, primerlerde kesme bölgeleri bulunan enzimler kullanılarak değil, *EcoRI* enzimi kullanılarak kesim yapıldı. Kesim reaksiyonu her iki vektör için ayrı ayrı yapıldı ve hacim olarak, 7 µl DNA (birinci kesim için askı bölgelerini taşıyan rekombinant vektör, diğer kesim için *gfp* taşıyan vektör), 0,5 µl *EcoRI* (promega), 2 µl enzime ait 10X tamponu ve 10,5 µl RNaz'lı H₂O (1:25 oranında RNaz:H₂O) olacak şekilde 20 µl'lik reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Ardından % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

Jelden temizlenen kesilmiş US-DS askı bölgelerini taşıyan rekombinant plazmit DNA'sına, 3:1 oranında *gfp* (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg US-DS + pBluescript) klonlandı.

Reaksiyon:

1 µl US-DS + pBluescript

5 µl 2 × ligasyon tamponu

1 µl T4 DNA ligaz ve

3 µl *gfp* biraraya getirilerek 10 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.4.2.5. Elektrotransformasyon

US-DS + pBluescript plazmitine *gfp* geninin klonlandığı plazmitleri hücreye aktarmak için elektrokompotent *E. coli* DH10β hücreleri kullanıldı. Kompotent *E. coli* hücrelerinin bulunduğu tüpler buz üzerine alındı ve bu hücrelerin üzerlerine 1-3 µl ligasyon karışımından konuldu ve karıştırıldı. Karışım elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve kuvvetler elektroporatör cihazına (BioRad) yerleştirildi. Kuvvetler cihazda 200 ohm, 1,5-2K ve 25 mF'de 3-4 saniye bekletildi. Ardından kuvvetin içeriği 1ml LB broth

besiyerine transfer edildi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler 6.000×rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hücreler 200 µl LB Broth besiyerisinde süspansiyon edildi ve petri kaplarında bulunan amp⁺, X-gal, IPTG taşıyan LB-Agar besiyerisi üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler 37°C'de 1 gece inkübasyona konuldu. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden gece kültürleri hazırlandı.

2.4.2.6. US-DS Askı Bölgelerini ve *gfp* Genini Taşıyan pBluescript Klonlarının Elde Edilmesi

Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000×rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vorteksenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA, 0,1 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. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %96'lık etanol ilave edilerek 14.000×rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti % 70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH₂O'da çözüldü.

2.4.2.7. US-DS Askı Bölgelerini ve *gfp* Genini Taşıyan pBluescript Klonların Dizi Analizi

US-DS askı bölgeleri ile Gfp taşıyan rekombinant plazmitin gözlendiği klonlar tespit edildi. Bu klonlardan kit (Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega) kullanılarak saf plazmit DNA'ları izole edildi. Bunun için 5 ml kültür 14.000×g'de 3 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 µl süspansiyon tamponunda çözüldü, üzerine 250 µl parçalama tamponu ve 10 µL alkalın proteaz ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 350 µl nötralizasyon solusyonu ilave edildi. 10 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı.

Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 50 µl H₂O ilave edildi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 14.000×rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu.

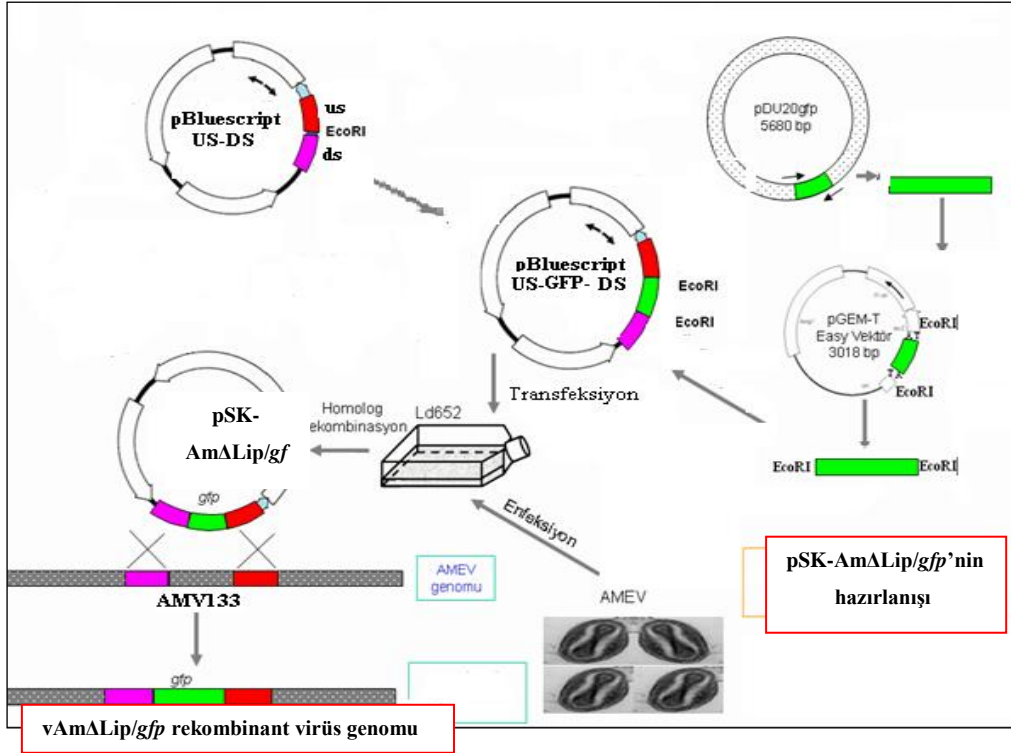
2.4.2.8. US-DS Askı Bölgelerini ve *gfp* Genini Taşıyan pBluescript Klonların Restriksiyon Analizleri

İzole edilen plazmit DNA'larının hedef DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için iki farklı kesim yapıldı. Birinci kesimde; bu plazmit DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 7 µl DNA, 0,5 µl *EcoRI* (promega), 2 µl enzime ait 10X tamponu ve 10,5 µl dH₂O olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı. İkinci kesimde ise bu plazmit DNA'ları *Kpn1* ve *BamH1* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. 8µl DNA, 1µl *Kpn1*, 1 µl *BamH1*, 2 µl TA tamponu ve 8 µl dH₂O olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Ardından % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

Belirlenen klonlardan pSK-AMV133USDS*gfp-1* kodlu klon ayrıldı, pSK-AmΔLip/*gfp* olarak adlandırıldı ve stoklandı. Böylece lipaz geninin askı bölgelerine ve işaret olarak GFP'yi üreten, *gfp* genine sahip rekombinant plazmit oluşturuldu. Plazmitler, *E. coli* DH10β hücrelerinde bol miktarda üretildi ve daha sonra transfeksiyon deneyinde kullanıldı.

2.5. Rekombinant Virüsün Oluşturulması

Böylece, vektördeki *gfp* geni ile, yaban tip AMEV virüsündeki AMV133 kodlu genin homolog rekombinasyonla silinmesi işlemi gerçekleştirildi. Rekombinant transfer vektörünün oluşturulması ile ilgili tüm klonlama, enfeksiyon, transfeksiyon ve homolog rekombinasyon aşamaları Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6. Rekombinant virüsün oluşturulması

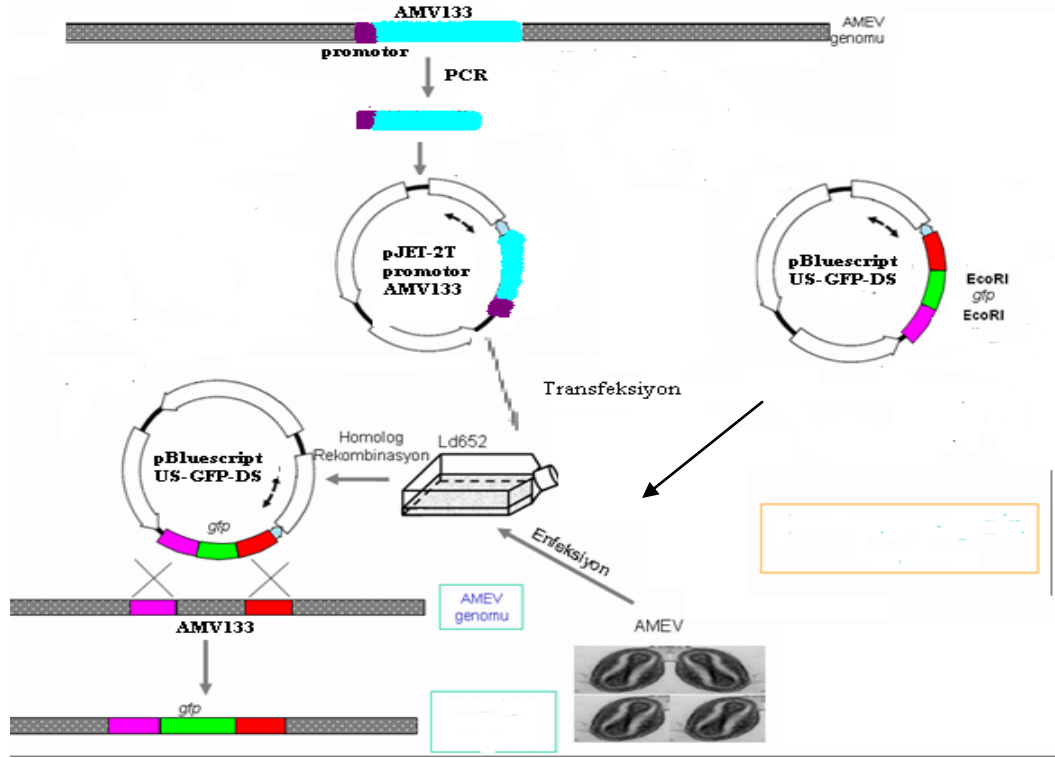
2.5.1. pSK-AmΔLip/gfp, Geçici Ekspresyon Vektörü ve Yaban Tip AMEV'nin Ld Hücrelerine Transfeksiyonu

pSK-AmΔLip/gfp vektörünün transfeksiyonu için, 35 mm'lik (8 cm²'lik) kültür kabına $9,4 \times 10^5$ Ld652 hücresi bırakıldı. Hücrelerin tutunması için, oda sıcaklığında 4-5 saat bekletildi. Daha sonra hücrelerin üzerindeki sıvı alındı ve MOI = 5 olacak şekilde, 600 µl enfeksiyon sıvısı (FBS'siz besiyeri ve 6 µl virüs ($7,76 \times 10^8$ pfu/ml AMEV virüs) ilave edildi. Hücreler, enfeksiyon sıvısı ilave edildikten sonra, 2 saat oda sıcaklığında 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, iki ayrı tüpte transfeksiyon karışımı hazırlandı. Tüplerden birinde, 5 µg DNA (pSK-AmΔLip/gfp) son hacim 100 µl olacak şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltilti. Diğer tüpe ise 85 µl FBS'siz besiyeri ve 15 µl selfektin bırakıldı. Her iki tüp oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve bekleme süresinin sonunda, tüp içerikleri birbirine karıştırıldı. Bu transfeksiyon karışımı, karıştırıldıktan sonra 20 dakika daha bekletildi. Aynı şekilde, transformasyonda kullanmak için oluşturulan geçici ekspresyon vektöründen de başka bir tüpe 5 µg eklendi ve son hacim 100 µl olacak şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltilti. Diğer tüpe ise 85 µl FBS'siz besiyeri ve 15 µl selfektin bırakıldı ve bu iki tüpe ek olarak 5 µg DNA (pSK-AmΔLip/gfp) son hacim 100 µl olacak

şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltildi. Her üç tüp oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve bekleme süresinin sonunda, tüp içerikleri birbirine karıştırıldı. Bu transfeksiyon karışımı, karıştırıldıktan sonra 20 dakika daha bekletildi. Diğer yandan, hücrelerin üzerinden enfeksiyon sıvısı alındı ve hücreler FBS'siz besiyeriyle yıkandı. Hazırlanan 200 µl'lik birinci transfeksiyon karışımı ve 800 µl FBS'siz besiyeri 6 gözlü kabın bir gözündeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Geçici ekspresyon vektörünü ve homolog rekombinasyonda kullanılacak vektörü taşıyan 300 µl'lik transfeksiyon karışımı ve 700 µl FBS'siz besiyeri 6 gözlü kabın başka bir gözündeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Tekrar 5 saat oda sıcaklığında 2,5 rpm'de sallandı. 5 saatin sonunda eski besiyeri çıkarıldı ve 2 ml FBS'li besiyeri eklenerek 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında, Auxovert floresan inverted mikroskop ile bakılarak hücrelerde yeşil rengin oluşumu, yani sferoidin promotörü sayesinde sentezlenen GFP proteininin ortaya çıkışı beklendi.

Yaklaşık 5 gün sonra, ortamdaki GFP proteinin çokluğuna bakılarak yeterince rekombinant virüs üretildiği tahmin edildi. Hücreler, besiyeriyle toplandı ve 1.000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek rekombinant virüsler hasat edildi.

Plak deneylerinde rekombinant virüsler çoğaltılamadığı için sadece transfer vektörünün kullanıldığı, aynı zamanda transfer vektörün yanında geçici ekspresyon vektörünün de kullanıldığı ilk transfeksiyon solüsyonu oluşan rekombinant virüsleri artırmak amacıyla tekrar transfeksiyonla çoğaltıldı. İlk transfeksiyonda geçici ekspresyon vektörü kullanılan transfeksiyon solüsyonuna bu vektör tekrar eklendi, sadece transfer vektörü ile yapılan transfeksiyon solüsyonunda ise geçici ekspresyon vektörü kullanılmadı ve plak deneylerine devam edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Hem transfer vektörünün hem de geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı transfeksiyon işlemi

2.5.2. Plak Deneyi ile Rekombinant AMEV'nin Seçimi

Transfeksiyon işleminden sonra elde edilen virüs süspansiyonu, rekombinant virüslerin (*gfp* genini ve lipaz geninin askı bölgelerini içerenleri) yanı sıra, yaban tip AMEV'leri de içermektedir. Karışık süspansiyondan rekombinantları seçmek için, virüs süspansiyonu Ld652 hücrelerine inoküle edildi ve rekombinant virüsler "plak deneyi" ile seçilerek saflaştırıldı (Dulbecco ve Vogt, 1953). Plak deneyi için, Ld652 hücreleri, $1,7 \times 10^6$ olacak şekilde son hacim 1,5 ml'ye ayarlanarak, 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücrelerin tabana tutunması için yaklaşık 4-5 saat 28 °C etüvde bekletildi. Transfeksiyonda sadece askı bölgeleri ile *gfp* taşıyan vektörün kullanılmasıyla üretilen rekombinant AMEV (*vAmΔLip/gfp*) virüsten, besiyeri kullanarak son hacim 900 µl olacak şekilde seyreltikler (10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) hazırlandı. Aynı şekilde, transfeksiyonda askı bölgeleri ile *gfp* taşıyan vektörün yanında geçici ekspresyon vektörünün kullanılmasıyla üretilen rekombinant AMEV (*vAmΔLip/gfp*) virüsten, besiyeri kullanarak son hacim 900 µl olacak şekilde seyreltikler (10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) hazırlandı. Her bir seyreltik virüs solüsyonu, farklı bir gözdeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Hücre-virüs karışımı, iki saat 2,5

rpm'de sallanarak, virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. İki saatin sonunda, enfeksiyon sıvısı uzaklaştırıldı ve hücreler, FBS içermeyen besiyeri ile yıkanarak tutunmayan virüslerin deney ortamından uzaklaştırılması sağlandı. Daha önceden, %2,5 olacak şekilde Sea plaque agaroz ddH₂O'da çözüldü. Hazırlanan karışım, mikrodalga fırında eritildi, otoklavlandı ve 45°C'lik su banyosuna bırakıldı. Agarozun uygun sıcaklığa (hücreleri yakmayacak ve dökülmeden önce donmayacak) gelmesinden sonra, 1 hacim agaroz : 1 hacim besiyeri olmak üzere yeni bir karışım hazırlandı. Hücrelerin üzeri, 2 ml agaroz32 besiyeri karışımıyla kaplandı. Agarozun tamamen donması için, kapağı açık şekilde bekletildi. Agaroz donduktan sonra kapak kapatıldı. Hücre kültür kabı, ddH₂O ile ıslatılmış peçetelerle birlikte bir kutuya yerleştirildi ve 28°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Plak oluşumu Auxovert floresan inverted mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Yaklaşık üçüncü günde, ancak floresan mikroskop ile görülebilen GFP içeren plaklar gözlenmeye başladı. Bir hafta sonra, bu yeşil renkli GFP içeren öbeklerden alınan virüsler çoğaltıldı. Geçici ekspresyon vektörü eklenmeyen plaktaki virüsler normal çoğaltma işlemine tabi tutuldu. Ancak, bu vektörün eklendiği virüleri çoğaltma işleminde, plaktaki yeşil renkli GFP içeren öbeklerden alınan virüsler ile Ld652 hücreleri enfekte edildi ve 2 saat enfeksiyondan sonra transformasyon solüsyonu hazırlanırken yapıldığı gibi bir tüpe 5 µg geçici ekspresyon vektörü eklendi ve son hacim 100 µl olacak şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltildi. Diğer tüpe ise 85 µl FBS'siz besiyeri ve 15 µl selfektin bırakıldı. Her iki tüp oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve bekleme süresinin sonunda, tüp içerikleri birbirine karıştırıldı. Bu transfeksiyon karışımı, karıştırıldıktan sonra 20 dakika daha bekletildi. Diğer yandan, hücrelerin üzerinden enfeksiyon sıvısı alındı ve hücreler FBS'siz besiyeriyle yıkandı. Hazırlanan 200 µl'lik transfeksiyon karışımı ve 800 µl FBS'siz besiyeri hücrelerin üzerine bırakıldı. Çoğaltılan virüs süspansiyonu kullanılarak bir sonraki plak işlemi yapıldı.

Ardışık şekilde plaklar yapılarak saf vAmΔLip/gfp virüsü elde edilmeye çalışıldı.

3. BULGULAR

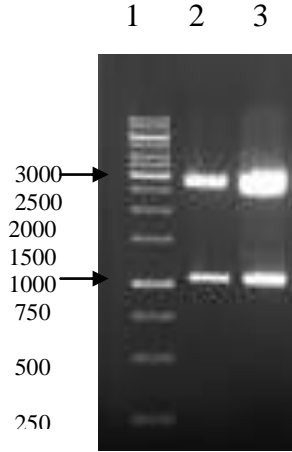
3.1. Virüslerin Üretimi

Tez çalışması sırasında kullanılacak virüslerin üretimi için, Ld652 hücre kültürü kullanıldı. Yaban tip AMEV Ld652 hücre kültürüne enfeksiyonu yapıldı. Enfekte edilmiş hücreler 28°C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. Enfeksiyondan 3 gün sonra AMEV enfekte olmuş hücrelerin içerisinde, enfeksiyona has belirgin granüllerin ve nükleus kararmalarının oluştuğu gözlemlendi. Hücrelerin %100 oranında enfekte olduğu gözlenince (9 gün sonra), her bir farklı virüsle enfekte edilen hücre sıvısı toplandı ve 2.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen virüs süspansiyonları kullanılarak sağlıklı Ld652 hücreleri, yine her bir virüs için ayrı ayrı tekrar enfekte edildi. Enfeksiyonların sonucu olarak, deneysel işlemler sırasında kullanılacak virüs stokları üretildi.

AMEV'ye ait virüs stoklarının konsantrasyonları, EPDA metodu ile yapılan hesaplamaya göre tespit edildi. Seyreltik virüs süspansiyonu kullanarak, 60 gözlü hücre kültür kaplarında yapılan enfeksiyonlardan elde edilen sonuçlar, istatistiksel temele dayanan EPDA formülüne göre hesaplandı. Yapılan hesaplamaya göre, AMEV konsantrasyonu $7,76 \times 10^8$ pfu/ml olarak belirlendi. Virüs stokları, ışık almayacak şekilde 4°C'de muhafaza edildi.

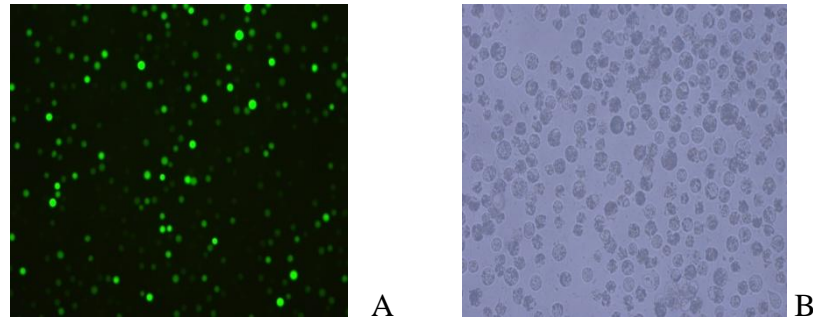
3.2. Geçici Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

AMV133 geninin virüs için önemli bir gen olduğu ve homolog rekombinasyonla bu gen silindiğinde virüsün çoğalamayacağı düşünüldüğünden dolayı, virüsün çoğalmasını sağlamak amacıyla geçici ekspresyon vektörü oluşturuldu. Yaban tip virüs genomu kalıp olmak üzere, AMV133Fw ve AMV133Rw primerleri kullanılarak AMV133 kodlu gen promotörü ile birlikte çoğaltıldı. Çoğaltılan sıralar pJET-2T vektörüne klonlandı (Şekil 8).



Şekil 8. Geçici ekspresyon vektörün jel görüntüsü. 1. Marker, 2 ve 3. Bgl 2 enzimi ile yapılan kesim

Hazırlanan geçici ekspresyon vektörü, AMEV, pSK-Am Δ Lip/*gfp* ile beraber Ld652 hücrelerine transfeksiyonundan sonra, hücrelerde GFP proteininin ortaya çıkışı, Auxovert floresan inverted mikroskopta yeşil rengin oluşumuyla belirlendi (Şekil 9). Yeşil rengin görünmesi, *gfp* geninin AMEV'nin genomuna dahil olduğunu ve GFP proteininin oluşturulan rekombinant virüs (vAm Δ Lip/*gfp*) tarafından üretildiğini göstermektedir. Elde edilen transfeksiyon sıvısı çoğaltıldı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

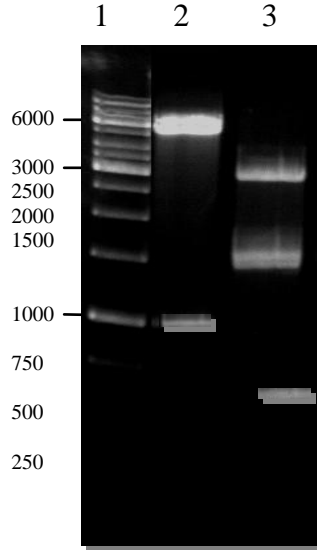


Şekil 9. Transfer vektör ile birlikte geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı transfeksiyon görüntüsü. A. İverted mikroskop görüntüsü, B. Işık mikroskobu görüntüsü

3.3. Lipaz Geni (AMV133) Çıkartılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması

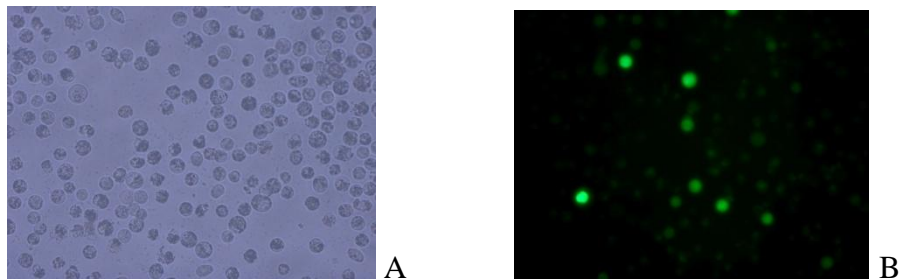
Tez çalışmasında, AMV133 kodlu genin AMEV virüsü için önemli olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla, homolog rekombinasyonla genin virüs genomundan silinmesi

sağlanarak rekombinant virüs oluşturuldu. Yaban tip virüs genomu kalıp olmak üzere, AMV133'ün askı bölgelerinin klonlandığı pBlueScript SK(-) vektörüne sferoidin promotörü altında 28 kDa'luk GFP proteini üreten genin sırası, AMV133GFPF ve AMV133GFPR adlı primerler kullanılarak çoğaltıldı ve bu iki askı bölgesinin arasına klonlandı (Şekil 10).



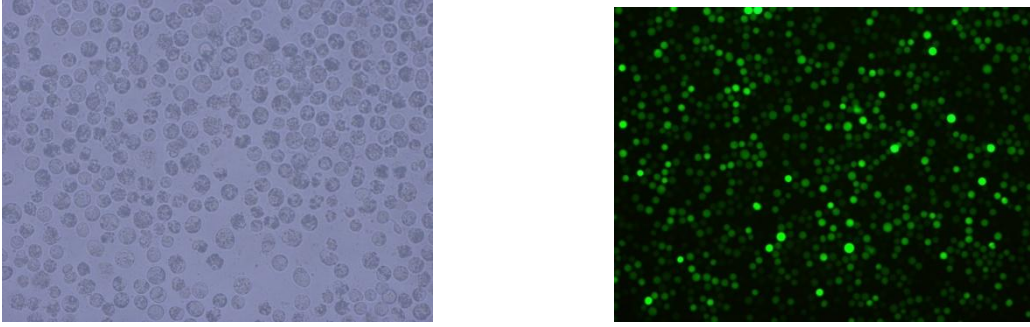
Şekil 10. Homolog rekombinasyonda kullanılmak üzere olan Transfer vektörün jel görüntüsü. 1.Marker, 2. *EcoR1* ile yapılan kesim, 3. *BamH1* ve *Kpn1* ile yapılan çapraz kesim

Hazırlanan transfer vektörünün (pSK-Am Δ Lip/*gfp*), AmEV ile enfekte Ld652 hücrelerine transfeksiyonundan sonra, hücrelerde GFP proteininin ortaya çıkışı, Auxovert floresan inverted mikroskopta yeşil rengin oluşumuyla belirlendi (Şekil 11).



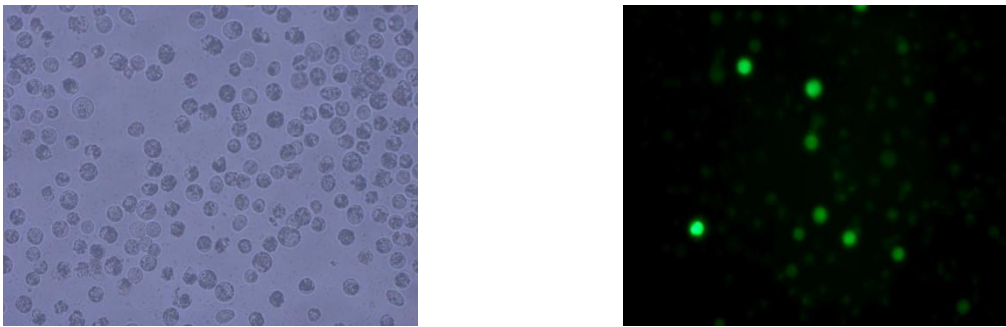
Şekil 11. A. Sadece transfer vektörün kullanıldığı transfeksiyonun ışık mikroskobu görüntüsü. B. İnverted mikroskop görüntüsü

Yeşil rengin görünmesi, *gfp* geninin AMEV'nin genomuna dahil olduğunu ve GFP proteininin oluşturulan rekombinant virüs (vAm Δ Lip/*gfp*) tarafından üretildiğini göstermektedir. Elde edilen transfeksiyon sıvısı çoğaltıldı ve 4 °C'de muhafaza edildi (Şekil 12).



Şekil 12. Transfer vektörün yanında geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı ikinci kez çoğaltılan transfeksiyon solüsyonu görüntüsü

Oluşturulan her iki rekombinant vektörün kullanıldığı deneyin sonucu ile geçici ekspresyon vektörü olmadan transfer vektörünün kullanıldığı deney sonucunu karşılaştırabilmek amacıyla yapılan deneyde, sadece transfer vektörü kullanıldığında ikinci kez çoğaltılmak istenen transfeksiyon solüsyonunda herhangi bir artış gözlenmemiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Sadece transfer vektörünün kullanıldığı ikinci kez çoğaltılan transfeksiyon solüsyonu görüntüsü

GFP proteininin üretimi, AMV133'e ait olan ilk ATG'den değil, *gfp* genine ait ikinci ATG'den, sferoidin promotörü sayesinde gerçekleşmektedir.

atacaataatagttatata **gcacgtagatggaatacc**aaaaactatagaatatttagatatttataaattcgaacattgaaaatataaat
 ataaaatccaacaattttcaaatttagaaaaatggaattgttcagttaatattaattatcctgaaaaattgtcaattattaatctaaatatttc
 aaaaatttaaatttttagatttaacagatataataattgattcaaatatttttaaaaaatacatcgttacaaaaataaattgattttat
 atgaataaatgatatagaatcaattaccattatctttagaattttatcatataaaaaacaataaaaaatataaataattattattatatact
 gatttgcattaaaaaaataatatttagacgaatgtgtttgaaatatttttacacaaaaaattattcagtcgaaacaatattattttt
 caacaaaatatagtctttcgtacatacaatttcaaatgtttaaataatttaaaaaatttaaaaaaataatattagatacacacaacgaatac
 aatattaacaaaataaatatgccagatactataaatcatattataatcatagatatagtttattgaaaaatattaattataaaaaaattaa
 aaaatttatataaattgaaattaataatgcatgttgaagatgaaataaattatgaatttaataatattattattgatttaagtcaacaaat
 ataaaacacattaaaataaattataatataataaaaaattataaataagaattttatataatgtcccttttcgattgaaataatagaata
 tcttgattgtgataattatcctttattttcaaaatttctatgaaaatttaaaaaaataaataattgata **gtaattattgtt**tagagaatata
 atagattattatcaatgtaaaaaataaataccaacaaatattgtctagaataatataagaagacgatgatatagaacagtagatata
 ataaattattttttattactaacatataataaataaataatgacaatatttgaatataatattgataattgtttattagctttatgtttata
 atatttttat **atg**gtttttatataaaaagaagaatatacgaatataaattgaaaatattccattgaaataatatagataatgtaaatt
 atccaagtgaatt **gcacgagagcctactgtcgaacatctaac**gattgtagattattaagattattgatggccaatacatcataaata
 cattataatattattataatcaatcataatttttatataattttatctaaaaggacttttttttatataataataataa **atgagtaacg**
faccttagcaacggatccccgggctgcaggagcaaggcggaggaactgtcactggcgtggtcccaattctcgtggaactgga
tggegatgtgaatgggcacaaattttctgcagcggagagggtgaaggtgatgccacatacggaaagtcaccctgaaattcatc
gcaccactgaaagctccctgtgccatggccaacactgtcactaccctgacctatggcgtgcagtgctttccagataaccagac
catatgaagcagcatgacttttcaagagcgccatccccgagggtatgtgcaggaggaacctcttttcaaagatgacgggaact
acaagaccgcgctgaagcaagtcgaaggtgacaccctggtaagataatcagctgaagggcattgactttaaggaggatgg
aaacattctcggccacaagctggaatacaactataactcccacaatgtgtacatcatggccgacaagcaaaagaatggcatcaagg
tcaactcaagatcagacacaacattgaggatggatccgtgcagctggccgaccattatcaacagaaactccaatcggcgacgg
ccctgtgctctcccagacaaccattacctgtccaccagctgccccgtctaaagatcccacgaaaagagagaccacatggctc
gctggagttgtgaccgctgctgggatcacacatggcatggac **gagctgtacaagtgagaatttaattaatc**gatgcatcactagtg
 aattcgatatacaagcttgataaattagttttgtaaa **taa**atgaaattttatataatattatataatgaatacgcataatcataaattacaat
 ataaaaataaattattgtgtttacatataaatgattttaatttaataatacaaaaaataaatttatataatgcactagggatgtgat
 ttatgaaaaaataattcacatagtttgaagaaaattatgattactataaaaatatttaaaaaataaaagaattaatgatcatgtttctat

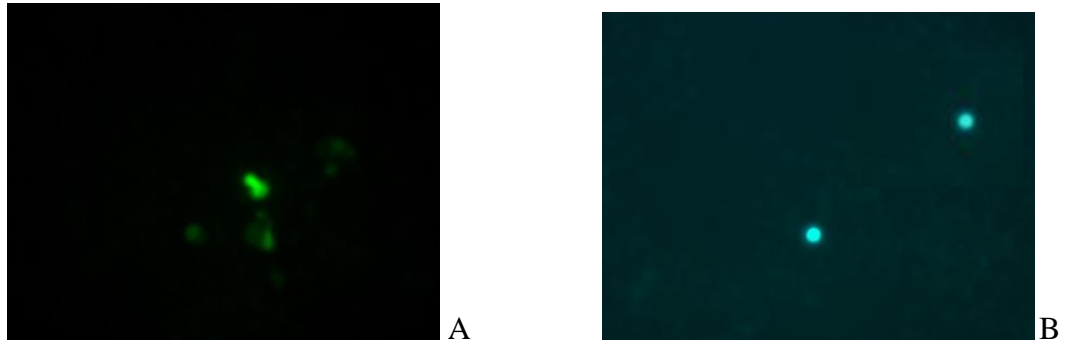
Şekil 14. Homolog rekombinasyondan sonra oluşan DNA dizisi. Sarı ve altı çizili sıralar, AMV133F ve AMV133 UsFw primerlerini, mavi ve koyu sıralar AMV133GFPw ve AMV133GFPRw primerlerini ve yeşil sıralar *gfp* genini göstermektedir.

3.4. Plak Deneyleri ile Rekombinant Virüsün Seçimi

Transfeksiyon işleminden sonra elde edilen virüs süspansiyonu, rekombinant virüslerin (*gfp* genini ve lipaz geninin askı bölgelerini içerenleri) yanı sıra, yaban tip AMEV'leri de içermektedir. Karışık süspansiyondan rekombinantları seçmek için, virüs süspansiyonu Ld652 hücrelerine inoküle edildi ve "plak deneyleri" yapıldı (Dulbecco ve Vogt, 1953). Sadece transfer vektörün kullanıldığı plak deneyleri ile transfer vektörün yanında geçici ekspresyon vektörünün de kullanıldığı plak deneylerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir.

3.4.1. Sadece Transfer Vektör ile Yapılan Plak Deneyleri

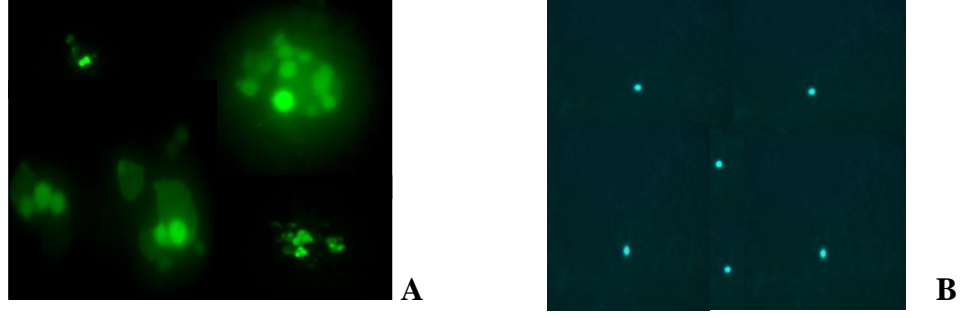
Rekombinant virüsü seçmek için yapılan tekrarlı plak deneylerinde, pSK-Am Δ Lip/*gfp* ile transfeksiyonundan sonra sadece tek bir bölgede plak gözlemlendi ve oluşan rekombinant virüs seçilip transfeksiyon işlemine tabi tutulduktan sonra şekil 15’de görülen iki hücre halindeki plağın dağılmış halde olduğu ve yine iki hücre olarak bulunduğu gözlemlendi. Tekrarlı plaklar yapılmasına rağmen oluşan rekombinant virüs çoğaltılamadı.



Şekil 15. pSK-Am Δ Lip/*gfp* ile transfeksiyondan sonra Ld652 hücreleri. Floresan lamba altında GFP ifadesinin belirlenmesi. A. 1. plak, B. 2. plak görüntüsüdür

3.4.2. Transfer Vektörün Yanında Geçici Ekspresyon Vektörünün Kullanıldığı Plak Deneyleri

Yapılan plak deneylerinde, pSK-Am Δ Lip/*gfp*’nin yanında geçici ekspresyon vektörünün de (pJET-promotor + AMV133) kullanıldığı transfeksiyondan sonra, 6 gözlü kabın aynı gözünde farklı bölgelerde plaklar gözlemlendi ve oluşan rekombinant virüs seçilip transfeksiyon işlemine tabi tutulduktan sonra yapılan ikinci plakta, şekil 16’da görüldüğü gibi plak halindeki toplu hücrelerin dağıldığı gözlemlendi ve tekrarlı plaklar yapılmasına rağmen oluşan rekombinant virüs çoğaltılamadı.



Şekil 16. pSK-Am Δ Lip/*gfp* ile pJET-promotor + AMV133'ün transfeksiyonundan sonra Ld652 hücreleri. Floresan lamba altında GFP ifadesinin belirlenmesi. A. 1. plak, B. 2. plak görüntüsüdür

4. TARTIŞMA

Amsacta moorei'den (Lepidoptera; Arctiidae) izole edilen AMEV'nin (Roberts ve Granados, 1968) böcekler sınıfı içerisindeki konak spektrumu incelenmiş ve bu virüsün, zirai açıdan oldukça zararlı böcekleri içeren Lepidoptera ve Orthoptera cinslerine ait böcek türleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Linda vd., 1998). 2000 yılında tüm genom analizine sahip olan AMEV 292 ORF içermektedir ve bunlardan biri AMV133 olarak kodlanan lipaz geni olarak ileri sürülmüştür (Bawden vd., 2000). Bu genin gerçekten bir lipaz enzimi olup olmadığının bilgisine ulaşılması, entomopoksvirüslerin enfektivitede kullandıkları mekanizmaların açığa çıkmasını sağlayacak bilgilerdendir ve bu enzime olan bağlılığının bilinmesi konak ile virüs arasındaki etkileşimi anlamamızı arttıracaktır. Bu gibi bilgiler ise bu virüse karşı herhangi bir tedbir alınması gerektiği veya bu virüsün kullanılması gerektiği durumlarda virüsün kontrol edilmesini sağlayacaktır.

Poksvirüsler, Chordopoksvirüsler (omurgalıları enfekte eden) ve Entomopoksvirüsler (omurgasızları enfekte eden) olmak üzere iki alt familyadan oluşmaktadır. AMEV'in dahil olduğu Entomopoksvirüslerde, genlerin transkripsiyonu iki aşamada gerçekleşir ve transkript olan genler erken ve geç genler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Erken genler, DNA replikasyonundan önce, geç genler ise transkripsiyona uğrayan genler şeklinde ayırım yapılmaktadır. Genellikle erken proteinler enfeksiyondan üç saat sonra ve geç proteinler ise on iki saat sonra tespit edilmektedirler (King vd., 1998). Bawden vd., (2000)'ları tarafından yapılan biyoinformatik analizlerde 5' UTR'sinde TAAATG motifini içeren genler, geç gen olarak sınıflandırılmış. Yine aynı çalışmada, AMV133'ün translasyon başlangıç noktasını da içine alan TAAATG geç gen motifi gözlemlenmiş ve AMV133 geç gen olabilecek genler içerisinde sınıflandırılmıştır. Chordopoksvirüslerin içinde yer alan Orthopoksvirüslerde ise, genlerin sınıflandırılması, erken, ara (intermediate) ve geç genler olarak yapılmıştır. CIV (*Chilo* iridescent virüs)'lerde ise, erken gen grubu en erken ve gecikmiş erken genler olarak ikiye ayrılmıştır. En erken ve erken genler DNA replikasyonundan önce gerçekleşmektedir (Williams, 1998). En erken genler protein sentezine ihtiyaç duymazken, erken genler, en erken genlerin kodladığı proteinlere ihtiyaç duymaktadır.

AMV133'ün ürününün, vaksinia virüsün sahip olduğu lipaz aktivitesi gösteren *p37* geninin yaptığı işlev gibi, membrana füzyonunda fonksiyon gösteren virüs kapsidinde

bulunan yapısal bir protein olması halinde (Baek vd., 1997) projeni virüsler zarf kazanamayacak ya da diğer hücelere penetre olamayacaktır. Vaccinia virüste bu genin delesyonu durumunda virüs enfeksiyon oluşturmamaktadır. AMEV’de ise enfeksiyon gözlemlenmiştir. Hem seyreltilmiş hem de seyreltilmemiş transfeksiyon solüsyonu kullanılarak yapılan plak deneylerinde bir rekombinant virüsün sadece bir hücreyi enfekte etmesi, burada çoğaldıktan sonra hücrenin parçalanması, açığa çıkan yavru virüslerin yakın çevredeki hücreleri enfekte etmesi ve bu şekilde büyük plak öbeklerinin oluşması beklenmektedir. Neticede lipaz geni çıkarılmış yerine *gfp* geni sokulmuş rekombinant virüsün elde edilmiş olacaktır. Yapılan plak deneylerinde gözlemlenen plaklardan homolog rekombinasyonun gerçekleştiği ve rekombinant virüs olduğu ancak virüslerin çoğalamadığı yani hücreden dışarı çıkamadığı gözlemlenmiştir. Bu durumda, virüsün yayılamaması, genin virüs için önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Benzer sonuç vaccinia virüsün G1L geninin silinmesiyle elde edilmiştir. TET represörünün (TetR) varlığında, TET ile G1L ekspresyonunu düzenlemek için *G1L* ORF’nin *tetO* yerleştirilen upstream bölgesini içeren *G1L* stop kodonundan *G3L* stop kodonuna kadar olan 233 bp’lik genomik DNA sekansını taşıyan plazmit geliştirilmiş ve virüste *G1L* geninin silinmesi başarılmış, ancak hem *tetR* genini hem de *G1L* kodonunun *tetO* upstream bölgesini içeren rekombinant virüsler izole edilememiştir ve vaccinia virüsünün replikasyonunda bu genin önemli olduğu ifade edilmiştir.

Vaccinia virüsüne ait B5R geninin silinmesi üzerine yapılan bir çalışmada homolog rekombinasyon için *gfp* geni yerine elektron mikroskopunda seçiciliği sağlayan *gpt* geni kullanılmıştır. B5R geni silindiğinde oluşan rekombinat virüsün zarf oluşturmadağı ve hücreden dışarı çıkamadığı elektron mikroskopuyla gözlemlenmiştir. Lipaz ile benzer bir çalışma yapılarak, AMEV’den lipaz silindiğinde, virüsün replike olamadığı mı, yoksa çoğalan virüsün hücreden mi çıkamadığına dair kesin sonuca ulaşılabılır. Yine vaccinia virüse ait, günümüzde bütün prokaryot ve ökaryotlarda en azından bir formu ekspres edilen uracil DNA glycosylase enzimi üzerine yapılan benzer bir çalışmada, bu enzimi kodlayan genin vv için hayati bir öneme sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Parvovirüs ve Adeno-ilişkili virüste lipaz enziminin virionla ilişkili yapısal bir protein olduğu ve enfeksiyon için oldukça önemli olduğu gözlemlenmiştir (Zadori vd., 2001; Girod vd., 2002). AMEV’ye ait lipaz geninin de yapısal bir gen olma ihtimali vardır. *lipaz* geni hücre kültüründe bu görevleri yapmıyor olsa bile, Marek hastalık virüsünde görüldüğü gibi doğal konağını enfekte ederken kullanılan bir gen olabilir (Kamil vd.,

2005). Marek hastalık virüsünde lipaz enzimine uygun domainleri içeren bir genin *in vitro*'da lipaz aktivitesi göstermediği ve virüs replikasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Ancak lipaz enziminin amino asid sırasındaki GX SXG korunmuş motifindeki serinin başka bir amino asitle değiştirildiğinde virüsün doğal konağı üzerindeki patojenitesini önemli derecede azalttığı gözlemlenmiştir (Kamil vd., 2005). Bölüm 1.7'de de belirtildiği gibi poksvirüslerin *in vitro*'da hayati olmayan birçok gene sahip olduğu gözlemlenmiştir ve bu genlerden bazılarının virüsün doğal konağını enfekte ederken konağın savunma sistemine karşı kullanıldığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Twardzik vd., 1985; Spriggs, 1994).

5. SONUÇLAR

1. Sadece transfer vektörün kullanıldığı transfeksiyon solüsyonunda gfp oranının az olduğu, transfer vektörün yanında geçici ekspresyon vektörünün de kullanıldığı transfeksiyon solüsyonunda diğerine göre daha yoğun gfp olduğu gözlemlendi.
2. Oluşan plaklardan homolog rekombinasyonun gerçekleştiği ve AMV133 yerine GFP taşıyan rekombinant virüsün oluştuğu gözlemlendi.
3. Sadece transfer vektörün kullanıldığı transfeksiyon solüsyonundan yapılan plaklarda en fazla iki hücreden oluşan plak öbeğinin olduğu, bunun yanında transfer vektör ile birlikte geçici ekspresyon vektörünün de kullanıldığı deneylerde daha fazla plak öbeklerinin oluştuğu gözlemlendi.
4. Plak oluşmasına rağmen hem sadece transfer vektörün kullanıldığı hem de bu vektörle birlikte geçici ekspresyon vektörünün kullanıldığı deneylerde oluşan rekombinant virüslerin çoğalamadığı gözlemlendi.
5. Bu genin virüs çoğalması için önemli bir gen olduğu belirlendi.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *lipaz* genini kodlayan AMV133'ün homolog rekombinasyonla virüsten silindiğinde virüsün çoğalamadığı ve virüs çoğalması için önemli olduğu gözlemlenmiştir. Genin fonksiyonu hakkında bilinmeyen hala çok fazla şey bulunmaktadır. Bilinmeyenlerin aydınlatılabilmesi için yapılması gereken bazı çalışmalar başlıklar halinde sıralanabilir.

1. AMV133 virüsten silindiğinde replikasyonun mu gerçekleşmediği yoksa, virüsün replike olduğu ancak hücre dışına çıkamadığı için mi çoğalamadığı araştırılmalıdır.
2. *Lipaz*'ın yapısal bir protein kodlayıp kodlamadığı araştırılmalıdır.
3. *Lipaz* enzimi kodlayıp kodlamadığı araştırılmalıdır.
4. Yaban tip virüs ile rekombinant virüsün enfektivite oranları karşılaştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Oma, E., Kutish, G.F. ve Rock, D.L., 1999. The Genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus, Journal of Virology, 73, 533-552.
- Allal, C., Claire, B.B., Vincent, M., Clotilde, C.R., Thomas, F., Paola, D.M., Daniel, S. ve Record, M., 2004. Human Cytomegalovirus Carries a Cell-Derived Phospholipase A2 Required for Infectivity, Journal of Virology, 78, 14, 7717–7726.
- Aloui- Ismaili, M.H. ve Richardson, C.D., 1996. Identification and Characterization of a Filament- Associated Protein Encoded by *Amsacta moorei* entomopoxvirus, Journal of Virology, 70, 2697.
- Arif, B. M. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, The entomopoxviruses, E. Kurstak, Editör, Dekker, New York, 175-195.
- Arif, B. M., 1995. Recent Advances in The Molecular Biology of Entomopoxviruses, Journal of General Virology, 76, 1-13.
- Baek, S.H., Kwak, J.Y., Lee, S.H., Lee, T., Ryu, S.H., Uhlinger, D.J. ve Lambeth, J.D., 1997. Lipase Activities of p37, The Major Envelope Protein of Vaccinia Virus, J. Biol. Chem. 272, 32042–32049.
- Bawden, A.L., Glassberg, K.J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W. ve Moyer, R.W., 2000. Complete genomic sequence of the *Amsacta moorei* entomopoxvirus: analysis and comparison with other poxviruses, Virology, 274, 120-139.
- Beaudoin, L., Robert, P., Lal, S.N. ve Decazy, B., 1994. Adoretus Versutus Control Using Entomopoxvirus in Fiji. Plantation Recherche Dev, 1, 50.
- Becker, M.N., Greenleaf, W.B., Ostrov, D.A. ve Moyer, R.W., 2004. *Amsacta moorei* Entomopoxvirus Expresses an Active Superoxide Dismutase, Journal of Virology, 78, 10265-10275.
- Becker, M.N., Todd, T.M. ve Moyer, R.W., 2008. An *Amsacta moorei* Entomopoxvirus Ortholog of The Poly(A) Polymerase Small Subunit Exhibits Methyltransferase Activity and is Non-Essential For Virus Growth, Virology, 375, 2, 624-36.
- Bergoin, M., Veyrunes, J. C. ve Scalla, R., 1970. Isolation ve amino acid composition of the inclusions of *Melolontha melolontha* poxvirus, Virology, 40, 760-763.
- Bertholet, C., Stocco, P., Van Meir, E. ve Wittek, R., 1986. Functional analysis of the 59 flanking sequence of a vaccinia virus late gene, EMBO Journal, 5, 1951-1957.

- Bilimoria, S.L. ve Arif, B.M., 1980. Structural Polypeptides of *Choristoneura biennis* Entomopoxvirus, Virology, 104, 253-257.
- Blasco, R. ve Moss B., 1991. Extracellular Vaccinia Virus Formation and Cell-to-Cell Virus Transmission Are Prevented by Deletion of the Gene Encoding the 37,000-Dalton Outer Envelope Protein, Journal of Virology, 61, 5910-5920.
- Boucias, D. G. ve Pendland, J., 1998. Principles of Insect Pathology, Kluwer Academic Publishers, Boston, 537.
- Broyles, S. S., 2003. Vaccinia virus transcription, Journal General Virology, 84, 2293-2303.
- Cann, A. J., 2005. Principles of Molecular Virology, 4. baskı, Academic Pres, University of Leicester, UK, 43 s.
- Carter, J. B. ve Saunders, V. A., 2007. Virology principles and applications, School of Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, UK, 76 s.
- Charles, J. F., Delecluse, A. ve Nielsen-LeRoux, C., 2000. Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 522 s.
- Darling, A. J., Boose, J. A. ve Spaltro, J., 1998. Virus assay methods: accuracy and validation. Biologicals, 26, 105-110.
- Davison, A. J. ve Moss, B., 1989. Structure of vaccinia virus late promoters. Journal of Molecular Biology, 210, 771-784.
- Dulbecco, R. ve Vogt, M., 1953. Some Problems of Animal Virology As Studied by The Plaque Technique, Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 18: 273-279
- Flexner, J. L. ve Belnavis, D. L., 2000. Microbial Insecticides, Sf: 35-62. Ed: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl, Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 392 s.
- Girod, A., Wobus, C.E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J.A. ve Hallek, M., 2002. The VP1 Capsid Protein of Adeno-Associated Virus Type 2 is Carrying A Phospholipase A2 Domain Required For Virus Infectivity, Journal of General Virology, 83, 973-978,
- Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J.C. ve Bergoin, M., 1995. The *Melolontha melolontha* Entomopoxvirus (MmEPV) Fusolin is Related to Fusolins of Lepidopteran Epps and to the 37 K Baculovirus Glycoprotein, Virology, 208 427-436.

- Goodwin, R.H., Adams, J.R. ve Shapiro, M., 1990. Replication of the Entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in Serum-Free Cultures of A Gypsy Moth Cell Line, Journal of Invertebrate Pathology, 56, 190-205.
- Goodwin, R. H., Milner, R. J. ve Beaton, C. D., 1991. Atlas of Invertebrate Viruses, Entomopoxvirinae, J. R. Adams ve J. R. Bonami, Editörler, CRC Press, Boca Raton, FL, 259-285.
- Granados, R.R. ve Roberts, D.W., 1970. Electron Microscopy of A Pox-Like Virus Infecting An Invertebrate Host. Virology, 40, 230.
- Granados, R.R. ve Naughton, M., 1975. Development of *Amsacta moorei* Entomopoxvirus in Ovarian and Hemocyte Cultures from *Estigmene acrea* larvae. Intervirology, 5, 62.
- Grieger, J.C., Snowdy, S. ve Samulski, R.J., 2006. Separate Basic Region Motifs within the Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Are Essential for Infectivity and Assembly, Journal of Virology, 5199-5210.
- Guo, F. B. ve Yu, X. J., 2007. Re-prediction of protein-coding genes in the genome of *Amsacta moorei* entomopoxvirüs. Journal of Virological Methods, 146, 389-392.
- Hall, R. L. ve Hink, W. F., 1990. Physical mapping and field inversion gel electrophoresis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA, Archives of Virology, 110, 77-90.
- Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1991. Identification, cloning, and sequencing of a fragment of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA containing the spheroidin gene and three vaccinia virus-related open reading frames, Journal of Virology, 65, 6516–6527.
- Harrison, R. L. ve Bonning, B. C., 2000. Genetic engineering of biocontrol agents for insects, Ed: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl, Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 243-280.
- Hengjun, G., Hongyin, Z., Weiqi, G., Yi, L., Weiping, R. ve Shudong, X., 2001. Construction and Identification of The Eukaryotic Expression Vector of Vaccinia Virus Expressing Human Interleukin-2, Chinese J Digestive Diseases, 2, 129–132.
- Henry, J.E. ve Jutila, J.W., 1966. The Isolation of A Polyhedrosis Virus From A Grasshopper, Journal of Invertebrate Pathology, 8, 417-418.
- Henry, J.E., Nelson, B.P. ve Jutila, J.W., 1969. Pathology and Development of The Grasshopper Inclusion Body Virus in *Melanoplus sanguinipes*, Journal of Virology, 3, 605.
- Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F. ve Crook, N. E., 1998. Insect Viruses and Pest Management, John Wiley ve Sons, Chichester.

- Ikonomou, L., Schneider Y.J. ve Agothos S.N., 2003. Insect Cell Culture For Industrial Production of Recombinant Proteins, Applied Microbiology and Biotechnology, 62, 1, 1-20.
- Jarvis, D.L., 2003. Developing Baculovirus-Insect Cell Expression System For Humanized Recombinant Glycoprotein Production, Virology, 310, 1, 1-7
- Kamil, J.P., Tischer, B.K., Trapp, S., Venugopal, K.N., Osterrieder, N. ve Kung H.J., 2005. vLIP, a Viral Lipase Homologue, Is a Virulence Factor of Marek's Disease Virus, Journal of Virology, 79 , 6984–6996.
- King L. A., Wilkinson N., Miller D. P., Marlow S. A., 1998. Entomopoxvirus. Miller LK. Andrew Ball L. eds. *The Insect Viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1-25.
- Langridge, W.R. ve Roberts, D.W., 1982. Structural Proteins of *Amsacta moorei*, *Euxoa auxillaris* and *Melanoplus sanguinipes* Entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 39, 346-353.
- Langridge, W. H. R., 1983, Partial characterization of DNA from five entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 42, 369-375.
- Levin, D.B., Adachi, D., Williams, L.L. ve Myles, T.G., 1993. Host Specificity and Molecular Characterization of The Entomopoxvirus of The Lesser Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, Journal of Invertebrate Pathology, 62, 241-247.
- Li, O., Liston, P. ve Moyer, R.W., 2005. Functional Analysis of the Inhibitor of Apoptosis (*iap*) Gene Carried by the Entomopoxvirus of *Amsacta moorei*, Journal of Virology, 79, 2335-2345.
- Lipa, J.J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Polve.
- Marlow, S.A., Billam, L.J., Palmer, C.P. ve King, L.A., 1993. Replication and Morphogenesis of *Amsacta Moorei* Entomopoxvirus in Cultured Cells *Estigmene Acrea* (Salt Marsh Caterpillar), Journal of General Virology, 74, 1457-1461.
- McGuire, M.R., Streett, D.A. ve Shasha, B.S., 1991. Evaluation of Starch-Encapsulation For Formulation of Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) Entomopoxviruses., J Econ Entomo., 84, 1652-1656.
- Means, J.C., Penabaz, T. ve Clem, R.J., 2007. Identification and Functional Characterization of *Amvp33*, A Novel Homolog of The Baculoviruses Caspase Inhibitor p35 Found in *Amsacta Moorei* Entomopoxvirus, Virology, 436-447.
- Miller, L. K. ve Ball, L. A., 1998. The Insect Viruses, Plenum Press, New York, 413 s.

- Mitchel, F.L., Smith, G.E. ve Smith, J.W., 1983. Characterization of An Entomopoxvirus of The Lesser Cornstalk Borer (*Elasmopalpus lignosellus*), Journal of Invertebrate Pathology, 42, 299-305.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K. ve Wada, S., 2007. Spindles of an Entomopoxvirus Facilitate Its Infection of the Host Insect by Disruping the Peritrophic Membrane, Journal of Virology, 81, 4235-4243.
- Moss, B., 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development, *Science*, 252,1662-1667.
- Moss, B., 1996. Genetically Engineered Poxviruses For Recombinant Gene Expression, Vaccination and Safety, Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 11341-11348.
- Moss, B., 2001., Poxviridae: The Viruses and Their Replication, *Fields Virology*, 2, 4. Baskı, Lippincott & Wilkins.
- Moyer, R. W., 1999. Encyclopedia of Virology, Entomopoxviruses (Poxviridae), R. G.Webster, A. Granoff, Editörler, 474-481, Academic Press, London.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. ve Summers, M. D., 1995. Editörler, *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Vienna & New York: Springer-Verlag.
- Naarding, M.A., Dirac, A.M., Ludwig, I.S., Speijer, D., Lindquist, S., Vestman, E.L. Stax, M.J., Geijtenbeek, T.B.H., Pollakis, G., Hernell, O. ve Paxton, W.A., 2006. Bile Salt-Stimulated Lipase From Human Milk Binds DC-SIGN and Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transfer To CD4+ T Cells, Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 50, 10, 3367-3374
- Oma, E.A. ve Henry, J.E., 1986. Host Relationships of Entomopoxviruses Isolated From Grasshoppers, *Grasshopper Symposium Proceedings*, March, North Dakota Extension Service, North Dakota State University, 48-49.
- Palumbo, G.J., Buller, R.M.L., 1991. Inhibitors of the lipoxygenase pathway specifically block orthopoxvirus replication, Virology. 1991 Jan;180(1):457-63.
- Palumbo, G.J., Glasgow, W.C. ve Buller, R.M.L., 1993. Poxvirus-induced Alteration of Arachidonate Metabolism, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 2020-2024.
- Peterson, B., Hall, R.L., Moyer, R.W. ve Shuman, S., 1997. Characterization of a DNA Topoisomerase Encoded by *Amsacta moorei* Entomopoxvirus, Virology, 230, 197-206.

- Ponnuvel, K.M., Hiroshi, N., Seiichi, F., Asaoka A., Ishibashi J., Tanaka H. ve Yamakawa M., 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus, Journal of Virology, 77, 19, 10725–10729.
- Roberts, D.W. ve Granados, R.R., 1968. A Poxlike Virus from *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arcxtiidae), Journal of Invertebrate Pathology, 12, 141.
- Roseman, N. A. ve Hruby, D. E., 1987. Nucleotide sequence and transcript organization of a region of the vaccinia virus genome which encodes a constitutively expressed gene required for DNA replication, Journal of Virology, 61, 1398-1406.
- Rosel, J. ve Moss, B., 1985. Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b, Journal of Virology, 56, 830-838.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2005. Entomopoksvirüsler ve biyolojik kontrol, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29, 4, 280-286.
- Spriggs, M.K., 1994. Poxvirus-Encoded Soluble Cytokine Receptors, Virus Research, 33, 1–10.
- Stanbridge, L.J., Dussupt, V. ve Maitlve, N.J., 2003. Baculoviruses as Vectors for Gene Therapy Against Human Prostate Cancer, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2, 79-91.
- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. Insect Pathology, Academic Pres, San Diego.
- Turner, P.C. ve Moyer, R.W., 2002. Poxvirus Immune Modulators: Functional Insights From Animal Models, Virus Research, 88, 35,53.
- Twardzik, D.R., Brown, J.B., Ranchalis, J.E., Todaro, G.J. ve Moss, B., 1985. Vaccinia Virus-Infected Cells Release a Novel Polypeptide Functionally Related to Transforming and Epidermal Growth Factors, Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5300–5304.
- URL-2. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>, 21 Ekim 2010.
- Vago, C., 1963. A New Type of Insect Virus, Journal of Insect Pathology, 6, 275-276.
- Villarrubia, V.G., Costa L.A. ve Diez R.A., 2004. Secreted Phospholipases A2 (sPLA2): Friends or Foes? Are They Actors in Antibacterial and Anti-HIV Resistance?, 27, 123, 19, 749-57.
- Wall, E.M., Jing, X.C, Nanhai, C.R., Mark, L. ve Buller, C.U., 1997. A Novel Poxvirus Gene and Its Human Homolog Are Similar to an *E. coli* Lysophospholipase, Virus Research 52, 157–167.

- Wegensteiner, R. ve Weiser, J., 1995. A New entomopoxvirus in the Bark Beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae), Journal of Invertebrate Pathology, 65, 203-205.
- Weir, J. P. ve Moss, B., 1984. Regulation of expression and nucleotide sequence of a late vaccinia virus gene, Journal of Virology, 51, 662-669.
- Williams, G. ve Popay, J., Rogers, A., (1998). Rationale and standards for the systematic review of qualitative literature in health services research. Qualitative Health Research. 8(3), 341-351.
- Winter, J., Hall, R. L., Moyer, R. W., 1995. The effect of inhibitors on the growth of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in *Lymantria dispar* (gypsy moth) cells. Virology, 211, 462-473.
- Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi I.R. ve Tijssen, P., 2001. A Viral Phospholipase A2 is Required for Parvovirus Infectivity, Dev. Cell 1, 291-302.

ÖZGEÇMİŞ

İnci CEVHER, 1984 yılında Artvin’de doğdu. İlkokulu Erenköy Köyü İlk Öğretim Okulu’nda, Liseyi Artvin Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde tamamladı. 2003-2008 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde lisans öğrenimini tamamladı. Lisans öğrenimi esnasında 2008 yılında Educational Differenties Between Turkey and European Countries, and Improving New Teaching Methods adlı SOCRATES eğitim projesiyle İsveç Gavle Üniversitesi’nde bulundu. 2008 yılında Biyoloji Öğretmeni ünvanıyla mezun oldu. Mezun olduktan bir yıl sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.