

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜS'E AİT AMV197'NİN  
TRANS-AKTİVASYONU VE KONAK SEÇİCİLİĞİNDEKİ ROLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Duygu BEKİRCAN**

**HAZİRAN 2013  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜS'E AİT AMV197'NİN  
TRANS-AKTİVASYONU VE KONAK SEÇİCİLİĞİNDEKİ ROLÜ**

**Biyolog Duygu BEKİRCAN**

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 23.05.2013  
Tezin Savunma Tarihi : 13.06.2013**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ**

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalında  
Duygu BEKİRCAN tarafından hazırlanan**

**AMSACTA MOOREI ENTOMOPOKSVİRÜS'E AİT AMV197'NİN  
TRANS-AKTİVASYONU VE KONAK SEÇİCİLİĞİNDEKİ ROLÜ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 28/05/2013 gün ve 1507 sayılı kararıyla  
oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ** .....

**Üye : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU** .....

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei* Entomopoks virüs’e ait AMV197’nin Trans-Aktivasyonu ve Konak Seçiciliğindeki Rolü” isimli bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin değerlendirilmesinde, geliştirilmesinde ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan sayın hocalarım Doç. Dr. Remziye NALÇALIOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, ayrıca Doç. Dr. Kazım SEZEN ve Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, tezin hazırlanması sırasında desteklerini esirgemeyen Ardahan ESKİ ve laboratuvar arkadaşlarıma, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakar aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında 8646 kodlu proje aracılığı ile maddi destek sağlayan KTÜ BAP Birimine ve 110T887 kodlu proje aracılığı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Duygu BEKİRCAN

Trabzon 2013

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Amsacta moorei* Entomopoksvirüs’e ait AMV197’nin Trans-Aktivasyonu ve Konak Seçiciliğindeki Rolü” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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. 23/05/2013

Duygu BEKİRCAN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Poksvirüsler.....	3
1.2.1. Poksvirüslerin Sistematigi .....	3
1.2.1.1. Poksviridae Familyasının Özellikleri.....	4
1.2.1.2. Poksvirüslerin Konak Seçiciliği.....	5
1.2.2. Entomopoksvirüsler .....	6
1.2.2.1. Entomopoxvirinae Familyasının Özellikleri.....	7
1.2.3. <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs (AMEV).....	8
1.3. Protein Kinazlar .....	9
1.3.1. Viral Protein Kinazlar .....	10
1.4. <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs Serin/Treonin Protein Kinaz Geni (AMV197).....	10
1.4.1. Protein Kinaz Geni (AMV197) Çıkarılmış Rekombinant Virüs .....	11
1.5. Viral Transaktivator Proteinler .....	11
1.6. Çalışmanın Amacı.....	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	15
2.1. Hücrelerin ve Virüslerin Temini.....	15
2.1.1. Hücrelerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyon Tayini.....	15
2.2. Serin/Treonin Protein Kinazın Trans-Aktivasyonunda Rol Alan Proteinlerin Belirlenmesi .....	16

2.2.1.	Ld652 Hücrelerinin Yaban Tip AMEV ile Enfeksiyonu.....	16
2.2.2.	Toplam Sitoplazmik Protein İzolasyonu.....	17
2.2.3.	Sitoplazmik Proteinlerin SDS-PAGE ile Ağırlıklarına Göre Ayrılması.....	17
2.2.4.	Jeldeki Proteinlerin Membrana Aktarılması .....	18
2.2.5.	Membrandaki Proteinlerin İşaretli Prob ile Hibridizasyonu .....	18
2.3.	2D- Jel Elektroforezi.....	19
2.4.	<i>AmΔpk/gfp</i> Rekombinant Virüsün Konak Spektrumu ve Enfektivitesinin Belirlenmesi .....	22
2.4.1.	Farklı Hücre Kültürlerinin <i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfeksiyonu ve Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi .....	22
2.4.2.	<i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfekte Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Virüs Miktarı.....	22
2.4.3.	Rekombinant Virüsün ( <i>AmΔPK/gfp</i> ) DNA Replikasyon Zamanının Belirlenmesi .....	23
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	Virüslerin Üretilmesi ve Saflaştırılması.....	26
3.2.	Serin/treonin Protein Kinazın Trans-Aktivasyonunda Rol Alan Proteinlerin Belirlenmesi .....	26
3.2.1.	Yaban Tip AMEV ile Enfekte Ld652 Hücrelerinden Toplam Sitoplazmik Protein İzolasyonu .....	26
3.2.2.	South-Western Analizi.....	27
3.3.	2D- Jel Elektroforezi.....	28
3.4.	Farklı Hücre Kültürlerinin <i>AmΔpk/gfp</i> 'nin Replikasyon Özellikleri .....	29
3.4.1.	Farklı Hücre Kültürlerinin <i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfeksiyonu ve Meydana Gelen Sitopatik Etkiler.....	29
3.4.2.	<i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfekte Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Virüs Miktarı.....	37
3.4.2.1.	<i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfekte Ld652 Hücrelerinde Üretilen Virüs Miktarı .....	37
3.4.2.2.	<i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfekte Sf9 Hücrelerinde Üretilen Virüs Miktarı .....	38
3.4.2.3.	<i>AmΔpk/gfp</i> ile Enfekte Bm Hücrelerinde Üretilen Virüs Miktarı.....	39
3.4.3.	Farklı Hücre Kültürlerinde <i>AmΔpk/gfp</i> 'nin DNA Replikasyonu .....	41
4.	TARTIŞMA .....	44
5.	SONUÇLAR.....	48
6.	ÖNERİLER.....	50
7.	KAYNAKLAR .....	51

ÖZGEÇMİŞ

## Yüksek Lisans Tezi

### ÖZET

#### *AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜS'E AİT AMV197'NİN TRANS-AKTİVASYONU VE KONAK SEÇİCİLİĞİNDEKİ ROLÜ

Duygu BEKİRCAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
2013, 55 Sayfa

Daha önce yapılan çalışmalarda *Amsacta moorei* entomopoksvirüs'e ait AMV197 kodlu açık okuma zincirinin serin/treonin protein kinaz (*pk*) kodladığı belirlenmiştir ve virüs genomundaki bu gen yeşil floresan protein geni (*gfp*) ile yer değiştirilerek rekombinant virüs (*AmΔpk/gfp*) oluşturulmuştur. Bu çalışmalara dayanılarak *pk*'ın virüsün replikasyonunda ve gen regülasyonunda rol oynadığı düşünülmüştür. Konak hücrenin ve virüs proteinlerinin virüs replikasyonundaki rolünü anlayabilmek için bu yüksek lisans tezinde protein kinaz (*pk*) geninin trans-aktivasyonunda rol alan proteinlerin belirlenmesi ve rekombinant virüs ve yaban tip virüsün enfeksiyonlarının farklı konaklarda karşılaştırılması hedeflenmiştir. *pk* geninin trans-aktivasyonunda rol oynayan proteinlerin belirlenmesi için South-Western Hibridizasyon deneyi gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda işaretli proba bağlanabilen beş farklı protein bandı (50, 38, 35, 27 ve 16 kDa) belirlendi. Sonuçlar, *pk*'nın trans-aktivasyonunda rol oynayan proteinlerin virüs kökenli değil hücre kökenli olduğunu gösterdi. *pk* geninin virüs genomundan silinmesinin farklı konaklarda replikasyonu nasıl etkilediğini belirlemek için rekombinant virüs ve yaban tip virüsün farklı böcek hücrelerindeki (*Lymantria dispar*, Ld652 (kontrol); *Bombyx mori*, Bm; *Spodoptera frugiperda*, Sf9) DNA replikasyonları Slot – Blot Hibridizasyon yöntemiyle ve enfektivitesi End Point Dilution Assay (EPDA) ile karşılaştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda, konak faktörlerinin *pk* genini kontrol ederek virüs replikasyonunda etkili olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Amsacta moorei* entomopoksvirüs, serin/treonin protein kinaz, transaktivatör proteinler, AMV197, rekombinant virüs



Master Thesis

SUMMARY

TRANS-ACTIVATION OF AMV197 BELONG TO *AMSACTA MOOREI*  
AND ITS ROLE IN THE HOST RANGE OF VIRUS

Duygu BEKİRCAN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Zihni DEMİRBAĞ  
2013, 55 Pages

Previous researches suggest that *Amsacta moorei* entomopoxvirus open reading frame AMV197 encodes a serine/threonine protein kinase, and a recombinant virus (*AmΔpk/gfp*) was created by changing this gene with green fluorescent protein. Based on these studies it is thought that *pk* plays an important role in virus replication and gene regulation. In order to understand the role of *pk* gene in host specificity and virus proteins in the virus replication, I have studied the transactivators of AMV197 and compared wild type and recombinant virus replication in various cell lines. In order to determine proteins that have a role in the transactivation of *pk*, South-western hybridization assay was performed. This study showed that cell proteins (50, 38, 35, 27 ve 16 kDa) play a role in the transactivation of *pk*. In order to determine the role of *pk* in virus replication, wild type and recombinant virus were assayed in different cell lines (*Lymantria dispar*, Ld652 (control); *Bombyx mori*, Bm; *Spodoptera frugiperda*, Sf9) for virus yield and DNA replication. Slot-Blot Hybridization and End Point Dilution Assay (EPDA) showed that host factors play an important role during virus replication.

**Key Words:** *Amsacta moorei* entomopoxvirus, serin/treonin protein kinase, trans-activator proteins, AMV197, recombinant virus

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Poksvirüslere ait genel görünüm .....	4
Şekil 2. Vaksinya virüsün enfeksiyon döngüsü.....	5
Şekil 3. Tipik bir entomopoksvirüs şemantik görünümü .....	7
Şekil 4. Enfekte ve kontrol Ld652 hücrelerinin SDS-PAGE protein profili .....	27
Şekil 5. South-Western Analizi .....	28
Şekil 6. AMEV protein kinaz trans-aktivatörlerinin pH 5-8 arası 2D jel elektroforezi .....	29
Şekil 7. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte olan Ld652 hücreleri .....	31
Şekil 8. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte olan Ld652 hücrelerinde GFP ifadesi .....	32
Şekil 9. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte Sf9 hücreleri .....	33
Şekil 10. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte Sf9 hücrelerinde GFP ifadesi .....	34
Şekil 11. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte Bm hücreleri .....	35
Şekil 12. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte Bm hücrelerinde GFP ifadesi .....	36
Şekil 13. Sf9 ve Bm hücrelerinde üretilen virüslerin Ld652 hücrelerinde GFP ifadesi.....	37
Şekil 14. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> 'nin Ld652 hücrelerinde çoğalma kinetiği .....	38
Şekil 15. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> 'nin Sf9 hücrelerinde çoğalma kinetiği .....	39
Şekil 16. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> 'nin Bm hücrelerinde çoğalma kinetiği .....	40
Şekil 17. Am $\Delta$ sph/ <i>gfp</i> ve Am $\Delta$ pk/ <i>gfp</i> ile enfekte Ld652, Sf ve Bm hücrelerinde virüs üretimi.....	40
Şekil 18. Ld652 hücrelerinde virüs DNA replikasyonu .....	41
Şekil 19. Sf9 hücrelerinde virüs DNA replikasyonu .....	42
Şekil 20. Bm hücrelerinde virüs DNA replikasyonu .....	43

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik özelliği .....	3
Tablo 2. Özel nükleik asit dizisine bağlanan bazı viral transkripsiyonel regülatörler .....	12
Tablo 3. Bazı dizi bağımsız viral transkripsiyonel regülatörler .....	13
Tablo 4. Örnek tamponun hazırlanışı .....	20
Tablo 5. Odaklama koşulları .....	20

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A+T	: Adenin ve Timin Nükleotid
AMEV	: <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs
AMV197	: AMEV'nin 197 Kodlu Açık Okuma Zinciri
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bm	: <i>Bombyx mori</i> 'den Böcek Hücre Kültürü
bp	: Baz Çifti
DIG	: Digoksigenin
DIG-dUTP	: Digoksigenin-dUTP, Digoksigenin İşaretli Deoksi Urasil Trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Çift Zincir DNA
DTT	: Dithiothreitol
EPDA	: Son Nokta Seyreltme Deneyi
EPV	: Entomopoksvirüs
FBS	: Fetal Bovine Serum
GFP	: Yeşil Floresan Protein
<i>gfp</i>	: Yeşil Floresan Protein Kodlayan Gen
ICTV	: Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi
Ld652	: <i>Lymantria dispar</i> 'dan Böcek Hücre Kültürü
MOI	: Hücre Başına Düşen Virüs Miktarı
mRNA	: Mesajcı RNA
ORF	: Açık Okuma Zinciri
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	: Fosfat Tamponu
pH	: H İyon Konsantrasyonu
rpm	: Dakikadaki Dönme Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS İçeren Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Sf9	: <i>Spodoptera frugiperda</i> 'dan Böcek Hücre Kültürü
SSC	: Saline-Sodium Citrate Tampon
<i>AmΔpk/gfp</i>	: Protein Kinaz Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
<i>AmΔsph/gfp</i>	: Sferoidin Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
VV	: Vaksinya Virüs

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Doğada yaşamını sürdüren böceklerin %99,5'inin doğaya ve insana faydalı olduğu ve yaklaşık 1 milyon 300 bin böcek türünün, sadece %0,5'nin doğa ve insana zarar verdiği bilinmektedir (Demirbağ vd., 2008). Böcek virüsleri, çeşitli böceklerden izole edilmiş ve o böceklerde hastalık oluşturan veya böceklerin ölümlerine sebep olan biyolojik varlıklardır (Sezen ve Demirbağ, 2005). Böcek virüslerini, doğaya ve insanlara yaptıkları olumlu ve olumsuz etkilere göre iki açıdan ele almak gerekir. Bu etkilerden bir tanesi, uğur böceği ve bal arıları gibi, insanlara ve çevreye faydalı olan böceklerin, virüsler nedeni ile hastalanıp ölmeleridir. İkinci etki ise, fındık kurdu, ladin kabuk böceği, amerikan beyaz kelebeği gibi, çeşitli tarım ve orman ürünlerini veya insan sağlığını etkileyen zararlı böcekler ile virüsler sayesinde mücadele edilebilmesidir. Böylece, böcek virüsleri tarım ve ormancılıkta zararlı böceklerle mücadelede kullanılan önemli biyolojik mücadele materyali haline gelmiştir (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000; Sezen ve Demirbağ, 2005). Bunun yanında, böcek virüsleri gen ifade vektörü (Anderson vd., 1996; Ciccarone vd., 1997) ve gen terapi vektörü (Merrihew vd., 2001; Stanbridge vd., 2003) olarak kullanılma potansiyeline sahip olduklarından biyoteknolojik bakımdan da büyük öneme sahiptirler.

*Amsacta moorei* entomopoksvirüs (AMEV) Poxviridae familyasına bağlı olan Entomopoxvirinae alt familyasına ait bir böcek virüsüdür. Entomopoksvirüsler (EPV), ilk kez Vago (1963) tarafından keşfedilmişlerdir. Çok sayıdaki böcek takımından (Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera) izole edilmeleri ve bakülovirüs çalışmalarının tamamlanması EPV'lerin mikrobiyal mücadele ajanı olarak kullanılma potansiyelini artırır. Artan *in vitro*, *in vivo* ve moleküler biyoloji çalışmaları nedeni ile EPV'ler çok önem kazanmıştır. EPV'lerin birçok zararlı tür, çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisinekler ile mücadelede biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılması düşünülmektedir. Bu böceklerden hiç bakülovirüs izole edilmemiştir. Biyolojik kontrolde, EPV'lerin bakülovirüslere kıyasla en önemli dezavantajı, konaklarını öldürme sürelerinin uzun olmasıdır. Bu problem, EPV genomuna yabancı genlerin yerleştirilmesi sonucu genetik olarak değiştirilmiş EPV'lerin oluşturulmasıyla aşılabilir. Özellikle, son yıllarda

entomopoksvirüsler biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmaya da başlanmıştır. Örneğin, *Amsacta moorei* entomopoksvirüse (AMEV) ait sferoidin (*sph*) kodlama bölgesi çıkartılıp yerine kloramfenikol asetil transferaz (*cat*) geni yerleştirilmiştir. Daha sonra rekombinant AMEV-cat transfeksiyonu, AMEV ile enfekte olmuş Ld652 hücrelerinde rekombinant proteinin üretimiyle sonuçlanmıştır (King vd., 1998).

AMEV önemli bazı tarım zararlısı böcekleri enfekte edebilen ve hücre kültüründe kolaylıkla büyüeyebilen bir EPV'dir (Goodwin vd., 1990; Hall ve Moyer, 1991; Winter vd., 1995). AMEV genomunda bulunan AMV197 kodlu açık okuma zinciri, serin/treonin protein kinaz bölgesine sahip potansiyel bir protein kinaz (*pk*) genidir. Protein kinazlar, ATP'deki bir fosfatı hedef substrat proteinin serin/treonin veya tirozin aminoasidine taşınmasını sağlayan büyük bir enzim grubudur. Bu enzimler, protein fosfatazlarla birlikte hücrel sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Böylece, AMEV protein kinaz geninin virüs replikasyonu üzerinde önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Genler, faaliyetlerini gerçekleştirmek için, diğer genler tarafından üretilen proteinlere ihtiyaç duyabilir. Ürünleri kullanılan genlerin tespit edilmesi, virüs genomundaki genlerin birbirleriyle görev ilişkisini açıklamak bakımından önemlidir. Serin/treonin protein kinaz ürettiği bilinen AMV197 kodlu ORF, tüm genler gibi başka bazı gen ürünlerinin promotörüne bağlanması sonucunda aktif olarak transkriptlenen bir genidir. Bu proteinler, genellikle transkripsiyonun aktivasyonunu sağladığından ve transkripsiyonunda görev yaptığı gen tarafından değil de başka genler tarafından üretildikleri için, genel anlamda trans-aktivatörler olarak bilinirler.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalarla, daha önceki çalışmalar sonucunda fonksiyonel bir protein kinaz olduğu ileriye sürülen AMV197'nin regülasyonu ve virüsün konak seçiciliğindeki rolü araştırılmıştır.

## 1.2. Poksvirüsler

### 1.2.1. Poksvirüslerin Sistematığı

Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre Poxviridae familyası Entomopoxvirinae ve Chordopoxvirinae olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (URL-1). Omurgalı konaklardan elde edilen izolatlar, Chordopoxvirinae alt familyasına aitken, omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar, Entomopoxvirinae alt familyasına aittir (Murphy vd., 1995) (Tablo 1).

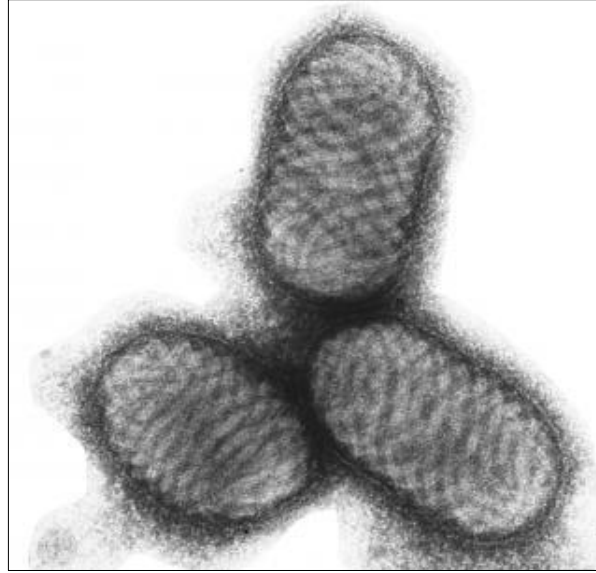
Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik özelliği

Familya		Poxviridae	
Alt Familya		Chordopoxvirinae (Konakları omurgalı)	10 cins
	Cins	Avipoxvirus	10 tür
	Cins	Capripoxvirus	3 tür
	Cins	Cervidpoxvirus	1 tür
	Cins	Leporipoxvirus	4 tür
	Cins	Molluscipoxvirus	1 tür
	Cins	Orthopoxvirus	10 tür
	Cins	Parapoxvirus	4 tür
	Cins	Suipoxvirus	1 tür
	Cins	Yatapoxvirus	2 tür
	Cins	Tanımlanmamış	1 tür
Alt Familya		Entomopoxvirinae (Konakları omurgasız)	3 cins
	Cins	Alphaentomopoxvirus	7 tür
	Cins	Betaentomopoxvirus	13 tür
	Cins	Gammaentomopoxvirus	6 tür
	Cins	Tanımlanmamış	2 cins

### 1.2.1.1. Poksviridae Familyasının Özellikleri

Poksvirüsler, oldukça değişken şekilli, genellikle tubuler veya globuler üniteler içeren lipoprotein yüzey membranına sahip, tuğla biçimli (220-450 nm uzunluk, 140-260 nm genişlik, 140-260 nm kalınlık) veya düzenli spiral filamentlere (10-20 nm çapında) sahip ve ovoid (250-300 nm uzunluk, 160-190 nm çap) yapıdadır (Murphy vd., 1995; Cann, 2005) (Şekil 1).

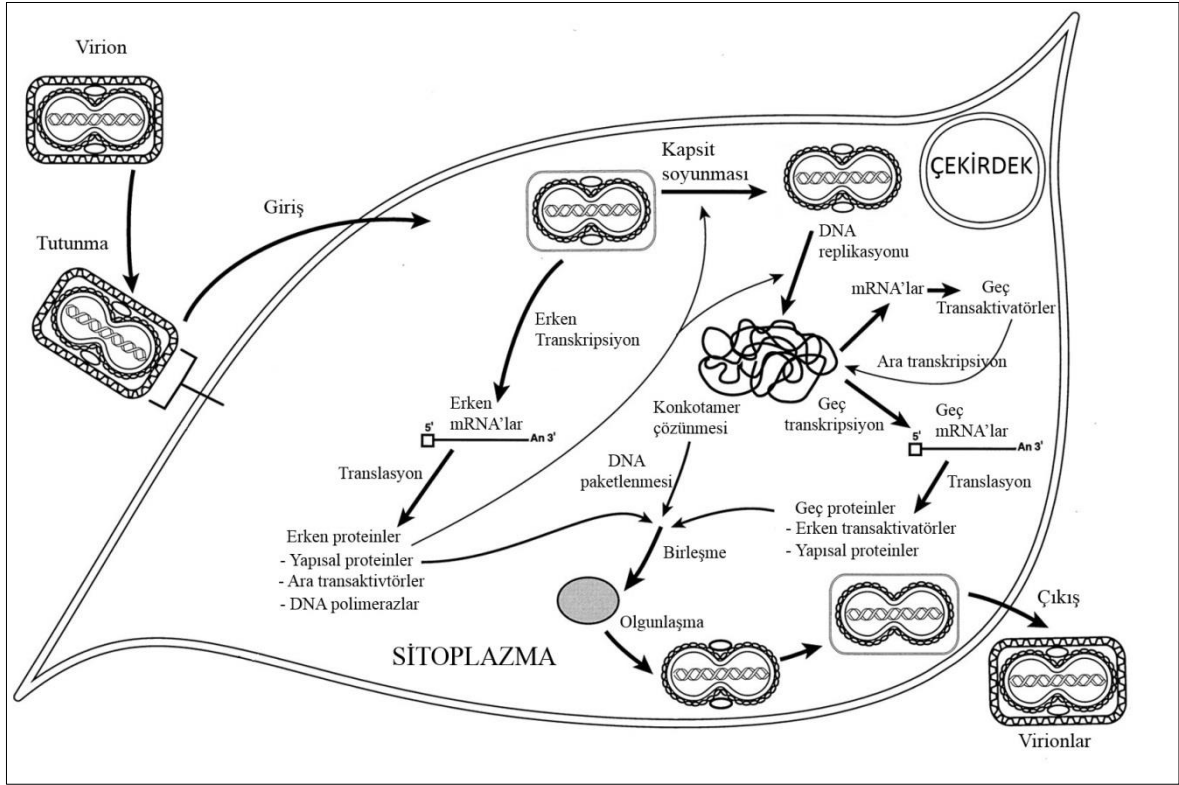
Virion parçacığın ağırlığının yaklaşık % 90'nını proteinler, % 4'nü lipitler, % 3'nü ise karbonhidratlar oluşturur (Murphy vd., 1995).



Şekil 1. Poksvirüslere ait genel görünüm.

Virüsün çoğalması, konak hücre sitoplazmasında meydana gelir ve sonucunda viroplazma veya virüs faktörleri olarak adlandırılan bazofilik (B-tipi) inklüzyonlar oluşur. Genomda, çeşitli promotorlar tarafından yönetilen Açık Okuma Zincir (ORF)'leri mevcuttur. Bu promotorlar, zamana bağlı olarak üç sınıf genin transkripsiyonunu düzenler. *Erken genler*, genomun soyunması öncesinde veya sırasında ifade edilir. Bunlar, yapısal olmayan birçok RNA ve proteini kodlar. *Ara genler*, DNA replikasyonu sırasında ifade edilir ve geç genlerin transkripsiyonunu ayarlar. *Geç genler*, replikasyondan sonra ifade edilir ve birçok viriyon proteinini kodlar (Moss, 1991; Broyles, 2003) (Şekil 2). mRNA'ların, 5' uçları şapkalı, 3' uçları ise poliadenillenmiştir ve intronları yoktur (Murphy vd., 1995).





Şekil 2. Vaksinya virüsün enfeksiyon döngüsü

### 1.2.1.2. Poksvirüslerin Konak Seçiciliği

Poksvirüslerin çoğu türe has seçici olmalarına rağmen, dar bir konak spektrumuna da sahiptirler. Çok az sayıda EPV kültür şartlarında büyümeye adapte olduğu için, *in vitro* replikasyonları hakkında hücresel ve moleküler seviyede çok az şey bilinmektedir. AMEV için iki üretken hücre suşu tespit edilmiştir. Bunlar *E. acraea* (BTI-EAA) hücre suşu (Granados ve Naughton, 1975) ve *L. dispar* (IPLB-Ld652) hücre suşudur (Goodwin vd., 1990). *E. acraea* hücreleri AMEV ile enfekte edildiğinde olgun sferoidler görülmektedir. AMEV'nin *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinde replike olduğu da gösterilmiştir (Aloui vd., 1990). Ayrıca *Bombyx mori* ve *Pseudaletia separata* hücre suşlarının, PsEPV (*Pseudaletia separata* entomopoksvirüs) için üretken oldukları da ispatlanmıştır (Hukuhara vd., 1990).

Werden vd. (2008) tarafından yayınlanan bilgilere göre, konak genleri büyük olasılıkla tüm virüslerde vardır ve viral replikasyon için optimum hücresel şartları oluşturmak için spesifik konak proteinlerinin hedeflenmesi ile iç ortamın düzenlenmesinde rol oynarlar. Ayrıca poksvirüsler büyük ve kompleks bir genoma sahip olduklarından

spesifik bir avantaja sahiptirler. Konak seçicilik genleri farklı bir dizi kinaz, posfataz, apoptozis inhibitörleri ve antiviral yollar gibi hücrel süreçlerle ilişkilidir. Poksvirüslerde konak seçiciliğinde rol oynadığı bilinen proteinlerin çoğu biyokimyasal ve yapısal olarak farklıdır (Johnston ve McFadden, 2003).

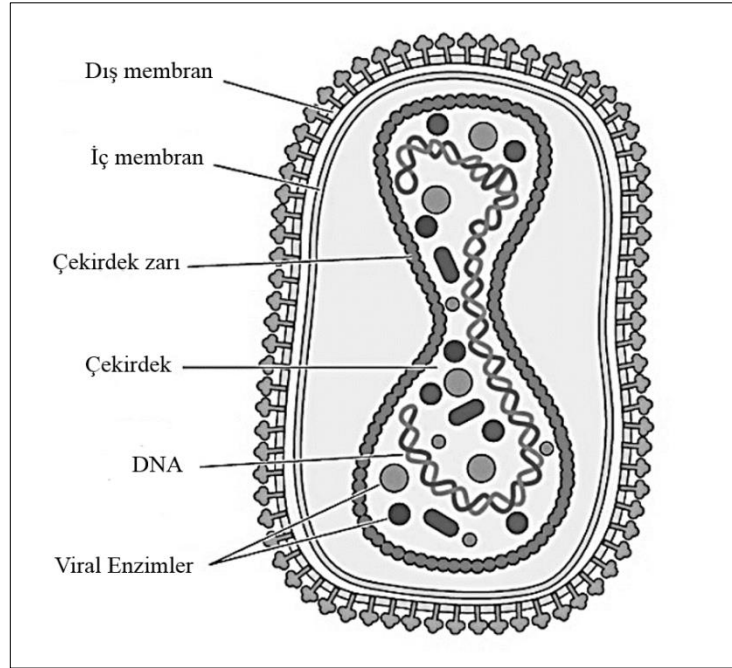
Poksvirüslerin konak seçiciliği ve replikasyonu tam olarak anlaşılmasına rağmen, artan protein protein etkileşim (PPI) çalışmaları ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır. PPI tüm biyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir. Virüs ve konak proteinleri arasındaki etkileşimin belirlenmesi virüs replikasyonu ve konak seçiciliği konularının aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır (Vilient vd., 2009). Örneğin, vaksinya virüslerinde yapılan PPI etkileşim çalışmalarında konak hücreye tutunmayı sağlayan A34 ve A33'ün membran glikoproteini olan B5 ile etkileşim halinde olduğu bulunmuştur.

### 1.2.2. Entomopoksvirüsler

Entomopoksvirüsler (EPV) ilk kez böcekler için özel yeni bir virüs grubu olarak Vago tarafından keşfedilmişlerdir (Vago, 1963). EPV'ler zirai bakımdan oldukça zararlı olan böceklerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Arif, 1984). Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV), poksvirüsleri Tablo 1'de gösterildiği gibi Chordopoxvirinae (Omurgalıları enfekte eden poksvirüsler) ve Entomopoxvirinae (Böcekleri enfekte eden poksvirüsler) olmak üzere iki alt familyaya ayırmıştır (Moss, 2001). Entomopoxvirinae virüs morfolojisi, konak türü ve genom hacmi bakımından 4 cinse ayrılır. Her bir cins, bir tip türle temsil edilmekte ve Alphaentomopoxvirusler Coleoptera grubu (*Melolontha melolontha* EPV), Betaentomopoxvirusler Lepidoptera grubu (*Amsacta moorei* EPV) ve Orthoptera grubu (*Melanoplus sanguinipes* EPV), Gammaentomopoxvirusler Diptera grubu (*Chironomus luridis* EPV) (Arif ve Kurstak, 1991; Goodwin vd., 1991; Moyer, 1999) böcekleri enfekte eden virüsleri kapsarken, bazı virüsleri kapsayan tanımlanmamış bir başka Entomopoxvirinae cinsi de bulunmaktadır.

### 1.2.2.1. Entomopoxvirinae Familyasının Özellikleri

Entomopoksvirüs virionları oval şekilli 150-470 nm uzunluğunda ve 165-300 nm genişliğindedir (Arif, 1995). Şekil 3'te tipik bir entomopoksvirüs şematik olarak görülmektedir. Entomopoksvirüs virionları morfolojik olarak omurgalı poksvirüslerine benzerlik gösterir. DNA genomu virionun merkezinde bulunur. Entomopoksvirüsler konak böceğin yağ dokusu hücrelerinde, bazen de hemositlerde çoğalırlar (Lipa, 1975).



Şekil 3. Tipik bir Entomopoksvirüsün şematik görünümü

EPV ile enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmasında büyük oval şekilli sferoidler oluşur ve bunlar EPV'ler için en önemli karakteristik yapılarıdır. Sferoidler, 5-20  $\mu\text{m}$  boyunda ve orijinal olarak "sferule" olarak adlandırılır. Ultra yapısal çalışmalar sferoidlerin parakristal bir ağ içine gömülü virüsleri içeren elektronca yoğun yapılar olduğunu göstermiştir (Arif vd., 1991). Moleküler ağırlığı yaklaşık 110-115 kDa olarak bilinen sferoidin proteininden oluşur (Bilimoria ve Arif, 1979). Entomopoksvirüslerin oluşturduğu sferoid yapıları Giemsa ve Buffalo Black 12 B gibi basit boyama yöntemleriyle ışık mikroskopunda kolayca ayırt edilebilirler.

Spindıllar alfaentomopoksvirüsler ve bazı Lepidoptera grubu üyelerin EPV'leri ile enfekte olmuş hücrelerinin sitoplazmalarında ikinci bir protein yapı olarak bulunurlar. Bu yapılar şu ana kadar hiçbir Orthoptera veya Diptera konakta gözlenmemiştir. Spindıllar 1-15 µm boyunda, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında veya bir sferoid içinde virüs partikülleriyle beraber görülebilirler. Fusolin proteini tarafından oluşturulan bu yapılar sferoidlerden çok farklıdır ve ilk olarak Bergoin ve arkadaşları (1970) tarafından çalışılmıştır. Spindıllar bilateral simetriye sahiptirler, bu özellik onları kolayca sferoidlerden ayırmayı sağlar. Sferoidlerden diğer bir önemli farkı ise spindılların virionlara sahip olmamasıdır.

Böcek gruplarını enfekte eden virüsler arasında yapısal farklılıklar olmasına rağmen, EPV'ler, orthopoksvirüslere benzer yapısal özelliklere sahiptirler ve omurgalı poksvirüs gen homologileri gösterdikleri bulunmuştur (Bawden vd., 2000). Bu homologiler sayesinde, iki grup arasında, gen regülasyonunda benzerliklerin olması da mümkündür. Bu virüslerin çoğunluğunu moleküler seviyede anlamak için, *Amsacta moorei* EPV (AMEV) üzerinde yapılan çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Çünkü, AMEV, hücre kültüründe replike olabilen sadece birkaç EPV'den biridir (Langridge, 1983; Goodwin vd., 1990).

### **1.2.3. *Amsacta moorei* Entomopoksvirüs (AMEV)**

*Amsacta moorei* entomopoksvirüs (AMEV) hücre kültüründe rahatça üretilebilen ve çalışılabilen bir entomopoksvirüstür ve doğal olarak *Amsacta moorei*'den izole edilmiştir (Becker vd., 2008). Ayrıca, *Estigmene acrea* (Hall ve Hink, 1990) ve *Lymantria dispar* (Arif ve Moyer, 1984) gibi tarımsal bakımdan zararlı böcekleri enfekte ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca bu avantajından dolayı entomopoksvirüs cins B grubunun temsilcisidir.

AMEV'nin 232,392 bp'lik genomunun dizisi tamamen belirlenmiştir (Bawden vd., 2000) ve biyoinformatik analizine göre 292 benzersiz açık okuma zinciri (ORF) bulunduğu ortaya konulmuştur. Daha sonra, yapılan biyoinformatik analizlere göre yapılan bir çalışmada, AMEV ORF'lerinden 38 tanesinin protein kodlamadığı belirlenmiştir (Guo ve Yu, 2007) ve protein kodlayan ORF sayısı 254 olarak son halini almıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, AMEV genomunun adenin ve timin (A+T) içeriği %81.5 olarak tahmin edilmiştir (Langridge, 1983). Belirlenen dizinin A+T içeriğinin yeniden hesaplanması sonucunda, bu oran %82.2'ye yükselmiş ve böylece, AMEV

poksvirüsler içinde en yüksek A+T oranına sahip virüs olarak belirlenmiştir (Bawden vd., 2000).

Diğer poksvirüslerde bulunanlara benzer olarak AMEV, gen ifadesini sağlayan promotor bölgelerine sahiptir. AMEV genlerinden 133 tanesinin, erken veya potansiyel olarak erken gen olabileceği düşünülmektedir. Diğer genlerden, 158 tanesi ise, geç veya potansiyel geç gen motifine sahiptir. Genomu oluşturan 179 genden sadece 15'i için, promotor veya düzenleyici elemanlar tanımlanamamıştır. Translasyonel başlangıç kodonunun 100 bp yukarısında TGAAAXXXXA veya TGAATXXXXXA sıralarını içeren genler, erken (E) veya potansiyel erken genler (E?) olarak tanımlanır (Bawden vd., 2000). Ayrıca, genin 3' ucuna yakın bir yerde vaksinya virüs (VV) erken terminasyon dizisine (TTTTTNT) sahip olan genler, erken grubu gen olmaya adaydır (Yuen ve Moss, 1987; Gruidl vd., 1992; Sriskantha vd., 1997). Translasyonel başlangıç dizisinde TAAATG sırasını taşıyan AMEV ORF'leri, geç genler (L) olarak düşünülür (Weir ve Moss, 1984; Rosel ve Moss, 1985; Bertholet vd., 1986; Davison ve Moss, 1989). Bu geç promotor sırası, *siferoidin* gibi diğer EPV geç genlerinde gözlenmiştir (Hall vd., 1996). Başlangıç kodonundan 100 bp kadar yukarıda TAAAT veya TAAAAT sırasına sahip olan genler ise potansiyel geç genler olarak düşünülmektedir. Bu diziler, diğer omurgalı poksvirüs geç genlerinde de bulunmuştur (Roseman ve Hruby, 1987).

### 1.3. Protein Kinazlar

Protein kinazlar ATP'deki bir fosfatı hedef substrat proteinin serin, treonin veya tirozin aminoasidine fosforilasyon yolu ile aktarılmasını sağlayan büyük bir enzim grubudur. Bu enzim grubu hücrel sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, hücre-virüs etkileşiminde, virüs replikasyonunda rol oynar. Saflaştırılan ilk protein kinaz, fosforilaz kinazdır (Krebs vd., 1959) ve daha sonra yapılan çalışmalar ile farklı protein kinazlar saflaştırılmıştır. Bilinen protein kinazların sayısındaki bu artış, gen klonlaması ve dizi analiz tekniklerinin avantajı sayesinde meydana gelmiştir. Bu sayede, proteine ait nükleotid dizilerinden aminoasit dizileri elde edilir. Eğer, bu sıralarda protein kinaz katalitik bölgeleri için yüksek bir şekilde korunmuş belirli anahtar diziler mevcutsa, bu proteinin protein kinazları temsil ettiği düşünülür.

### 1.3.1. Viral Protein Kinazlar

Herpesvirüsler, poksvirüsler ve bakülovirüsler gibi büyük DNA vürüsleri serin/treonin veya tirozin protein kinazlarla (pk) ilişkili proteinleri kodlarlar. Viral protein kinazlar ilk kez 1970'lerde çalışılmış ve en iyi karakterize edilmiş viral tirozin kinaz onkojenik tirozin kinazdır.

Tüm herpesvirüsler (HSV) serin/treonin protein kinaz kodlar. HSV'de UL13 ve US3 olmak üzere iki tip korunmuş serin/treonin protein kinaz tanımlanmıştır. Herpesvirüslerde protein kinazlar otoposforilasyon, zar birleşmesi, virüs replikasyonu ve gen ifadesinde görevlidirler (Jacob, 2011).

Bakülovirüslerde, tüm genomda tek bir protein kinaz (*pk1*) geni bulunmaktadır. Bu kinazın virüsün konağa girişi sırasında viriyondan viral DNA'nın serbest kalması için önemli olduğu, polihedrin ve P10 promotörü gibi geç promotörlerde transkripsiyonu düzenlemek için gerekli olduğu düşünülmektedir (Jacob vd, 2011).

Poksvirüslerin tümü serin/treonin protein kinaz kodlar. Vaksinya virüsler, B1 kinaz ve F10 kinaz olmak üzere iki tip protein kinaza sahiptirler. B1 kinaz DNA replikasyonu, gen ekspresyonu ve ara viral protein üretiminde görevlidir. F10 kinaz ise DNA replikasyonu ve gen ekspresyonu için hayati önem taşımazken virion morfogenezisi için önemlidir. F10 ikili seçici kinaz olarak karakterize edilir ve B1 kinazdan farklı olarak hem serin/treonini hemde tirozin aminoasidini fosforiller (Jacob vd, 2011).

### 1.4. *Amsacta moorei* Entomopoksvirüs Serin/Treonin Protein Kinaz Geni (AMV197)

Biyoinformatik analizler, AMEV genomunda bulunan, 900 nükleotid ve 299 aminoasit büyüklüğünde olan AMV197 kodlu açık okuma zincirinin (ORF), bir serin/treonin protein kinaz kodlayabileceğini göstermektedir. Bu bilgi, AMV197'ye ait nükleotid ve aminoasit sıralarının incelenmesi sırasında, protein kinazlara ait korunmuş sıraların ve domainlerin tespit edilmesiyle belirlenmiştir (Bawden vd., 2000)

#### 1.4.1. Protein Kinaz Geni (AMV197) Çıkarılmış Rekombinant Virüs

Daha önce yapılan bir çalışmada AMV197 geni virüs genomundan silindi yerine bir işaret geni (Green fluorescent protein, GFP) homolog rekombinasyon ile yerleştirildi. *AmΔpk/gfp*'nin enfektivitesinin, yaban tip virüse göre yaklaşık %61 oranında azaldığı ve viral DNA replikasyonunun yaban tip virüse göre, yaklaşık 6 saat daha erken meydana geldiği tespit edildi. Yaban tip virüste AMV197 kodlu genin transkripsiyon analizi yapıldı ve genin transkripsiyonunun Ld652 hücre kültüründe enfeksiyonu takip eden 2. ve 4. saatler arasında başladığı, enfeksiyondan sonraki 7. saatte, yoğunlaştığı ve daha sonra azalarak devam ettiği belirlendi.

Oluşturulan rekombinant virüsün konsantrasyonu, yaban tip ve *AmΔshp/gfp* virüs ile karşılaştırıldı. Yaban tip virüs ile *AmΔshp/gfp* virüsün konsantrasyonu arasında fark belirlendi. Ancak, bu durumun gerçekte doğru olmadığı, yapılan çalışmalarda *AmΔshp/gfp* virüsün, yaban tip (AMEV) virüse göre herhangi bir enfektivite farkı sergilemediği belirlenmiştir (Palmer vd., 1995). Bu çalışmada elde edilen bu yüksek değer, GFP'den dolayı daha hassas ölçme yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumda kontrol olarak kullanılan virüslerden *AmΔshp/gfp* ile yapılan testin daha güvenilir olma ihtimali göz önünde bulundurulduğunda, *AmΔpk/gfp*'nin enfektivitesinin, kontrol virüse göre azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuca göre, *pk* geni virüs replikasyonu için zorunlu olmamakla birlikte, bu genin genomdan silinmesi durumunda, virüsün enfektivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Muratoğlu 2011).

#### 1.5. Viral Trans-Aktivatör Proteinler

Proteinler, genellikle transkripsiyonun aktivasyonunu sağlarlar ve transkripsiyonunda görev yaptığı gen tarafından değil de başka genler tarafından üretildiklerinden genel anlamda trans-aktivatörler olarak bilinirler.

Retrovirüsler gibi RNA genomlu virüsler enfeksiyondan sonra RNA genomunu DNA'ya dönüştürür ve genlerin transkripsiyonu için hücrel RNA polimerazı kullanırlar. Promotor ile birlikte başlangıç kompleksinin oluşması için hücrel transkripsiyon faktörlerine, ko-aktivatörlere ihtiyaç duyarlar. Bu faktörler transkripsiyonu uyarır ve düzenler. Ayrıca DNA virüsleri ve kompleks retrovirüsler kendi düzenleyici proteinlerini kodlarlar ki bu düzenleyici proteinler hücrel faktörlerin aktivitelerini ayarlar. Viral

proteinler viral transkripsiyonun uyarılmasına hizmet ederler ve transkripsiyon sürecinde birden fazla aşamada görevlidirler. Viral faktörler başlangıç kompleksinin kararlılığında, uzamasında, promotorun uyarılmasında görevlidir. Transkripsiyon düzenleyici proteinleri yani transaktivatörler DNA'ya direkt bağlanırlar. Bazı viral transkripsiyon faktörleri özel bir DNA dizisini tanıyıp ve bağlanır (Tablo 2). Bazı viral düzenleyici proteinler diziyeye özel bir şekilde DNA'ya bağlanmazlar ve diğer proteinler ile etkileşerek transkripsiyonu etkilerler (Tablo 3).

Tablo 2. Özel nükleik asit dizisine bağlanan bazı viral transkripsiyonel regülatörler

Virüs	Protein	Görev ve Fonksiyonu
Papovavirüs BPV-1	E2	Domain organizasyonu, enhansır bağlayıcı protein olarak bazı BDV-1 den transkripsiyonun uyarılması, in vivo DNA replikasyonu
Adenovirüs Ad2/5	IVa2	Enfeksiyonun geç fazı boyunca transkripsiyonu uyarmak için geç promotorlara bağlanır.
Herpesvirüs HSV-1	ICP4	Erken ve geç promotorlardan transkripsiyonu uyarır, hücreSEL transkripsiyon faktörlerine bağlanır.
EBV	BZLF-1	Erken gen transkripsiyonunu aktifleştirir, otoregülatör olarak görev yapar.
Bakülovirüs AcNPV	IE-1	Erken promotordan transkripsiyonu uyarır,enhansır elementlerine bağlanır.
Poksvirüs Vaksinya	VETF	TA ca zengin erken promotor sekansına bağlanır, viral RNA polimeraz ile erken promotordan transkripsiyon için gereklidir.
Retrovirüs HIV-1	Tat	Viral transkripsiyonu uyarmak için HIV-1'de spesifik RNA sekansına bağlanır, enfekte olmuş hücrelerde etkili viral gen ekspresyonu için gereklidir.



Tablo 3. Bazı dizi bağımsız viral transkripsiyonel regülatörler

Virüs	Protein	Görev ve Fonksiyonu
Papovavirüs SV40	Büyük T antijeni	Viral geç transkripsiyonu uyarır, çoklu hücrel transkripsiyon faktörlerine bağlanabilir
Adenovirüs Ad2/5	12S (243R) E1A protein	Hareketsiz konak hücrede viral replikasyon için gerekli, hücrel ko-aktivator p300 e bağlanır
	13S (289R) E1A protein	Viral erken gen transkripsiyonunda gerekli, birçok hücrel transkripsiyon faktörüne bağlanır
Herpesvirüs HSV-1	VP16 (ICP25, $\alpha$ -TIF)	Hücrel proteinlerin etkileşimi ile seçici promotörlere bağlanır
Retrovirüs HTLV-1	Tax	Öncü virüslerin ve spesifik hücrel genlerin transkripsiyonunu uyarır, çekirdek translokasyonunu uyarır, pol III ile transkripsiyonu uyarır.
Hepadnavirüs HBV	X protein	Hücrel pol II ve birçok viral promotörlardan transkripsiyonu uyarır

Transkripsiyonu düzenlemek için hücrel proteinler ile temas halinde olan üç tane viral trans-aktivatör ayrıntılı araştırılmış. Bunlardan Adenovirüs EA1 proteini en geniş çalışılan gruptur ve RNA pol II yada III ile transkriptlenen genlerin aktivitesini düzenler. Trans-aktivatörlerin hareket mekanizmasının anlaşılması açısından en iyi çalışılan HSV1 VP16 dir. Üçüncüsü ise insan T hücreli lösemi hücreli Tax proteindir.

## 1.6. Çalışmanın Amacı

Konak hücrenin, *Amsacta moorei* entomopoksvirüs (AMEV)'ün replikasyonundaki rolünü anlayabilmek için bu yüksek lisans tezinde protein kinaz (*pk*) geninin trans-aktivasyonunda rol alan proteinlerin belirlenmesi ve rekombinant virüs ve yaban tip virüsün enfeksiyonlarının farklı konaklarda karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Bu hedef doğrultusunda, protein kinaz geninin trans-aktivasyonunda rol oynayan proteinlerin belirlenmesi için South-Western çalışmaları yürütülmüştür. Çeşitli konak hücrelerde virüs replikasyonunun karşılaştırılması için daha önceki çalışmalarda oluşturulan *pk* (AMV197) delesyonlu virüs (*AmΔpk/gfp*) ile yaban tip virüs arasındaki DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyon yöntemiyle ve yavru virüs üretimi farklılıkları, End Point Dilution Assay (EPDA) ile araştırılmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Hücrelerin ve Virüslerin Temini

Bu çalışmada kullanılan *Lymantria dispar* böceğinden geliştirilmiş Ld652 hücre kültürü (%45 Ex-cell 420, %45 Grace's Insect Medium, %10 FBS), Dr. Basil Arif'ten (Centre of Forestry, Molecular Virology Laboratory, Sault Ste. Marie, Canada) temin edilmiştir. Ayrıca rekombinant virüsün konak yelpazesini belirlemek amacı ile laboratuvarımızda bulunan *Spodoptera frugiperda* böceğinden geliştirilmiş Sf9 hücre kültürü (TNMFH, %10 FBS) ve *Bombyx mori* böceğinden geliştirilmiş Bm hücre kültürü (TNMFH, %10 FBS) kullanıldı. Sferoidin proteini yerine, 28 kDa'luk GFP proteini üreten ve rekombinant olmasına rağmen yaban tip virüsün replikasyon özelliklerini gösteren Am $\Delta$ shp/*gfp* (Palmer vd., 1995), Dr. Richard Moyer'den (Florida University, School of Medicine, Department of Molecular Genetics and Microbiology, Gainesville, FL, USA) sağlandı. Am $\Delta$ pk/*gfp* Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'dan (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı) sağlandı. Her bir hücre tipi, kendine özel besiyerinde ve 28 °C'lik etüvde büyütülerek, virüs enfeksiyon çalışmaları için hazır hale getirildi. Hücrelerin pasajlanması işlemi haftada iki kez gerçekleştirildi. Böylece, çalışmada kullanılan hücrelerin sürekli üretimi sağlanmış oldu.

#### 2.1.1. Virüslerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Tayini

Virüs çoğaltma işlemi için, konak olarak Ld652 hücre kültürü kullanıldı. Önceki çalışmalarda AMEV'nin bu böcek hücre kültüründe çoğaldığı gösterilmiştir (Goodwin vd., 1990). Hücreler Am $\Delta$ shp/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile hücre kültürü kaplarında (25 cm<sup>2</sup> lik flasklar) ayrı ayrı enfekte edildi. Enfekte edilmiş hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. 800 g'de 10 dk santrifüj yapılarak virüs süspansiyonu elde edildi. Elde edilen her bir virüse ait süspansiyondaki virüsün konsantrasyonu, 60 gözlü hücre kültürü kapları (Terasaki kapları; Greiner) 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, 1. tüpten başlanarak 9. tüpe kadar büyüme besiyerisi içerisinde 1/10 oranında

seyreltildi. 10. tüp, kontrol olarak kullanıldı ve bu tüpe sadece besiyeri koyuldu. Bu arada  $1,5-2 \times 10^6$  hücre/ml olarak süspansiyon haline getirilen Ld652 hücrelerinden, 10 tüpün her birine 90 µl eklendi ve iyice karıştırıldı. 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 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyon belirtileri netleşinceye kadar yaklaşık 4-5 gün 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).

## **2.2. Serin/Treonin Protein Kinazın Trans-Aktivasyonunda Rol Alan Proteinlerin Belirlenmesi**

### **2.2.1. Ld652 Hücrelerinin Yaban Tip AMEV ile Enfeksiyonu**

Enfeksiyon işlemi için, 20 adet T-75 hacimli flaske  $1 \times 10^7$  olacak şekilde Ld652 hücresi içeren 10 ml besiyeri bırakıldı. Yaklaşık 2 saat hücrelerin kabın tabanına tutunması beklendikten sonra hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı. Besiyeri uzaklaştırılan flasklerin 15 tanesi, toplam 2 ml büyüme besiyerinde MOI=10 olacak şekilde ayarlanan AMEV süspansiyonuyla enfekte edildi. Diğer 5 flaskdeki hücrelerin üzerine ise yalnızca 2 ml büyüme besiyeri bırakıldı. Bu son flasklerdeki hücreler, yalnız Ld652 proteinlerinin izolasyonu için kontrol olarak kullanılmak üzere hazırlandı. Virüslerin hücreye tutunması için, virüs-hücre-besiyeri ve kontrol hücre-besiyeri içeren flaskler 2 saat 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri

uzaklaştırıldı ve hücreler FBS içermeyen besiyeriyle yıkanarak tutunmayan virüslerin deney ortamından uzaklaştırılması sağlandı. Virüslerin üzerine 8 ml taze besiyeri eklendi ve flaskler 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 4., 24. ve 48. saatlerde AMEV ile enfekte olan hücreler, 4. saatte ise kontrol hücreler toplandı ve bunlardan toplam sitoplazmik protein izolasyonu işlemine geçildi.

### **2.2.2. Toplam Sitoplazmik Protein İzolasyonu**

Toplam sitoplazmik protein izolasyonu işlemi için, 'ProteoJET Sitoplazmik ve Nükleer Protein Ekstraksiyon kiti (Fermentas)' kullanıldı. İzolasyon işlemi için, inkübasyon süresinin sonunda, kontrol ve yaban tip AMEV ile enfekte edilen Ld652 hücrelerinin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Tabandaki hücreler, 10 ml 1xPBS (pH 7,4) yardımıyla toplandı ve 250xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Bu aşamadan sonraki bütün işlemler soğuk solüsyonlar kullanılarak ve buz içinde yapıldı. Elde edilen çökelti, üzerine hacminin 10 katı kadar hücre parçalama tamponu (0,1 M Dithiothreitol (DTT) içerir) ilave edilerek 10 saniye vortekslendi. Sonrasında, 10 dakika buzda bekletme ve tekrar vorteksleme işleminden sonra, 500xg'de 7 dakika 4 °C'de bir santrifügasyon daha yapıldı. Sitoplazmik proteinleri içerdiği düşünülen üst sıvı temiz bir tüpe alındı ve son kez, 20.000xg'de 15 dakika 4 °C'de santrifügasyona tabi tutuldu. Sitoplazmik proteinleri içeren yeni üst sıvı, tekrar temiz bir tüpe alındı ve konsantrasyonlarını ölçmek için ayrılan kısmı hariç, küçük hacimlere bölünerek kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı. Bu işlem, hem kontrol hem de yaban tip AMEV ile enfekte edilen Ld652 hücreleri için yapıldı.

### **2.2.3. Sitoplazmik Proteinlerin SDS-PAGE ile Ağırlıklarına Göre Ayrılması**

Elde edilen toplam sitoplazmik proteinlerin konsantrasyonları, Bradford metoduna (1976) göre, spektrofotometre yardımıyla OD<sub>595</sub> nm'de belirlendi. İki kopya halinde hazırlanan kontrol ve AMEV ile enfekte hücrelerden elde edilen toplam sitoplazmik proteinler, ısıtıcı blokta 5 dakika kaynatıldıktan sonra, hazırlanan %12'lik SDS-PAGE jelindeki kuyulara 30 µg olacak şekilde yüklendi. Yürütme işlemi, 30 mA'lık akım altında ve önceden boyanmış protein marker (Thermo) eşliğinde uygulandı. Yürütülen jelin bir kopyası, "Coomassie Brilliant Blue (R-250)" boyama yöntemine göre boyandı. Jelin diğer

kopyasındaki proteinler, elektroblotlama işlemi sayesinde PVDF transfer membrana (Immobilien-P, Millipore) aktarıldı.

#### **2.2.4. Jeldeki Proteinlerin Membrana Aktarılması**

Kontrol ve AMEV ile enfekte hücrelerden izole edilip, SDS-PAGE jelinin iki kopyası üzerinde ağırlıklarına göre ayrılan toplam sitoplazmik proteinlerin tek kopyasının membrana aktarılması için, elektroblotlama cihazı, elektroblotlama tamponu (48 mM Tris, 39 mM glisin, % 0,0375 SDS) ve metanol kullanıldı. Jel büyüklüğüne göre kesilen 4 adet filtre kağıdı (Whatman) 20 ml metanol ile ve PVDF membran metanol içine eklenen 80 ml blotlama solüsyonu ile ıslatıldı. Islatılan 2 adet filtre kağıdı, membran, jel ve tekrar 2 adet filtre kağıdı sırasıyla blotlama cihazına yerleştirildi. Kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağına bağlanan cihaz, 40 mA akım altında, jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için, 1 saat çalıştırıldı. Bir saatin sonunda cihazdan çıkarılan jel, denatürasyon ve renatürasyon işlemlerinden sonra hibridizasyona maruz bırakıldı.

#### **2.2.5. Membrandaki Proteinlerin İşaretli Prob ile Hibridizasyonu**

Çalışmanın bazı kısımlarında, DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) içeriğindeki bazı solüsyonlar (Anti-DIG, DIG-dUTP, bloklama tozu vs.) kullanıldı. Hibridizasyon işlemi için prob seçimi sırasında, daha önce yapılan çalışmalara göre elde edilen bilgiler kullanıldı. Bunlara göre, AMV197 ATG'sinden 154 baz yukarıdan başlayan ve AMV197 ATG'sini de içeren 157 bp'lik sıra (tataatattaactaaaaataatattact attagtagtatataataatcatttattattatataataatataattgaaaatttataaaataatttaataataataaaaaataatatttg atataatataataataattaataaaatg), bu çalışmada kullanılmak üzere IDT şirketine (Rafigen Ticaret, İstanbul) prob olarak sentez ettirildi. Temin edilen prob, uygun şekilde sulandırıldı ve DIG-dUTP ile işaretlenmek üzere ayrıldı. Eppendorf tüp içerisindeki prob DNA'sının denatürasyonu, kaynamakta olan suda 10 dakika bekletilerek sağlandı. Tüp hemen buz üzerine alınarak DNA'nın kendi içinde yeniden şekillenmesi engellendi. Soğutulan DNA'ya 1/5 oranında işaretli dUTP ilave edildi ve karıştırıldı. Bu karışım, işaretleme işleminin tamamlanması için, 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, karışım 65 °C'de 10 dakika bekletildi ve reaksiyon durduruldu. Hazırlanan prob, kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Kontrol ve AMEV ile enfekte hücrelerden izole edilen sitoplazmik proteinlerin geçirildiği membran, PBS ile hazırlanmış 6 M guanidinium hidroklor solüsyonu içinde 20 dakika bekletilerek membrandaki proteinler denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra, membran 3 M, 1,5 M, 0,75 M, 0,37 M ve 0,16 M guanidinium hidroklor solüsyon serilerinde 20'şer dakika bekletilerek membrandaki proteinlerin renatürasyonu sağlandı. Renatürasyon işleminden sonra membran, % 5 yağsız süt tozu içeren PBS'de bir gece bekletildi. Sabah, membran % 0,5 yağsız süt tozu içeren PBS ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra hibridizasyona hazır hale getirilen membran, 0,1 M maleik asit, 0,15 M NaCl ve %1'lik bloklama tozundan oluşan (pH 7,5) süspansiyona ilave edilen 5 µL işaretli probdan oluşan karışım içinde gece boyu sallanır durumda bırakıldı. Sabah sallayıcıdan alınan membran, yine % 0,5 yağsız süt tozu ve % 0,3 tween-20 içeren PBS'de yıkandı. Yıkanan membran, oda sıcaklığında 1 saat % 0,5 yağsız süt tozu içeren PBS'de sulandırılan anti-DIG (vial 4) ile inkübe edilerek hibridizasyon tamamlandı. Membran, bağlanmayan anti-DIG'in uzaklaştırılması için, 3 kez 10'ar dakika %0,3 tween-20 içeren PBS ile yıkandı. Yıkanan membran, 10 ml renk solüsyonunda (0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ve vial 5) renk oluşuncaya kadar 15-20 dakika bekletildi.

### 2.3. 2D- Jel Elektroforezi

Büyüklüğü tespit edilen proteinlerin izoelektrik noktaları 2D-Jel elektroforezi ile tespit edildi. 2D-Jel elektroforezi iki basamaklı bir işlem olup ilk basamakta proteinlerin izoelektrik noktalarına göre şerit jel üzerinde yerleşmesi sağlandı. İkinci basamakta ise şerit jel SDS-PAGE jelin üzerine bırakıldı ve izoelektrik noktalarına göre belli noktalara yerleşmiş proteinlerin bu kez ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı.

ProteoJET Sitoplazmik ve Nükleer Protein Ekstraksiyon kiti' (Fermentas) kullanılarak hem yaban tip hemde Ld652 hücrelerinden daha önceden anlatıldığı gibi 4. saatte izole edilen stoplazmik proteinler kullanıldı. Üç farklı pH aralığında şerit jeller seçildi.

3-6, 5-8, 7-10 pH aralıklarında (Bio-Rad Ready Strip-IPTG Strip) 11cm'lik şerit jeller kullanıldı. İki aşamada proteinlerin izoelektrik noktasına odaklama işlemi gerçekleştirildi. Birinci aşamada rehidrasyon işlemi yapıldı. Rehidrasyon için Tablo 4'de ki örnek tamponlar kullanıldı. İzole edilen stoplazmik proteinler uygun örnek tamponu içerisinde süspanse edildikten sonra (150µl protein örneği + 50µl örnek boya) odaklama

kızağına yüklendi kızaktaki protein numunesinin üzerine hazır olarak temin edilen şerit jel (11cm; BioRad) hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı ve üzeri tamamen mineral yağ ile kapatıldı. Bu şekilde hazırlanan kızak fokuslama cihazına yerleştirildi ve 50 V'da 20 °C de yaklaşık 16 saat aktif rehidrasyona maruz bırakıldı. Rehidrasyon işlemi her üç pH aralığı içinde aynı şartlarda gerçekteştirildi.

Tablo 4. Örnek Tampon Hazırlanışı

Örnek Tampon	
pH3-6	8M üre, 2%CHAPS, 50mM DTT, 0.2% 3/10 ampholyte, 0.001 Bromophenol Blue
pH5-8	8M üre, 2%CHAPS, 50mM DTT, 0.2% 3/10 ampholyte, 0.001 Bromophenol Blue
pH7-10	8M üre, 2%CHAPS, 50mM DTT, 0.2% 7/10 ampholyte, 0.001 Bromophenol Blue

16 saatin sonunda kızak fokuslama cihazından alındı ve şerit jelin her iki ucundan kaldırılarak kızaktaki iletken tel üzerine nemlendirilmiş kağıt parçası koyularak şerit jel kapatıldı ve kızak fokuslama cihazına yerleştirilerek ikinci aşamaya geçildi. Bu aşamada protein örneklerinin fokuslanması sağlandı farklı pH aralıkları için farklı fokuslama koşulları kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Odaklama Koşulları

pH Aralıkları	Fokuslama Koşulları
<b>pH 3-6</b>	S1: 250V 15 dk, 20 °C
	S2: 20.000 V-hr, 20 °C
	S3: 8.000V, 20 °C
<b>pH 5-8</b>	S1: 250V 15dk, 20 °C
	S2: 35.000V-hr, 20 °C
	S3: 8.000V, 20 °C
<b>pH 7-10</b>	S1: 250V 15dk, 20 °C
	S2: 30.0 0V-hr, 2 °C
	S3: 8.000V, 20 °C

Fokuslama işlemi bittikten sonra izoelektrik noktalarına göre şerit jel üzerinde ayrılan proteinler tek kullanımlık kaplara yerleştirilerek -80 °C ye kaldırıldı.



-80 °C den çıkarılan örnekler 15-20 dk oda ısısında bekletildikten sonra kurutma kağıdı kullanılarak üzerinde kalan sıvı ve mineral yağ kalıntısı uzaklaştırıldı. Bu arada tampon I ve II hazırlandı. 20 dk' nın sonunda şerit jel 10 dk tampon I (6 M üre, 0,375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% Gliserol, 2% SDS, 2% DTT) içerisinde sallayıcıda yaklaşık 75 rpm de sallandı. Tampon I' den alınan şerit jel, tampon II (6M üre, 0,375M Tris-HCl pH8.8, 20% Gliserol, 2% SDS, 2,5% İodoacetamide) içerisinde 10 dk yaklaşık 75 rpm'de sallandı. Bu arada izole edilen sitoplazmik proteinler, ısıtıcı blokta 5 dakika kaynatılarak hazırlandı. Şerit jel yaklaşık 100ml Tris-Glisin-SDS tamponu içerisinde bir süre bekletildikten sonra hem şerit jel hemde kaynatılan protein hazırlanan %12'lik SDS-PAGE jeline marker (Thermo) ile yüklendi ve üzeri agaroz jel ile kaplandı ve yürütme işlemi 30mA'lik akım altında gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi bittikten sonra daha önceden anlatılan prosedür kullanılarak jeldeki proteinler membrana aktarıldı. Membrana aktarılan proteinler PBS ile hazırlanmış 6 M guanidinium hidroklor solüsyonu içinde 20 dk bekletilerek membrandaki proteinler denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra, membran 3 M, 1,5 M, 0,75 M, 0,37 M ve 0,16 M guanidinium hidroklor solüsyon serilerinde 20'şer dakika bekletilerek membrandaki proteinlerin renatürasyonu sağlandı. Renatürasyon işleminden sonra membran, % 5 yağsız süt tozu içeren PBS'de bir gece bekletildi. Sabah, membran % 0,5 yağsız süt tozu içeren PBS ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra hibridizasyona hazır hale getirilen membran, 0,1 M maleik asit, 0,15 M NaCl ve %1'lik bloklama tozundan oluşan (pH 7,5) süspansiyona ilave edilen 5 µl işaretli probdan oluşan karışım içinde gece boyu sallanır durumda bırakıldı. Sabah sallayıcıdan alınan membran, yine % 0,5 yağsız süt tozu ve % 0,3 tween-20 içeren PBS'de yıkandı. Yıkanan membran, oda sıcaklığında 1 saat % 0,5 yağsız süt tozu içeren PBS'de sulandırılan anti-DIG (vial 4) ile inkübe edilerek hibridizasyon tamamlandı. Membran, bağlanmayan anti-DIG'in uzaklaştırılması için, 3 kez 10'ar dakika %0,3 tween-20 içeren PBS ile yıkandı. Yıkanan membran, 10 ml renk solüsyonunda (0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ve vial 5) renk oluşuncaya kadar 15-20 dakika bekletildi. Tüm işlemler bütün pH aralıkları için hem yaban tip AMEV hemde kontrol için kullanılan Ld652 hücrelerine ait proteinler için yapıldı.

## **2.4. Am $\Delta$ pk/*gfp* Rekombinant Virüsün Konak Spektrumu ve Enfektivitesinin Belirlenmesi**

### **2.4.1. Farklı Hücre Kültürlerinin Am $\Delta$ pk/*gfp* ile Enfeksiyonu ve Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi**

Am $\Delta$ pk/*gfp* rekombinant virüsün invitro konak spektrumuna etkisini belirlemek amacıyla Sf9, Bm ve Ld652 (kontrol olarak) hücreleri Am $\Delta$ shp/*gfp* (kontrol olarak) ve Am $\Delta$ pk/*gfp* virüsleri ile enfekte edildi. Bunun için hücreler  $2.5 \times 10^6$  hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına (Grainer) bırakıldı. Hücreler tutunmaları için yaklaşık iki saat 28 °C' lik etüvde bekletildi. Daha sonra MOI=10 olacak şekilde hücrelerin bir grubu Am $\Delta$ shp/*gfp* ile bir grubuda Am $\Delta$ pk/*gfp* ile enfekte edildi. Virüsün hücrelere tutunması için iki saat boyunca oda sıcaklığında düşük hızda sallayıcıda bekletildikten sonra inokulum uzaklaştırıldı ve 2'şer ml taze besiyeri eklendi. Enfekte olmuş hücreler 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyondan sonra 4 gün boyunca 24 saatlik aralıklarla GFP proteinin ortaya çıkışı, Auxovert floresan inverted miktoskopta yeşil ışık oluşumu ile belirlendi ve fotoğrafları çekildi. Elde edilen enfeksiyon sıvısı +4 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra bu sıvı kullanılarak ana konak olan Ld652 hücreleri üstte anlatılan prosedüre göre enfekte edildi ve yine yeşil renk oluşumu gözlenerek fotoğraflandı.

### **2.4.2. Am $\Delta$ pk/*gfp* ile Enfekte Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Virüs Miktarı**

Ld652, Bm ve Sf9 hücreleri  $2.5 \times 10^6$  olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücrelerin tutunması için iki saat beklendi. Tutunma işleminden sonra, MOI=10 olacak şekilde, yaban tip Am $\Delta$ shp/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile ayrı ayrı enfekte edildi. Enfeksiyon, virüsün hücrelere tutunması için iki saat boyunca oda sıcaklığında düşük hızda sallayıcıda bekletilerek gerçekleştirildi. Daha sonra enfekte edilen hücrelerden, 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde örnekler alındı. Bu işlemlerin tümü Ld652, Bm ve Sf9 hücreleri için yapıldı. Belirlenen sürelerde, hücreler ve hücre sıvısı tamamen alınıp 4 °C'de 800xg'de, 10 dakika santrifüj edildi ve her saat dilimi için süpernatant alındı ve yukarıda (2.2) belirtildiği gibi EPDA deneyi yapılarak yavru virüs sayımı yapıldı.

### 2.4.3. Rekombinant Virüsün (*AmΔpk/gfp*) DNA Replikasyon Zamanının Belirlenmesi

Rekombinant virüsün DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyonu yöntemi ile DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) kullanılarak belirlendi.

Öncelikle, hibridizasyon işlemi sırasında kullanılacak olan prob hazırlandı. Prob olarak kullanılacak DNA sırasının, hem *AmΔshp/gfp* ve hem de *AmΔpk/gfp* ile homoloji sağlaması gerekmektedir. Bunun için, rekombinant transfer vektörü hazırlarken kullanılan pBS-AMV197SDR plazmidinden yararlanıldı. Bu vektör, her iki virüs için de AMV197 açık okuma zincirinin aşağı bölgesine ait, 1051 bp'lik DNA sırası içermektedir ve hibridizasyon çalışmalarında prob olarak kullanılmaya uygundur. Yapılan bu tespitten sonra, pBS-AMV197SDR plazmidi kit (Fermentas) yardımıyla izole edildi ve *Hind* III ve *Kpn* I kesme bölgeleri kullanılarak, kesme işlemi sağlandı. Kesilen DNA parçaları, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü.

Gereken bant, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Nucleospin) ve kitin içindeki kullanma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Temizlenen DNA'lar %1,2'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, probun DIG-dUTP (Digoxigenin-dUTP) ile işaretlenmesi işlemine başlandı. Jelden temizlenen DNA'nın denatürasyonu, kaynamakta olan suda 10 dakika bekletilerek sağlandı. Hemen buz üzerine alınarak DNA'nın yeniden birleşmesi engellendi. Soğutulan DNA'ya 1/5 oranında, işaretli dUTP ilave edildi ve karıştırıldı. Bu karışım, işaretleme işleminin tamamlanması için, 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, karışım 65 °C'de 10 dakika bekletildi ve reaksiyon durduruldu. Hazırlanan prob, kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Diğer yandan, Ld652 hücreleri,  $1 \times 10^6$  olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücreler, tutunma işlemi tamamlandıktan sonra (yaklaşık 2 saat), MOI=10 olacak şekilde, yaban tip *AmΔshp/gfp* ve *AmΔpk/gfp* ile ayrı ayrı enfekte edildi. Enfekte edilen hücrelerden, 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde örnekler alındı. Bu işlemlerin tümü Bm, Sf9 hücreleri ile de yapıldı. Tüm hücreler ve saat dilimleri için deneyler üç tekrarlı yapıldı. Belirlenen sürelerde, hücreler ve hücre sıvısı tamamen alınıp 4 °C'de 800xg'de 10 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Geriye kalan pellet, 800 µl, 0,5 M sodyum hidroksit içinde lizis edildi. Lizis işleminden sonra 80 µl, 10 M amonyum asetat kullanılarak nötralizasyon sağlandı. Elde edilen lizatlar, bütün örnekler biriktirilinceye kadar 4 °C’de bekletildi. Bütün örnekler toplandıktan sonra, örneklerin nitroselüloz membrana (Hybond-N+ nylon membrane; Amersham-Biosciences) geçirilmesi işlemine başlandı. Süpernatant temiz bir tüpe alınarak yavru virüs sayımı için 4 °C bekletildi.

Her bir virüsten alınan ve 4 °C’de muhafaza edilen hücre lizatından, 150’şer µl alınıp yeni bir tüpe aktarıldı. Tüpler, 10 dakika kaynayan suda bırakıldı ve kaynatma işleminden sonra hemen buza alınarak soğutuldu. Diğer yandan, membran uygun ölçülerde kesildi, 6xSSC (saline-sodium citrate) tamponunda 5 dakika yıkandı ve slot-blot aletine yerleştirildi. Kaynatılan örnekler, belli bir düzen içinde kuyucuklara yerleştirildi. Vakum yapılarak, kuyucuklardaki örneklerin membrana geçmesi sağlandı. Blotlama cihazından çıkarılan membran, 2xSSC ile 2 dakika yıkandı ve üç kat kurutma kağıdının arasında, oda sıcaklığında 30 dakika kuruması için bırakıldı. Kurutma işleminden sonra, membran 80 °C’de 2 saat bekletilerek örneklerin iyice membrana tutunması sağlandı.

Proben hazırlanması ve örneklerin membrana emdirilmesi tamamlandıktan sonra, ön hibridizasyon işlemine başlandı. Önceden hazırlanan 15 ml’lik hibridizasyon tamponu, -20 °C’den çıkarılıp eritildi, kaynayan su içinde 10 dakika kaynatıldı ve hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Örneklerin emdirildiği membran, hibridizasyon şişesine alındı. Soğutulan hibridizasyon tamponu, şişedeki membranın üzerine boşaltıldı. Hibridizasyon fırınına yerleştirilen şişe, 42 °C’de, 16 saat, döner durumda bırakılarak ön hibridizasyon sağlandı.

Ön hibridizasyon süresinin sonunda, yeni bir hibridizasyon tamponu daha -20 °C’den alındı, eritildi. Eritilen tamponun içine, daha önceden hazırlanan işaretli probdan 5 µl eklendi ve karıştırıldı. Proben eklendiği tampon, kaynayan su içinde 10 dakika kaynatıldı ve tampon-prob karışımı hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Diğer yandan, hibridizasyon şişesinden ön hibridizasyon sıvısı boşaltıldı. Yerine, işaretli proba beraber hazırlanan hibridizasyon tamponu eklendi ve şişe yine 42 °C’de, 16 saat, döner durumda bırakılarak probun membrandaki örneklerle hibridizasyonu sağlandı. İşaretli prob ile viral örneklerin hibridizasyonu tamamlandıktan sonra, bağlanan probun görünür hale getirilmesi işlemine başlandı. Hibridizasyon şişesinden alınan membran, yıkandı ve bağlanmayan problemler uzaklaştırıldı. Yıkanan membran, bloklama solüsyonundan geçirilerek, kullanılacak antikora özgü olmayan membrandaki bağlanma bölgeleri kapatıldı ve

membran, bu kez antikor solüsyonuna (Anti-Digoxigenin-AP) bırakıldı. DIG ile antikorların bağlanması sağlandıktan sonra, membran yeniden yıkama işlemine tabi tutuldu ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Membran, tespit tamponunda yıkama işleminden sonra, renk tamponunda renk oluşumu gözleninceye kadar karanlıkta bırakıldı. Renk oluşumu tamamlandıktan sonra, membran tarandı ve kaydedildi.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Virüslerin Üretimi ve Saflaştırılması**

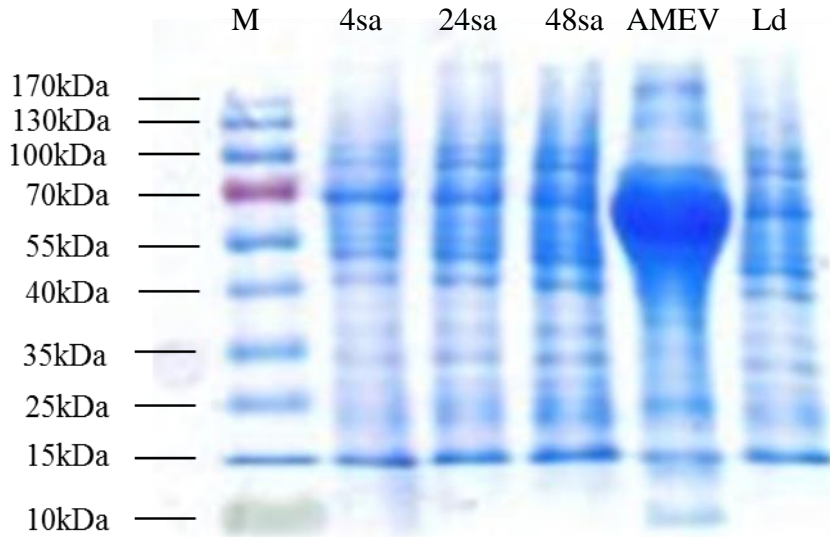
Tez çalışması sırasında kullanılacak virüslerin üretimi için, Ld652 hücre kültürü kullanıldı. Yaban tip ile aynı özellikleri gösteren ve kontrol olarak kullanılacak *AmΔshp/gfp* ve protein kinaz geni çıkartılmış rekombinant *vAmΔpk/gfp* virüslerinin Ld652 hücre kültürüne enfeksiyonları yapıldı. Enfekte edilmiş hücreler 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildiler. Enfeksiyondan 3 gün sonra hem *AmΔshp/gfp* hem de *AmΔpk/gfp* virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerin içerisinde, enfeksiyona has belirgin granüllerin ve nükleus kararmalarının olduğu gözlemlendi. Hücrelerin %100 oranında enfekte olduğu gözlenince (7-8 gün sonra), her bir farklı virüsle enfekte edilen hücre sınırları toplandı ve 2.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen virüs süspansiyonları kullanılarak deneysel işlemler sırasında kullanılacak virüs stokları üretildi. *AmΔshp/gfp*'ye ve *AmΔpk/gfp*'ye ait virüs stoklarının konsantrasyonları, EPDA metodu ile yapılan hesaplamaya göre tespit edildi. Elde edilen virüs süspansiyonları kullanarak, 60 gözlü hücre kültür kaplarında yapılan enfeksiyonlardan elde edilen sonuçlar, istatistiksel temele dayanan EPDA formülüne göre hesaplandı. Yapılan hesaplamaya göre, *AmΔshp/gfp* ve *AmΔpk/gfp* konsantrasyonları sırasıyla  $10,37 \times 10^7$  pfu/ml ve  $2,37 \times 10^7$  pfu/ml olarak belirlendi. Virüs stokları, ışık almayacak şekilde 4 °C'de muhafaza edildi.

#### **3.2. Serin/Treonin Protein Kinazın Trans-Aktivasyonunda Rol Alan Protein veya Proteinlerin Belirlenmesi**

##### **3.2.1. Yaban Tip AMEV ile Enfekte Ld652 Hücrelerinden Toplam Sitoplazmik Protein İzolasyonu**

15 adet T-75 hacimli Ld652 hücresi içeren flask yaban tip AMEV ile enfekte edilirken, 5 adet Ld652 hücresi içeren T-75 hacimli flask kontrol olarak kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda *pk* gen transkripsiyonunun Ld652 hücre kültüründe enfeksiyonu takip eden 2. ve 4. saatler arasında başladığı tespit edilmişti. Bu bilgiye dayanılarak enfekte olmuş ve olmamış hücrelerden 5 tanesinden 4. saatte, diğer 5 tanesinden 24. saatte, son 5 tanesinden de 48. saatte ProteoJET Sitoplazmik ve Nüklear Protein Ekstraksiyon kiti

(Fermentas) kullanılarak toplam stoplazmik protein izolasyonu yapıldı. Bradford metoduna göre (1976) Ld652 hücrelerinden 4. saatte izole edilen proteinlerin konsantrasyonu 0,153 ng/ $\mu$ l, WtAMEV ile enfekte Ld652 hücrelerinden 4., 24., ve 48. saatlerde izole edilen proteinlerin konsantrasyonları sırası ile 0,198 ng/ $\mu$ l, 0,142 ng/ $\mu$ l ve 0,181 ng/ $\mu$ l'dir. Yaban tip AMEV pozitif kontrol olarak diğer proteinler ile jele yüklendi ve SDS-PAGE yapıldı. Yürütülen jelin bir kopyası, 'Coomassie Brilliant Blue (R-250)' boyama yöntemine göre boyandı (Şekil 4). Boyama sonucuna göre, yaban tip AMEV ile enfekte hücrelerden farklı saat dilimlerinde izole edilen proteinlere ait bantlar ve Ld652 hücrelerinden izole edilen protein bantları arasında farklılık gözlemlenmedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan AMEV'deki protein bantlarının farklı olduğu sonucuna varıldı

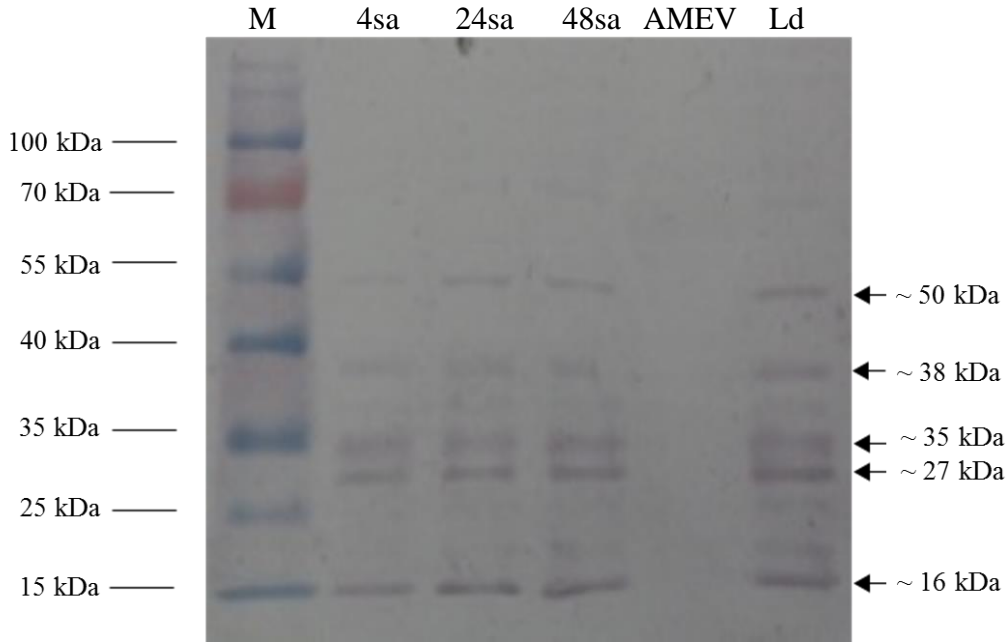


Şekil 4. Enfekte ve kontrol Ld652 hücrelerinin SDS-PAGE protein profilleri. M: Markırı, Rakamlar: Yaban tip AMEV ile enfeksiyon sonundaki protein ekstraksiyon zamanlarını, AMEV: Sadece virüsü, Ld: Enfekte olmamış hücreleri göstermektedir.

### 3.2.2. South-Western Analizi

Yürütülen jelin bir kopyası blotlama işlemi için kullanıldı. Blotlama işlemi bittikten sonra DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I kullanılarak işaretli prob ile hibridizasyon yapıldı. Hibridizasyon sonrasında prob ile hibritleşen beş protein bandı belirlendi (Şekil 5). Bu protein bantlarının yaklaşık 50 kDa, 38 kDa, 35 kDa, 37 kDa, 16

kDa ağırlığında oldukları belirlendi. Hibritleşmenin yaban tip AMEV’de olmayıp virüsle enfekte hücelere ait proteinlerde ve hücreye ait proteinlerde olması *pk* geninin transaktivasyonunda rol oynayan proteinlerin virüs kökenli değil hücre kökenli olduğunu göstermiştir.



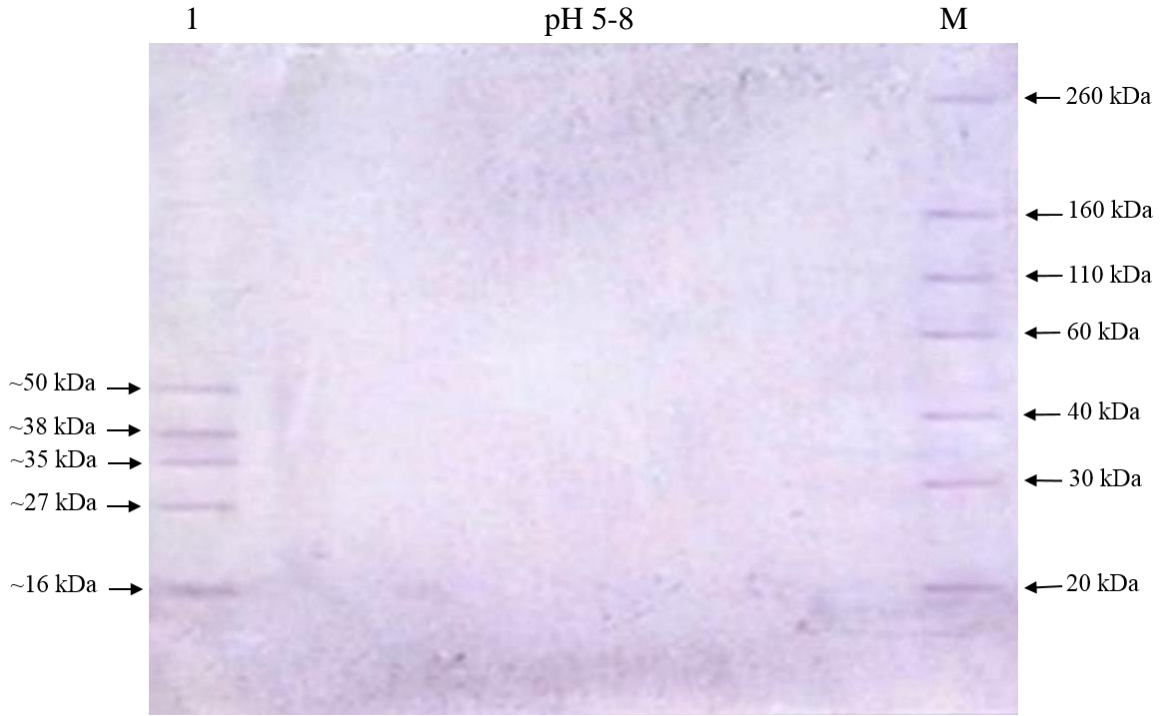
Şekil 5. South-Western Analizi. M: Markırı, Rakamlar: Yaban tip AMEV ile enfeksiyon sonundaki protein ekstraksiyon zamanlarını, AMEV: Sadece virüsü, Ld: Enfekte olmamış hücreleri göstermektedir.

### 3.3. 2D- Jel Elektforezi

Hibridizasyon sonucunda, AMEV protein kinaz geninin aktivasyonundan sorumlu 5 farklı protein olduğu belirlenmesine rağmen membran üzerindeki her bir bant, aynı ağırlığa sahip birden fazla proteinden oluşabilir. Aynı ağırlıktaki protein bantlarını ayırmak için en ideal yöntem, proteinlerin elektriksel bir ortamda net yüklerine göre ayrılmasından sonra bu kez de aynı proteinlerin ağırlıklarına göre ayrılması metodu olan iki boyutlu jel elektforezi (2-D elektforez) yapıldı. Mevcut jel ünitesinin genişliği 11 cm’den küçük olduğu için, her bir şerit ikiye kesilerek aynı zamanda yürütüldü. Bunun sonucunda, AMV197 kodlu ORF tarafından sentezlenen protein kinazın, Ld652 hücreleri tarafından üretilen, trans-aktivatör proteinlerinden pH’sı 5-8 olan protein bulunmamaktadır. Böylece, Şekil 6’de belirlenen 5 proteinin AMEV protein kinaz enziminin transkripsiyonundan



sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak, 3-6 ve 7-10 pH'ları için yapılan deneylerden blotlama ve renklendirme işlemlerinde yaşanan sorunlardan dolayı sonuç alınamadı.



Şekil 6. AMEV protein kinaz trans-aktivatörlerinin pH 5-8 arası 2D jel elektroforezi.  
1: Ld652+AMEV, M: Markır

### 3.4. Farklı Hücre Kültürlerinde Am $\Delta$ pk/*gfp*'nin Replikasyon Özellikleri

#### 3.4.1. Farklı Hücre Kültürlerinin Am $\Delta$ pk/*gfp* ile Enfeksiyonu ve Meydana Gelen Sitopatik Etkiler

Yaban tip virüs ile aynı replikasyon özelliğine sahip olan kontrol virüsün (Am $\Delta$ sph/*gfp*) Ld652 hücrelerinde replikasyonu kontrol olarak kullanılıp rekombinant virüsün (Am $\Delta$ pk/*gfp*) Ld652, Bm ve Sf9 hücrelerindeki replikasyon özellikleri ortaya çıkarıldı. Hücreler enfeksiyondan sonra 24 saat aralıklarla mikroskopta incelendi. Meydana gelen sitopatik etkiler ve GFP üretimi kaydedildi.

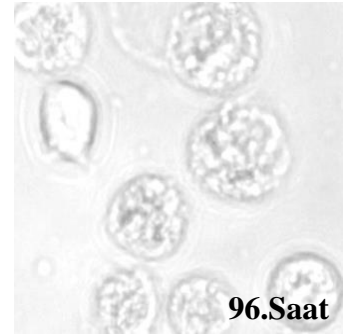
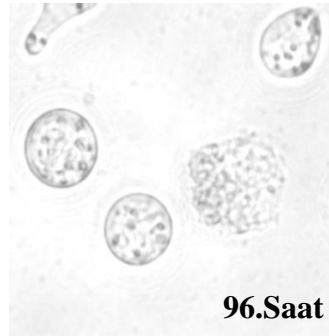
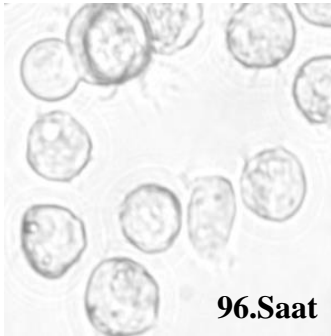
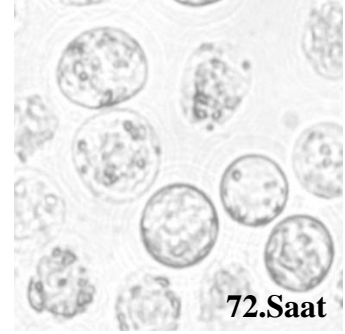
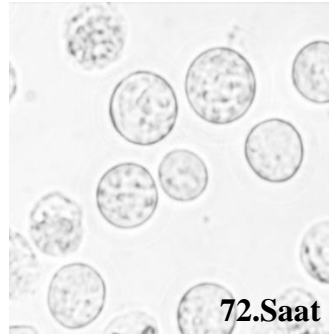
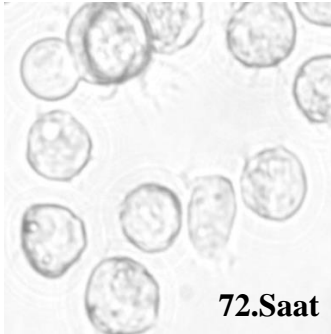
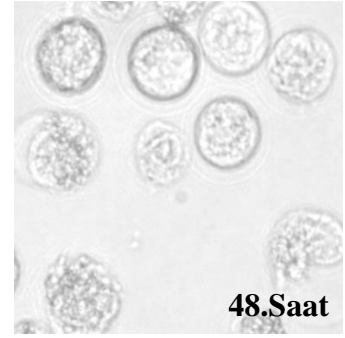
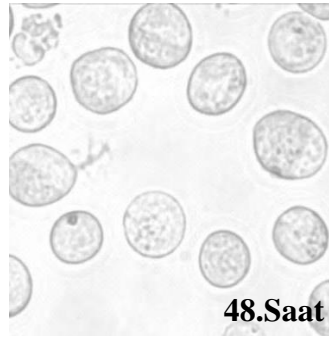
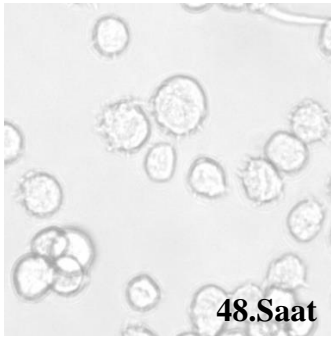
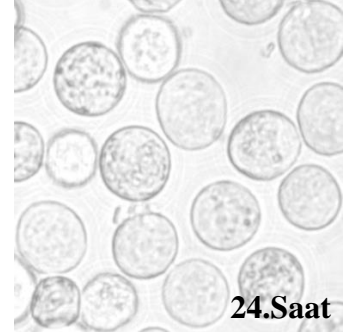
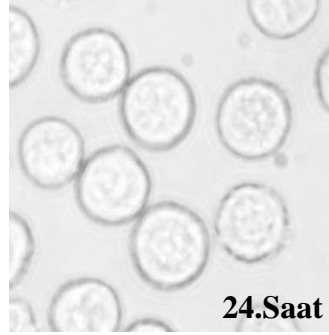
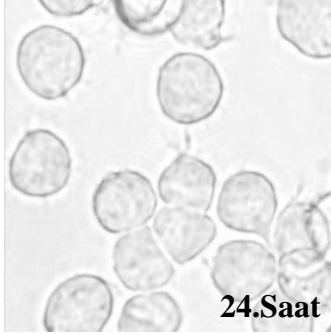
Ld652 hücrelerinin Am $\Delta$ sph/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile enfeksiyonunda enfeksiyondan 24 saat sonra her iki virüsle de enfekte olan hücrelerde enfeksiyon belirtisine rastlandı. GFP üretimi (Şekil 7) Auxovert florasan inverted mikroskopta gözlemlendi. Enfeksiyonun devamında 48. ve 72. saatlerde hücrelerin granülleşmeleri, irileşmeleri ve GFP üretimi

artarak devam etti. 96. saatte hücrelerin tabandan koptu ve buna bağılı olarak GFP üretimi azaldı (Şekil 8).

Sf9 (Şekil 9) ve Bm (Şekil 11) hücrelerinin *AmΔsph/gfp* ve *AmΔpk/gfp* ile enfeksiyonunda her iki virüs içinde 24. saatte herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı ve GFP (Şekil 10-12) üretimi görülmedi. Enfeksiyonun devamında 48. saatten itibaren enfeksiyon belirtileri gözlemlendi. Hücrelerde irileşme ve granülleşmeler devam etti. 96. saattede enfeksiyon belirtileri iyice arttı, hücreler tabandan koparak parçalandığı ve GFP üretiminin azaldığı gözlemlendi.

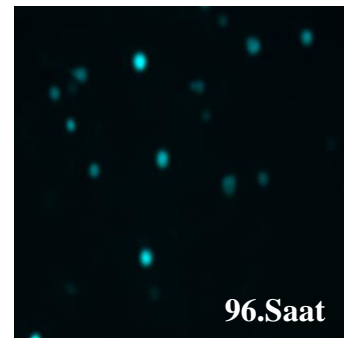
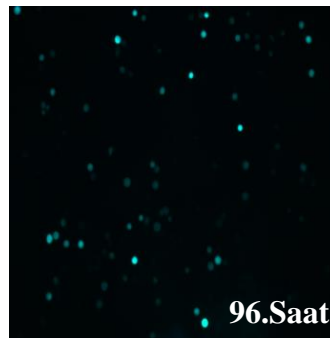
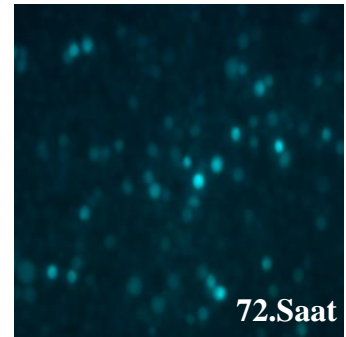
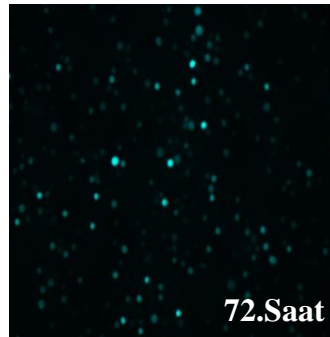
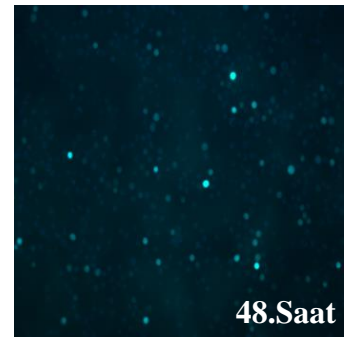
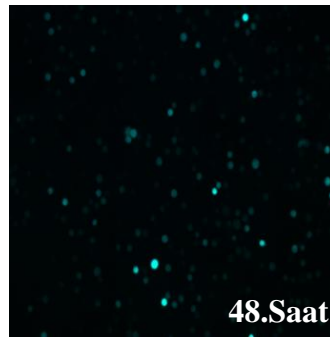
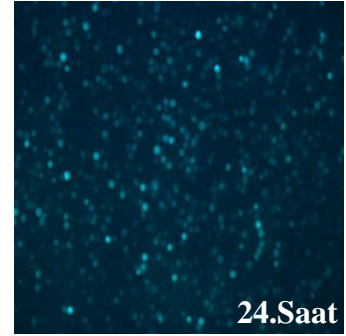
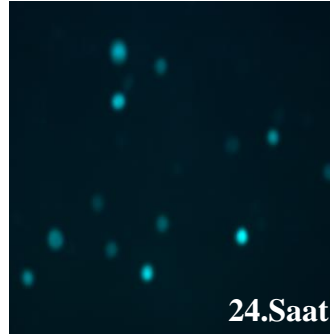
Enfeksiyon belirtilerinin ortaya çıktığı hücrelerin (Sf9, Ld652, Bm ) üst sıvıları ayrı ayrı alındı ve ana konak olan Ld652 hücreleri yeniden aynı hacimde alınan bu sıvılarla enfeksiyona maruz bırakıldı (Şekil 13). Bu hücrelerin tümünde enfeksiyon tespit edildi. Bu yüzden, çalışmada kullanılan Ld652, Sf9 ve Bm hücrelerinin, *AmΔsph/gfp* / *AmΔpk/gfp* ile enfeksiyona uygun konak böcek hücre kültürleri olduğu ve yaban tip AMEV'den *pk* geninin silinmesinin hücrelerdeki sitopatik etkileri değıştirmedığı anlaşılmıştır.

Ld652 (Kontrol konak)

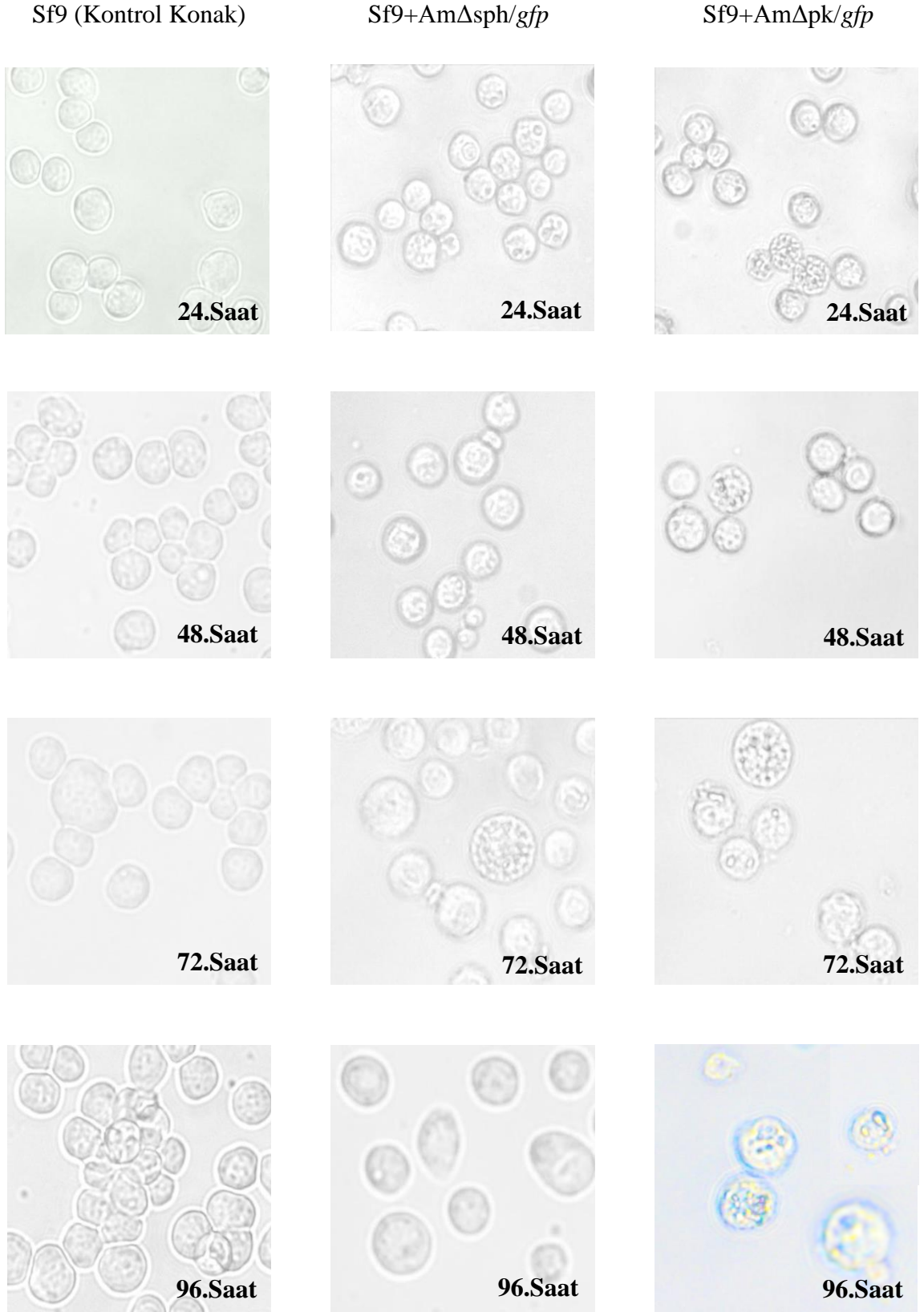
Ld652 + Am $\Delta$ sph/*gfp*Ld652 + Am $\Delta$ pk/*gfp*

Şekil 7. Am $\Delta$ sph/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile enfekte olan Ld652 hücreleri

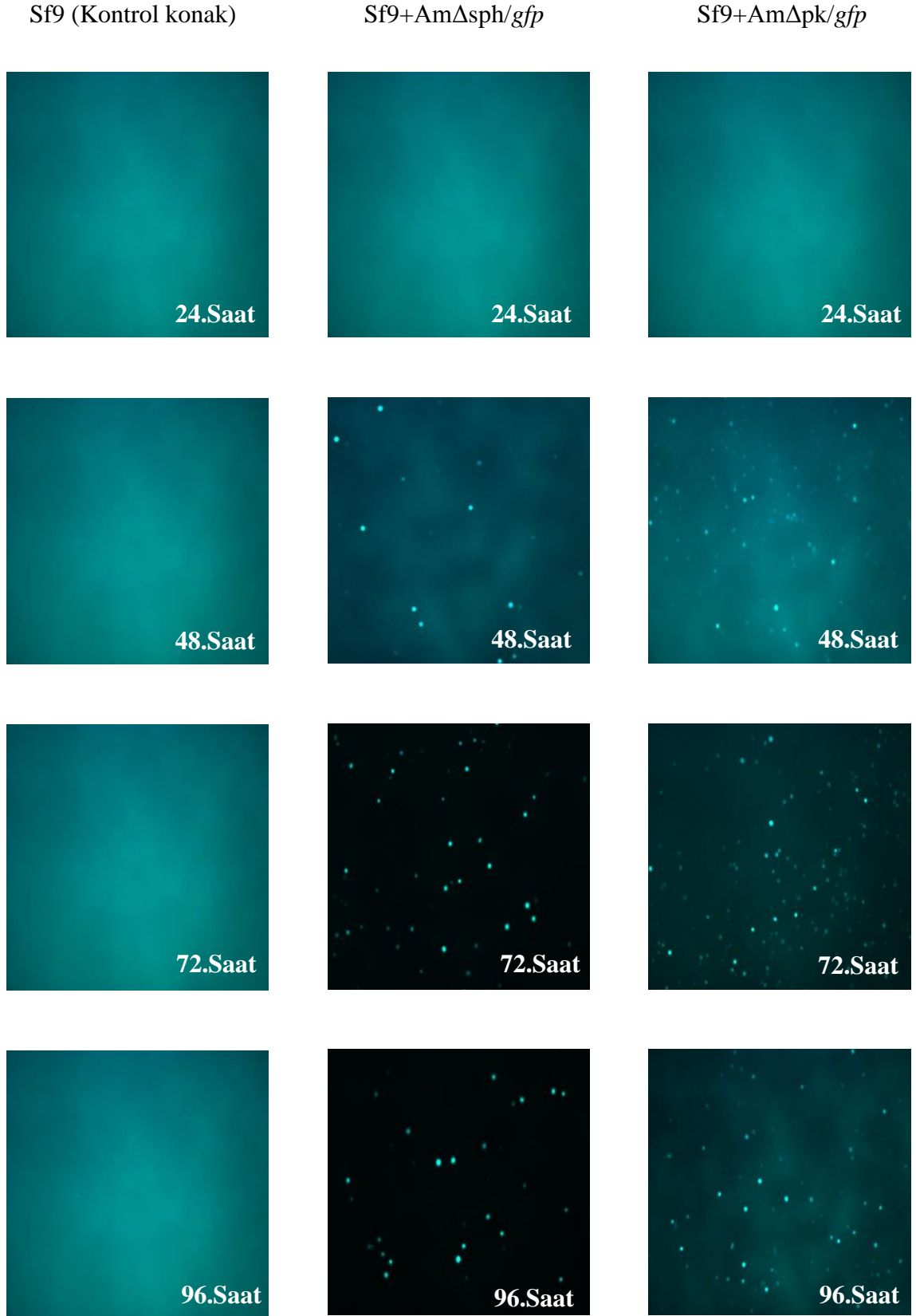
Ld652 (Kontrol konak)

Ld652+Am $\Delta$ sph/*gfp*Ld652+ Am $\Delta$ pk/*gfp*

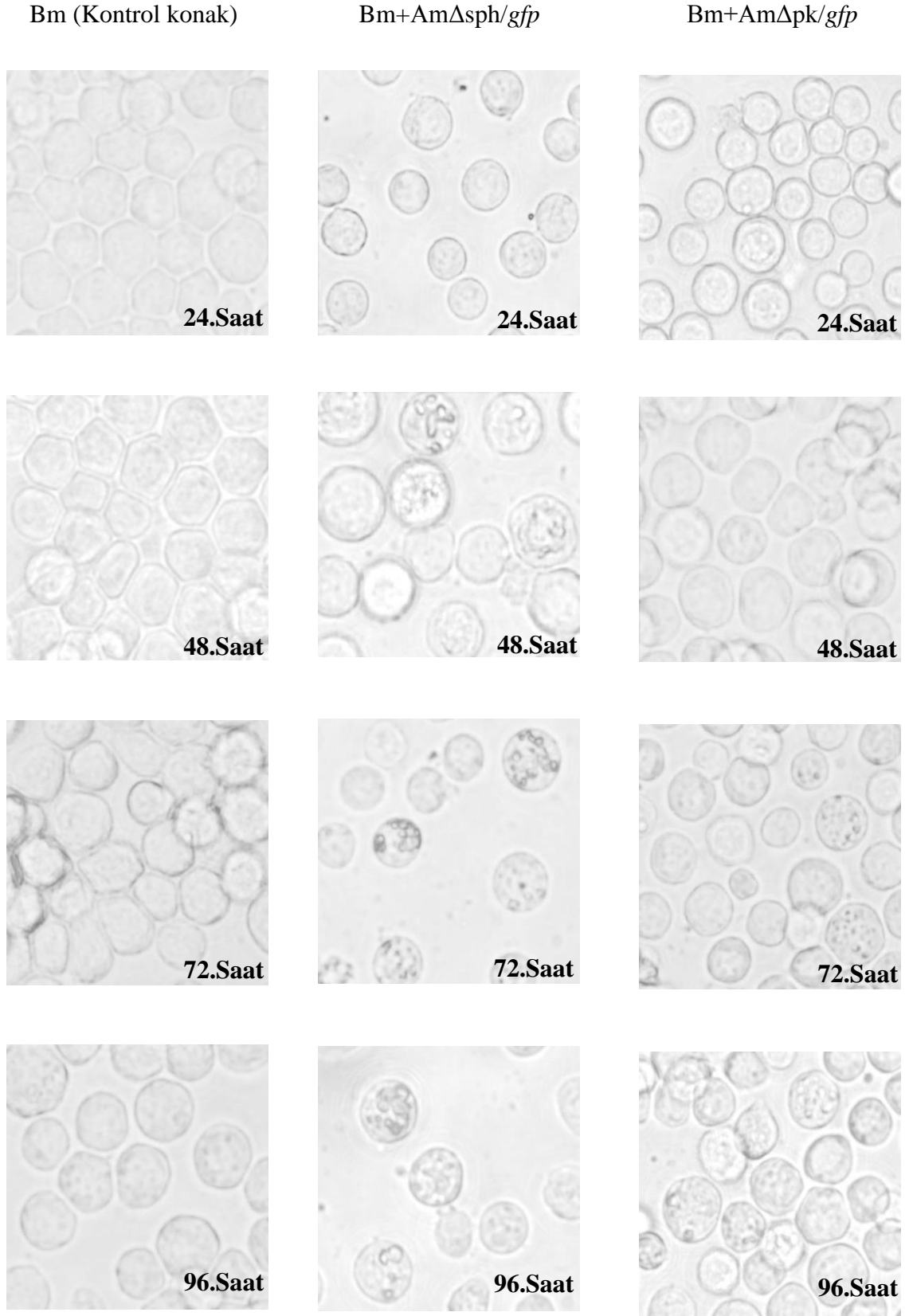
Şekil 8. Am $\Delta$ sph/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile enfekte olan Ld652 hücrelerinde GFP ifadesi



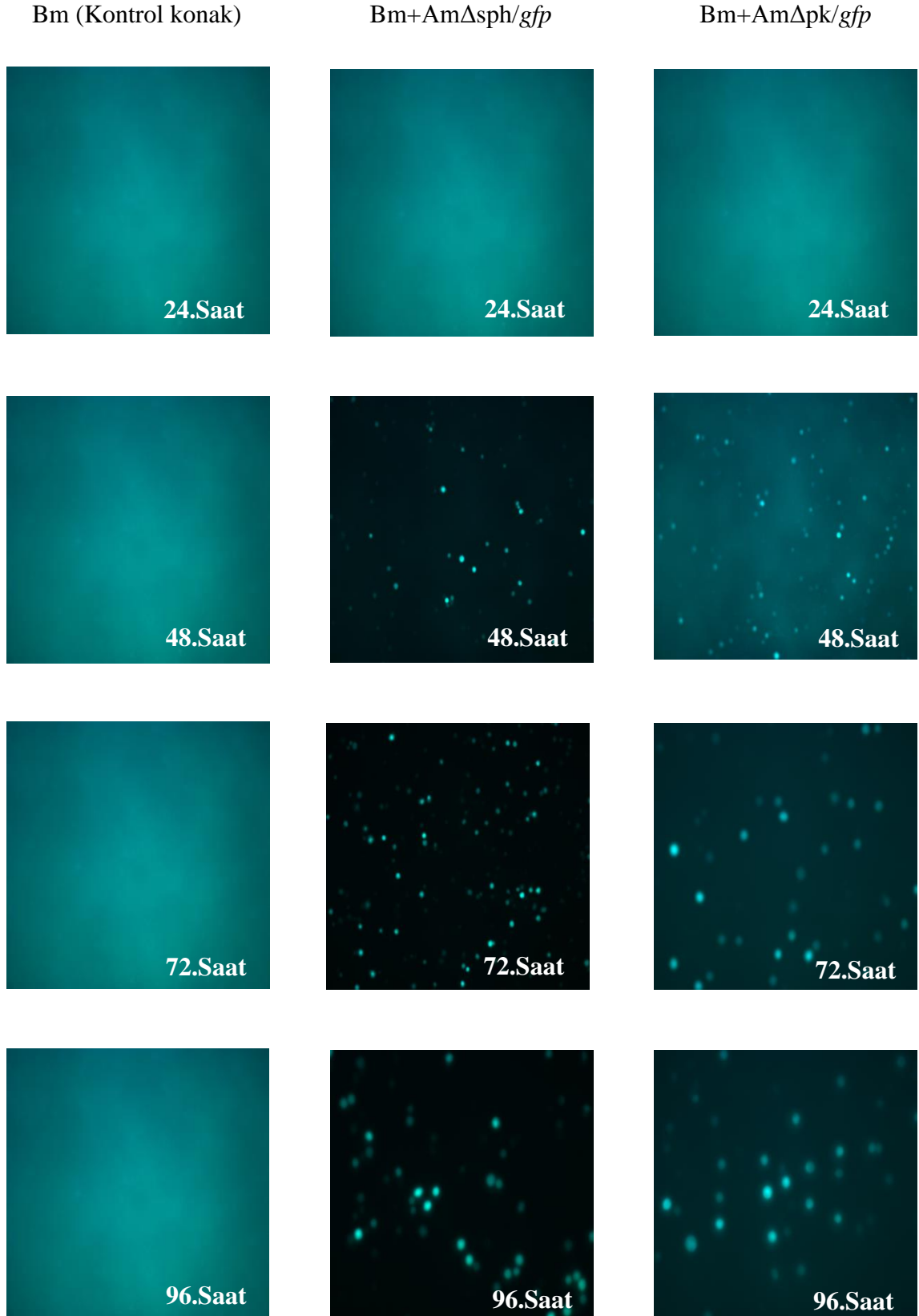
Şekil 9. Am $\Delta$ pk/*gfp* ve Am $\Delta$ sph/*gfp* ile enfekte olan Sf9 hücreleri



Şekil 10. Am $\Delta$ sph/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile enfekte olan Sf9 hücrelerinde GFP ifadesi

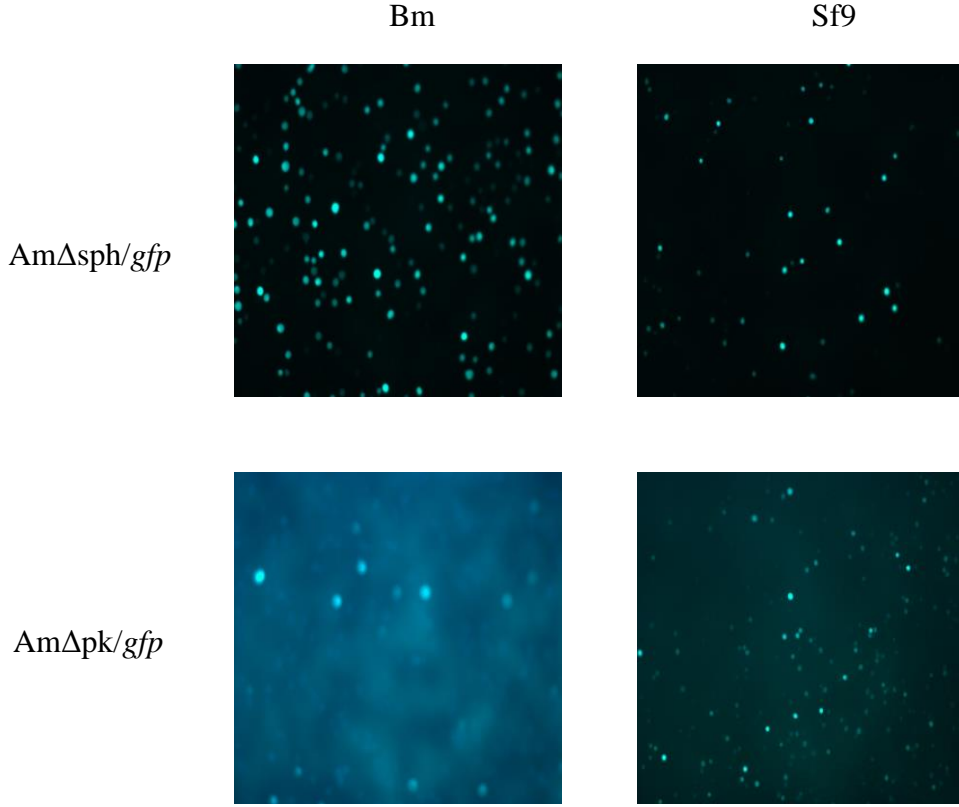


Şekil 11. Am $\Delta$ pk/*gfp* ve Am $\Delta$ sph/*gfp* ile enfekte olan Bm hücreleri



Şekil 12. Am $\Delta$ sph/*gfp* ve Am $\Delta$ pk/*gfp* ile enfekte olan Bm hücrelerinde GFP ifadesi



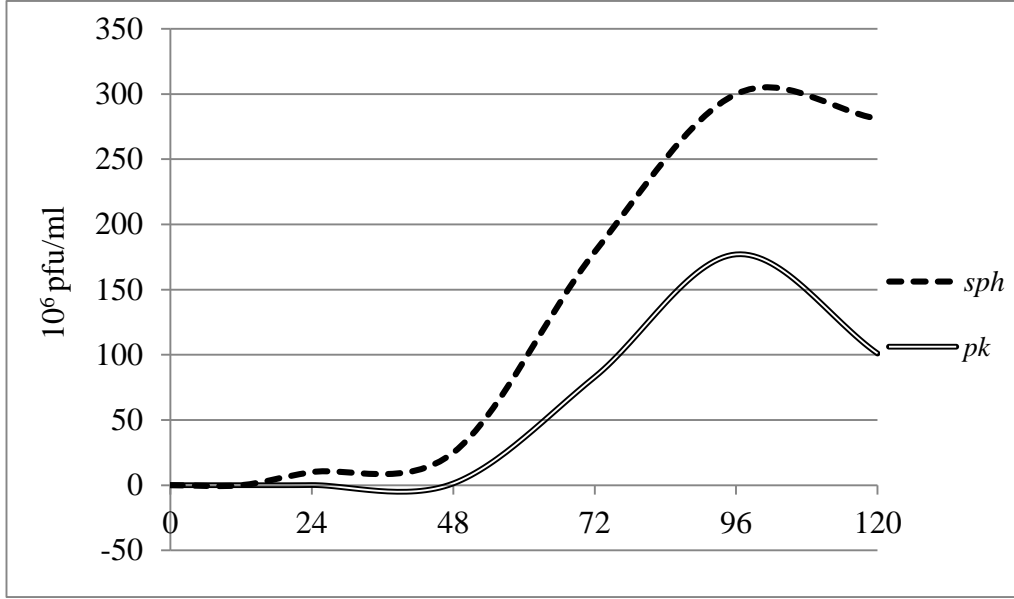


Şekil 13. Sf9 ve Bm hücrelerinde üretilen virüslerin Ld652 hücrelerinde GFP üretimi

### 3.4.2. *AmΔpk/gfp* ile Enfekte Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Virüs Miktarı

#### 3.4.2.1. *AmΔpk/gfp* ile enfekte Ld652 Hücrelerinde Üretilen Virüs Miktarı

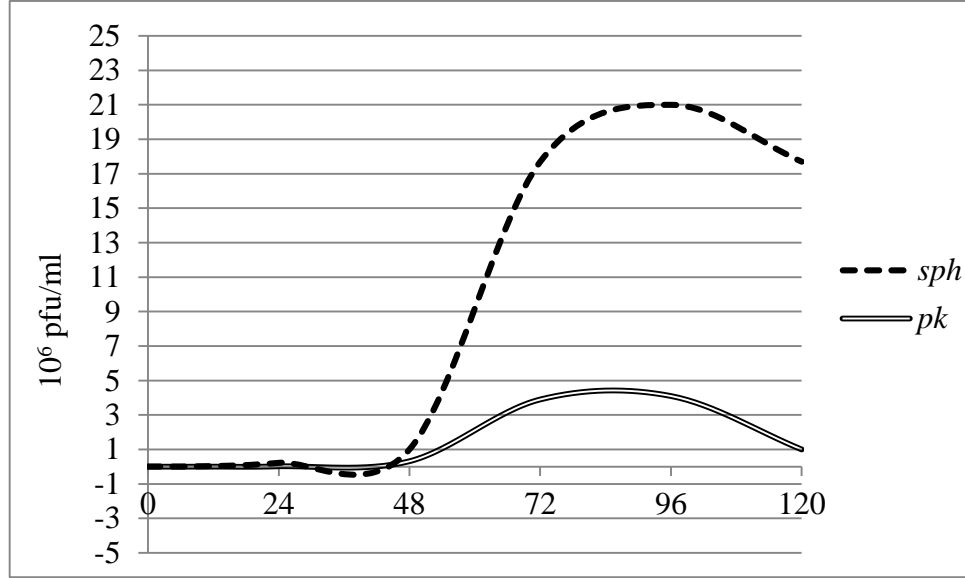
Enfeksiyondan sonraki 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde hem *AmΔpk/gfp* hemde *AmΔsph/gfp* (kontrol) enfekte hücrelerden kültür besiyeri alındı ve ihtiva ettikleri virüs konsantrasyonu EPDA ile belirlendi. Enfeksiyondan 0 saat sonra hücrelerde  $10^6$  seviyelerinde temel bir titer belirlendi. Her iki virüs için virüs üretimi enfeksiyondan 12 saat sonra başladı. Yaban tip virüs miktarı rekombinant virüse göre tüm saat dilimlerinde daha fazla üretildi ve bu fark yaklaşık 96. saatte maksimum seviyeye ulaştı (Şekil 14). Protein kinaz geninin genomdan silinmesinin Ld652 hücrelerinde yaban tipe göre yaklaşık bir buçuk kat virüs enfektivitesini azalttığı sonucuna ulaşıldı.



Şekil 14. AmΔpk/gfp ve AmΔsph/gfp'nin Ld652 hücrelerinde çoğalma kinetiği

#### 3.4.2.2. AmΔpk/gfp ile enfekte Sf9 Hücrelerinde Üretilen Virüs Miktarı

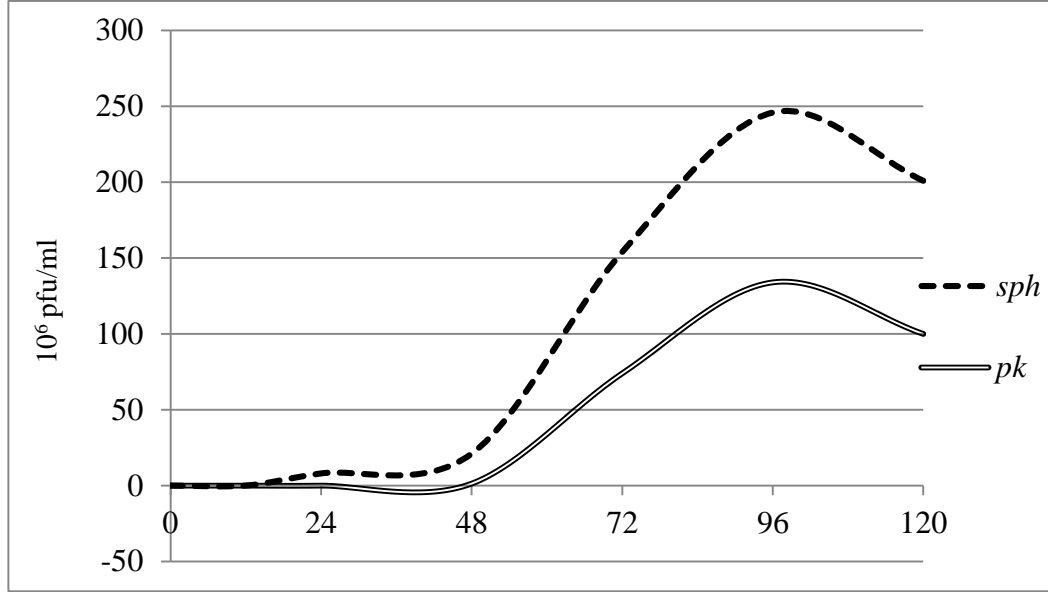
Enfeksiyondan sonraki 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde hem AmΔpk/gfp hemde AmΔsph/gfp (kontrol) enfekte hücrelerden kültür besiyeri alındı ve ihtiva ettikleri virüs konsantrasyonu EPDA ile belirlendi. Enfeksiyondan 0 saat sonra hücrelerde 10<sup>6</sup> seviyelerinde temel bir titer belirlendi. Her iki virüs için virüs üretimi enfeksiyondan 12 saat sonra başladı. Yaban tip virüs miktarı rekombinant virüse göre tüm saat dilimlerinde daha fazla üretildi ve bu fark yaklaşık 96. saatte maksimum seviyeye ulaştı (Şekil15). Protein kinaz geninin genomdan silinmesinin Sf9 hücrelerinde yaban tipe göre virüs enfektivitesini yaklaşık beş kat azalttığı sonucuna ulaşıldı



Şekil 15. AmΔpk/gfp ve AmΔsph/gfp'nin Sf9 hücrelerinde çoğalma kinetiği

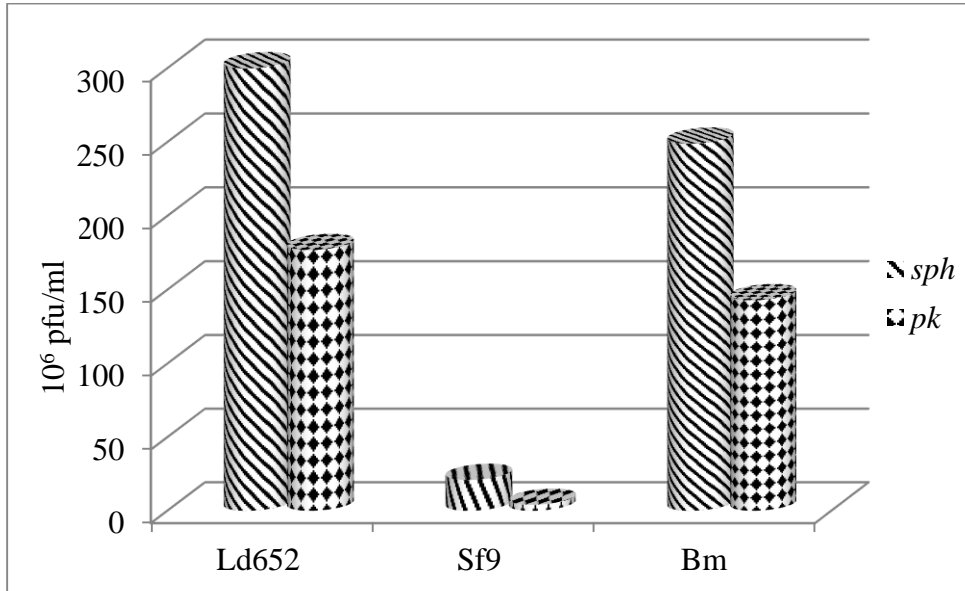
### 3.4.2.3. AmΔpk/gfp ile Enfekte Bm Hücrelerinde Üretilen Virüs Miktarı

Enfeksiyondan sonraki 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde hem AmΔpk/gfp hem de AmΔsph/gfp (kontrol) enfekte hücrelerden kültür besiyeri alındı ve ihtiva ettikleri virüs konsantrasyonu EPDA ile belirlendi. Enfeksiyondan 0 saat sonra hücrelerde  $10^6$  seviyelerinde temel bir titer belirlendi. Her iki virüs için virüs üretimi enfeksiyondan 12 saat sonra başladı. Yabancı tip virüs miktarı rekombinant virüse göre tüm saat dilimlerinde daha fazla üretildi ve bu fark yaklaşık 96. saatte maksimum seviyeye ulaştı (Şekil 16). Protein kinaz geninin genomdan silinmesinin Bm hücrelerinde yabancı tipe göre virüs enfektivitesini azalttığı sonucuna ulaşıldı.



Şekil 16. AmΔpk/gfp ve AmΔsph/gfp'nin Bm hücrelerinde çoğalma kinetiği

Ld652, Sf ve Bm hücreleri için en fazla virüs üretiminin olduğu olan enfeksiyondan sonra 96. saatte üretilen virüs miktarı değerleri ile virüs çoğalma eğrisi çizildi (Şekil 17). Rekombinant ve yaban tip virüs için ana konak olan Ld652 hüresinden sonra virüslerin en iyi çoğaldığı konak Bm hücre kültürü olarak belirlendi.

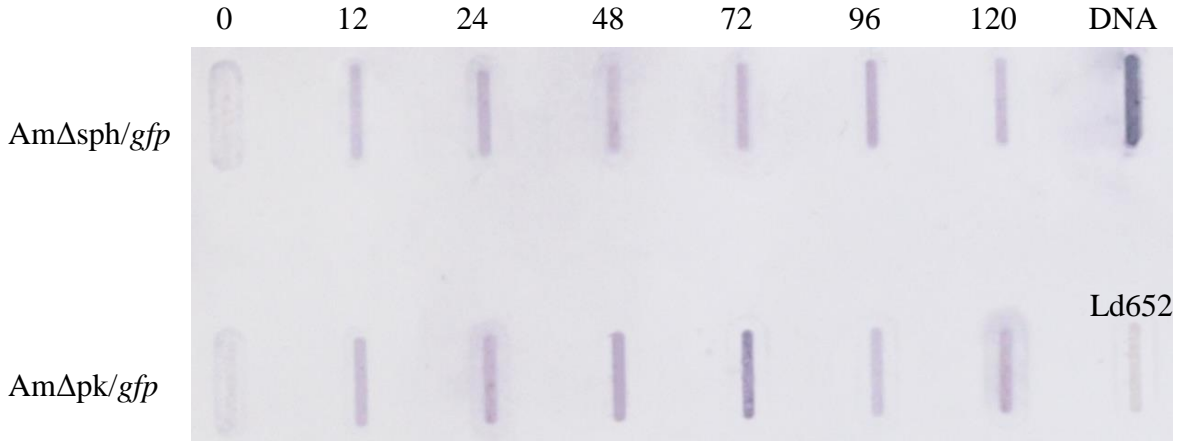


Şekil 17. AmΔpk/gfp ve AmΔsph/gfp ile enfekte Ld652, Sf ve Bm hücrelerindeki virüs üretimi

### 3.4.3. Farklı Hücre Kültürlerinde AmΔpk/gfp'nin DNA Replikasyonu

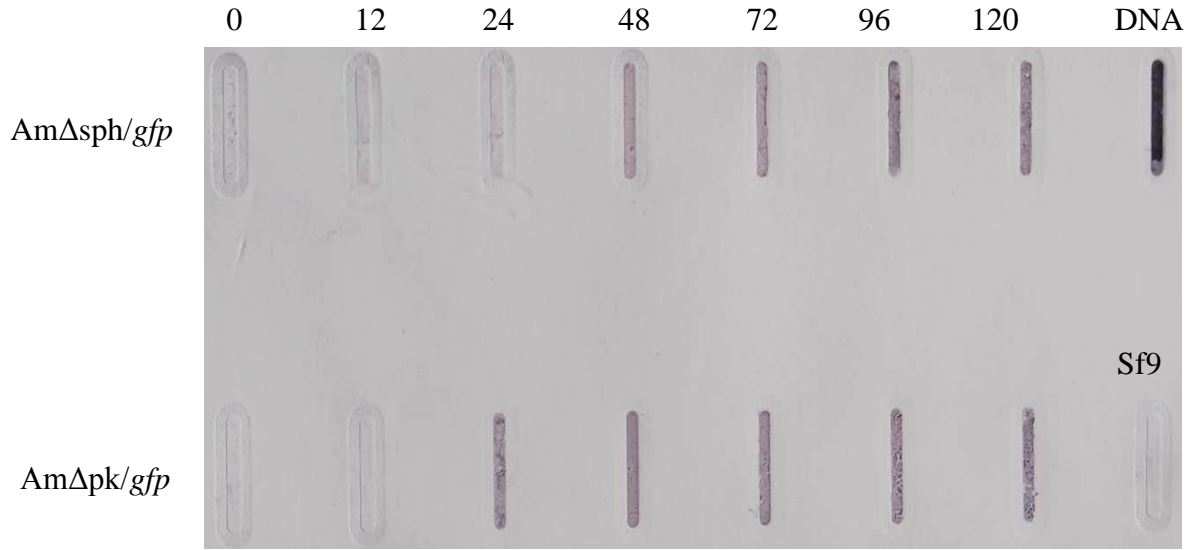
Rekombinant virüsün DNA replikasyonu, slot-blot Hibridizasyonu yöntemi ile DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) kullanılarak belirlendi. Replikasyon işlemi hem AmΔshp/gfp (pozitif kontrol) hemde AmΔpk/gfp kullanıldı. Ld652, Bm ve Sf9 hücrelerinde DNA replikasyonu incelendi. Bu yüzden, hibridizasyon işlemi için, her iki tip virüs için de geçerli olan prob seçildi. Her bir virüsten, 0., 12., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde alınan hücre lizati örnekleri membrana emdirildi. Membrandaki DNA'ların, döner durumdaki uygun sıcaklık sayesinde, işaretli prob ile hibridizasyonu sağlandı. Membranın renklendirme işlemi tamamlandıktan sonra, slot-blot hibridizasyonundan elde edilen sonuçlar kaydedildi.

Sonuçlara göre, Ld652 hücrelerinde hem yaban tip ile aynı özellikleri gösteren AmΔshp/gfp'de hem de *protein kinaz* geni bakımından kusurlu AmΔpk/gfp'de, viral DNA replikasyonu ilk olarak enfeksiyondan sonra 12. saatte görülmeye başladı ve 24. saatte replikasyon daha da yoğunlaşarak devam etti. Protein kinaz geninin çıkarılması konak olan Ld652 hücrelerinde yaban tip virüs ile karşılaştırıldığında DNA replikasyon saati bakımından farklılık göstermedi (Şekil 18).



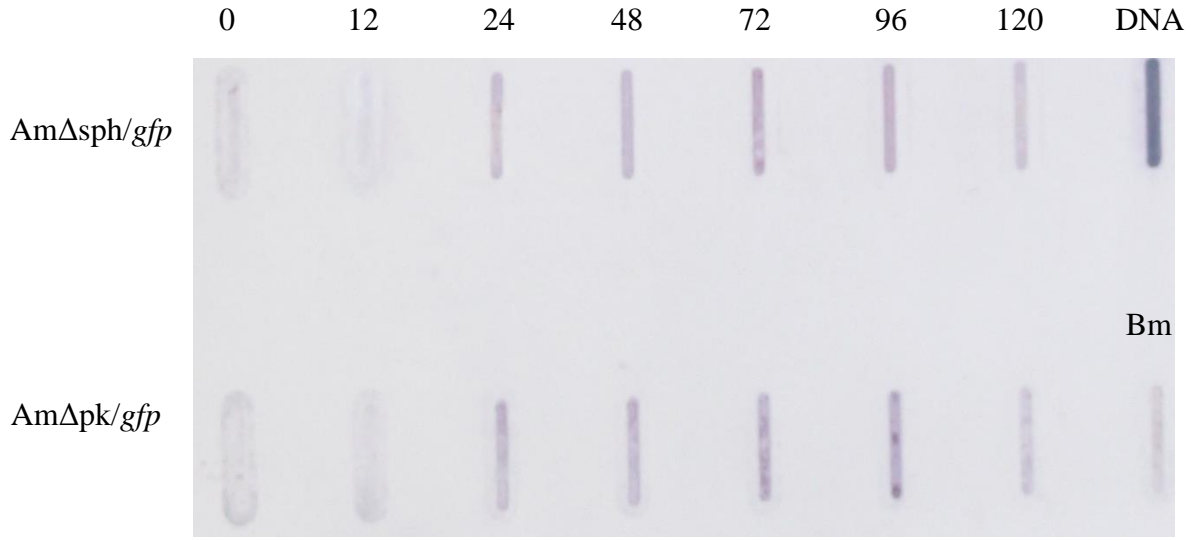
Şekil 18. Ld652 hücrelerinde virüs DNA replikasyonu. Rekombinant AmΔpk/gfp'nin DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyonu yöntemi kullanılarak, Ld652 hücrelerinde AmΔshp/gfp ile karşılaştırıldı. Rakamlar enfeksiyon sonrası örnek alınan saatleri göstermektedir.

Sf9 hücrelerindeki sonuçlara göre, *AmΔshp/gfp*'de viral DNA replikasyonu ilk olarak enfeksiyondan sonra 48. Saatte görülmeye başladı 72.saatte replikasyon daha da yoğunlaştı. Buna rağmen, AMV197 bakımından kusurlu olan *AmΔpk/gfp* için kullanılan örneklerde, ilk DNA replikasyonu *AmΔshp/gfp*'ye göre 12 saat daha erken ve 24. saatte belirlenmeye başladı (Şekil 19).



Şekil 19. Sf9 hücrelerinde virüs DNA replikasyonu. Rekombinant *AmΔpk/gfp*'nin DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyonu yöntemi kullanılarak, Sf9 hücrelerinde *AmΔshp/gfp* ile karşılaştırıldı. Rakamlar enfeksiyon sonrası örnek alınan saatleri göstermektedir.

Slot-blot deneyinin sonucuna göre, *AmΔshp/gfp* ve *AmΔpk/gfp* virüslerin Bm hücrelerindeki DNA replikasyonu, 24. saatte kontrol Ld652 hücre kültüründekine göre 12 saat daha geç başlamıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Bm hücrelerinde virüs DNA replikasyonu. Rekombinant *AmΔpk/gfp*'nin DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyonu yöntemi kullanılarak, Bm hücrelerinde *AmΔsph/gfp* ile karşılaştırıldı. Rakamlar enfeksiyon sonrası örnek alınan saatleri göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

Poksvirüslerin bir çok genine dair çok fazla bilgi olmasına rağmen, protein kinazlarla ilgili sınırlı miktarda bilgi bulunmaktadır. Poksvirüs protein kinazlarıyla ilgili ilk çalışmalar, vaksinya virüs grubuna ait B1R (Rempel ve Traktman, 1992; Lin vd.,1992) ve F10L (Lin ve Broyles, 1994) protein kinazlarına aittir. Bu çalışmalarını, diğer poksvirüs protein kinazlarıyla Fowlpoks virüs (FWPV-*pk*, Poxviridae; Afonso vd., 2000) Myksoma virüs (MYXV-*pk*, Poxviridae; Cameron vd., 1999), *Molluscum contagiosum* virüs alt tip 1 (MOCV1-*pk*, Poxviridae; Senkevich vd., 1996) ve Variola major virüs (VARV-*pk*, Poxviridae; Massung vd., 1993) ile ilgili çalışmalar takip etmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Amsacta moorei* entomopoksvirüs (AMEV)'ün AMV197 kodlu açık okuma zincirine ait genin, protein kinaz motifleri tespit edilmiştir (Muratoğlu, 2010). Ayrıca, transkripsiyon zamanı ve transkripsiyon sınıfı ile genin 5'/3' uçlarındaki proteine dönüşmeyen bölgelerinin sırası belirlenmiştir. Gen bakımından kusurlu virüs üretilmiş (*AmΔpk/gfp*) ve bu genin yaban tip virüsün replikasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Muratoğlu, 2010). Yine yapılan bir çalışmada, sferoidin proteini yerine, 28 kDa'luk GFP proteini üreten rekombinant virüsün (*AmΔshp/gfp*) yaban tip ile aynı replikasyon özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Palmer vd., 1995).

Protein kinaz geninin virüs replikasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için, DIG işaretleme sistemiyle işaretlenmiş prob ile birlikte Slot-Blot Hibridizasyon yöntemi kullanıldı. Daha önceden aynı yöntem ile gerçekleştirilen, AMEV'ye ait DNA replikasyonu çalışmalarında, AMEV DNA'sının enfeksiyondan sonraki yaklaşık 9. saatte replike olduğu rapor edilmiştir (Winter vd., 1995). Yaklaşık 23. saatte en yüksek seviyeye ulaşan DNA replikasyonu, bu saatten itibaren azalmıştır (Winter vd., 1995). Muratoğlu tarafından yapılan çalışmada ise, *AmΔpk/gfp* DNA replikasyonunun Ld652 hücrelerinde ilk kez 12. saatte görülmeye başlaması, çalışmada kullanılan DIG ile işaretleme yönteminin hassasiyetiyle ilgili bir sorundur. Ancak buna rağmen rekombinant virüsün DNA replikasyonunun, kontrol virüslerin DNA (18. saatte) replikasyonuna göre daha erken meydana geldiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise her iki bulgunun aksine, hem *AmΔpk/gfp* hem de *AmΔshp/gfp* virüslerinin Ld652 hücrelerinde DNA replikasyonunun 12. saatte başladığı sonucuna varıldı.



AMEV için *E. acrea* (BTI-EAA) (Granados ve Naughton, 1975) ve *L. dispar* (IPLB-Ld652) hücre suşları (Goodwin vd, 1990) üretken suşlar olarak tespit edilmiştir. AMEV'nin *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinde replike olduğu da gösterilmiştir (Aloui vd., 1990). Li vd. (1997) *lacZ* içeren rekombinant AMEV üretmiş ve bu virüsün böcek Ld652 ve omurgalı CV-1 hücrelerindeki replikasyon özelliklerini araştırmışlar. DNA replikasyonun belirlenmesinde dot blot yöntemi kullanılmıştır. Üretilen virüs miktarını ise Ld652 hücrelerinde plak assay yaparak belirlemişler. Bu çalışmaya benzer şekilde, tez kapsamında *AmΔpk/gfp* virüsün ana konak olan Ld652 dışındaki Sf9, Bm hücrelerindeki DNA replikasyonu belirlenerek yaban tip virüs ile karşılaştırıldı. DNA replikasyonu slot-blot tekniği kullanılarak araştırıldı. Yapılan araştırmalara göre slot blot ve dot blot tekniğinin tek farkı blot geometrisidir (Brown 2001). Sonuç olarak slot blot tekniği kullanılarak rekombinant virüsün DNA replikasyonu, yaban tip virüsün replike olduğu bu üç hücre hattında da gerçekleştiği belirlendi.

Rekombinant virüslerin belirlenmesine yönelik çalışmalarda *gfp* proteini genellikle rekombinant virüslerin takibi ve belirlenmesi aşamasında kullanılır. Popov vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada rekombinant vaksinya virüs oluşturulmuş ve *gfp* markır gen olarak kullanılması buna sadece bir örnektir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada, daha önceden oluşturulan rekombinant virüsün konsantrasyonu yaban tip ile karşılaştırıldı. Bünyelerinde *gfp* genini bulduran virüslerin EPDA yöntemi kullanılarak florasan mikroskop altında görülmesi ile karşılaştırma yapıldı. Çok fazla sayıda örnek ve saat dilimi olması plak assay yerine EPDA metodunu kullanmamıza neden oldu. Yapılan deney sonucunda Ld652, Bm ve Sf9 hücrelerinde üretilen her iki virüs arasında konsantrasyon farkı belirlendi. *AmΔpk/gfp*'nin enfektivitesinin, kontrol virüse göre (her üç hücre içinde) azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *pk* geni virüs replikasyonu için zorunlu olmamakla birlikte, bu genin genomdan silinmesi durumunda, virüsün enfektivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bm ve Sf9 hücrelerinde üretilen her iki virüsün de AMEV için ana konak olan Ld652 hücrelerinde tekrar replike olup olmadığına bakılarak kesin sonuca gidildi. Virüsün replike olacağı konağı hangi mekanizmaya göre seçtiği konusundaki çalışmalar protein-protein interaksiyon çalışmaları ile netlik kazanabilir.

AMEV'nin biyoinformatik analizlerine göre, AMV153 kodlu bir genin de bir serin/treonin protein kinaz olduğu varsayılmaktadır (Bawden vd., 2000). Bu gen üzerinde yapılmış henüz hiçbir çalışma yoktur. Muhtemelen, AMV197 geni silinen virüste

(Am $\Delta$ pk/*gfp*), AMV153 kodlu gen, AMV197 kodlu genin eksikliğini telafi edecek şekilde görev yapmaktadır. Bu yüzden, Am $\Delta$ pk/*gfp* virüs için virüs üretiminde azalma olmakla beraber, virüsün hücre kültüründeki replikasyonunun mevcudiyeti, bu silinme işleminden etkilenmemiş olabilir (Muratoğlu, 2010).

Yapılan literatür taramasında, vaksinya virüs erken gen transkripsiyonunda ATP'nin önemli rol oynadığı ve vaksinya virüse ait erken transkripsiyon faktörlerinin virüsün öz bölgesinden izole edildiği belirtilmektedir (Broyles ve Moss, 1988). Flint ve Shenk (1997) tarafında yapılan bir yayında poksvirüslere ait vaksinya virüs ailesinde özel nükleik asit dizisine bağlanma yeteneği olan viral transkripsiyonel regülatörlerden bahsedilmiş ve bunların vaksinya virüs erken transkripsiyon faktörleri (VETF) olduğu belirtilmiştir. Daha sonra Broyles (2003) tarafından yayınlanan bir derlemede VETF'lerinin A7L geni tarafından kodlanan 82 kDa'luk ve D6R geni tarafından kodlanan 70kDa'luk proteinler olduğu belirlenmiş. Gerson ve Moss (1990), A7L erken transkripsiyon faktörünün vaksinya virüs geç genlerinden sentezlendiğini belirtilmiş. Broyles ve Fester (1990) tarafından yapılan çalışma D6R erken transkripsiyon faktörünün vaksinya virüs genomundan sentezlendiğini göstermektedir.

Broyles (2003) tarafından yayınlanan derlemeye göre, erken transkripsiyonda görevli proteinler sadece virüs kökenlidir. Erken transkripsiyonun başlamasını ve sonlanmasını sağlayan faktörlerin konağa ait olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur. Erken genlerin aksine bu durum ara ve geç genler için farklıdır. Bu genlerin hem başlangıçta hem de sonlanmada ödünç olarak konak hücrenin proteinlerini kullandığı görülmüştür. Broyles'e göre bu farklılığın nedenleri zamandır. Konak proteinlerinin kullanılması transkripsiyon zamanından etkilenebilir. Ara ve geç genlerin transkripsiyonu DNA replike olmadan gerçekleşmez. Sitoplazmada yeterli miktarda DNA birikmesi ile konak proteinleri kullanılabilir. Örneğin, vaksinya virüs ara transkripsiyon faktörlerinden YY1 konak proteindir (Broyles vd., 1999). Aynı şekilde vaksinya virüs geç transkripsiyon faktörlerinden VLTF-X A2/B1 ve RBM3 konak genlerinin ürünüdür (Wright vd., 2001).

Tez kapsamında Serin/Treonin *pk* geninin trans-aktivasyonunda rol alan trans-aktivator proteinlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Muratoğlu (2010) tarafından yapılan çalışmada hem DNA sentez inhibitörü hem de protein sentez inhibitörü varlığında meydana geldiği belirlendi. Bu deneyin sonucu olarak AMV197 kodlu genin erken sınıfa ait genlerden olduğu tespit edildi. Yapılan bu çalışmada yaban tip AMEV ile enfekte Ld652 hücrelerinden Muratoğlu tarafından yapılan çalışma dikkate alınarak 4.

saatte toplam sitoplazmik protein izolasyonu yapıldı. Ayrıca tamamen kontrol amaçlı enfekte hücrelerden 24. ve 48. saatlerde, Ld652 hücrelerinden 4. saatte stoplazmik protein izolasyonu yapıldı. Bu proteinlerin tümü ve saf AMEV jelle yüklenerek SDS-PAGE yapıldı. Jeldeki proteinlerin, dizayn ettirilen prob ile hibridizasyonu sağlanarak, 5 tane protein bandının hibridizasyonu belirlendi. Bu beş bandın yaban tip AMEV hariç, diğer tüm proteinlerde görülmesi, bize hibritleşen proteinlerin *pk* geninin transaktivasyonunda rol oynayan proteinlerin virüs kökenli değil hücre kökenli olduğunu gösterdi. Broyles'in aksine, *Amsacta moorei* entomopksvirüs serin/treonin protein kinaz geninin transkripsiyonunun beş farklı hücresel protein (50 kDa, 38 kDa, 35 kDa, 27 kDa, 16 kDa) tarafından trans-aktive edildiği belirlendi.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, AMEV'nin AMV197 kodlu ORF'sine ait genin, konak seçiciliğindeki rolü ve regülasyonu belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda üretilen bu gen bakımından kusurlu virüsün yaban tip vürüse göre farklı hücrelerde DNA replikasyonu üzerindeki etkisi ve enfektivitesi belirlenmiştir. Ayrıca bu genin trans-aktivasyonunda rol oynayan proteinler araştırılmıştır.

1. AMV197 kodlu ORF'ye ait serin/treonin protein kinaz geninin transaktivasyonunda rol alan proteinler belirlendi.
  - a. SDS-PAGE ile yapılan protein profili karşılaştırmasında hücre proteinleri (4.saat) ve yaban tip virüs (AMEV) enfeksiyonu sonucu elde edilen proteinlerin (4., 24., 48. saat) protein sentez profilinde herhangi bir farklılık tespit edilemedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan AMEV'de ilave bantlar tespit edildi.
  - b. Hibridizasyon sonucu tüm saat dilimlerinde hem hücreden hemde yaban tip virüsle enfekte edilen hücreden izole edilen protein bantlarında bu gene ait, prob ile hibritleşen yaklaşık 50 kDa, 38 kDa, 35 kDa, 27 kDa, 16 kDa ağırlığında ortak 5 protein bandı tespit edildi.
  - c. Hibritleşmenin yaban tip AMEV'de olmayıp hem virüsle enfekte hücrelere hem de enfekte olmayan hücreye ait proteinlerde olması *pk* geninin trans-aktivasyonunda rol oynayan proteinlerin virüs kökenli değil hücre kökenli olduğunu gösterdi.
2. Kontrol (*AmΔshp/gfp*) ve rekombinant (*AmΔshp/gfp*) virüs stok konsantrasyonları EPDA metodu ile sırasıyla  $10,37 \times 10^7$  pfu/ml ve  $2,37 \times 10^7$  pfu/ml olarak belirlendi.
3. Ld652 hücrelerinde üretilen rekombinant virüs miktarında kontrole göre yaklaşık 1,5 kat azalma belirlendi.
4. Sf9 hücrelerinde üretilen rekombinant virüs miktarında kontrole göre yaklaşık 5 kat azalma belirlendi.
5. Bm hücrelerinde üretilen rekombinant virüs miktarında kontrole göre yaklaşık 1,7 kat azalma belirlendi.

6. Daha önceden oluşturulan rekombinant *AmΔpk/gfp* virüs ile *AmΔsph/gfp* virüs DNA replikasyonu ve enfektivite bakımından karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda;
- a. Ld652 hücrelerinde viral DNA replikasyonununun hem kontrol virüste hemde rekombinant virüste 12. saatte meydana geldiği tespit edildi. Her iki virüstedeki GFP ifadesi 24. saatte belirlendi.
  - b. Sf9 hücrelerinde viral DNA replikasyonunu rekombinant virüste 24. saatte meydana gelirken kontrol virüste 48. saatte meydana geldiği tespit edildi. Her iki virüste de GFP ifadesi 48. saatte belirlendi.
  - c. Bm hücrelerinde viral DNA replikasyonunu hem kontrol virüste hem de rekombinant virüste 24. saatte gerçekleştiği sonucuna varıldı. Her iki virüste de GFP ifadesi 48. saatte gözlemlendi.

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, AMEV'in AMV197 kodlu geninin transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlayan proteinler ve bu genin farklı konaklar üzerindeki enfektivitesine etkisi ve DNA replikasyonu belirlendi. Çalışma sonuçlarından hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

1. AMV197'nin transkripsiyonunu aktive ettiği düşünülen beş hücre kökenli proteinin ileri seviyede analizleri yapıp hangi proteinler olduğu belirlenebilir.
2. Sonuca ulaşılamayan pH aralıkları için 2D jel elektroforezi tekrarlanıp, sonuçlar değerlendirilerek proteinlerin pH'ları belirlenebilir.
3. Sf9 hücre kültürlerinde verimin düşük olmasına neden olan viral/hücre sel faktörler araştırılabilir.

## 7. KAYNAKLAR:

- Aloui-Ismaili, M.H. ve Richardson, C.D., 1990. Identification and characterization of a filament-associated protein encoded by *Amsacta moorei* entomopoxvirus, Journal of Virology, 70, 2697.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G. ve Jessee, J., 1996. Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac® baculovirus expression system, Focus, 17, 53-58.
- Arif, B.M., 1984. The entomopoxviruses, Advances in Virus Research, 29, 195-213.
- Arif, B.M., 1995. Recent Advances in The Molecular Biology of Entomopoxviruses, Journal of General Virology, 76, 1-13.
- Arif, B. M. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, The entomopoxviruses, E. Kurstak, Editör, Dekker, New York, 175-195.
- 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 ve comparison with other poxviruses, Virology, 274, 120-139.
- 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, European Molecular Biology Organization Journal, 5, 1951-1957.
- Bilimoria, S. L. ve Arif, B. M., 1979. Subunit protein and alkalineprotease of entomopoxvirus spheroids, Virology, 96, 596-603.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Broyles, S. S., 2003. Vaccinia virus transcription, Journal General Virology, 84, 2293-2303.
- Broyles, S. S. ve Fesler, B. S., 1990. Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor, Journal of Virology, 64, 1523-1529.

- Broyles, S. S., Liu, X., Zhu, M. ve Kremer, M., 1999. Transcription factor YY1 is a vaccinia virus late promotor activator, Journal of Biological Chemistry, 274, 35662-35667.
- Broyles, S. S. ve Moss, B., 1988. DNA dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor, Journal of Biological Chemistry, 263, 10761-10765.
- Brown, T. 2001. Dot and Slot Blotting of DNA. Current Protocols in Molecular Biology. 21, 2915-2920.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. ve McFadden, G., 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus, Virology, 264, 298-318.
- Ciccarone, V. C., Polayes, D. ve Luckow, V. A., 1997. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector, 13, U. Reisch, ed., Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- 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.
- 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.
- Flint, J. ve Shenk, T., 1997. Viral transactivating proteins. Annual Review Genetic, 31, 177-212.
- Gerson, P. D. ve Moss, B., 1990. Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late gene, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87, 4401-4405.
- 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 Naughton, M., 1975. Development of *Amsacta moorei* entomopoxvirus in ovarian and hemocyte cultures from *Estigmene acrea* larvae, Intervirology, 5, 62.



- Gruidl, M. E., Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1992. Mapping and molecular characterization of a functional thymidine kinase from *Amsacta moorei* entomopoxvirus, Virology, 186, 507-516.
- 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., Li, Y., Feller, J. A. ve Moyer, R. W., 1996. The *Amsacta moorei* entomopoxvirus spheroidin gene is improperly transcribed in vertebrate poxviruses, Virology, 224, 427-436.
- 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.
- Hukuhara, T., Xu J. ve Yano K., 1990. Replication of anentomopoxvirus in two lepidopteran cell lines, Journal of Invertebrate Pathology, 56, 222-232.
- Jacob, T., Broeke, C.V. ve Favoreel, H. W., 2011. Viral serine/ threonine protein kinases, Journal of Virology, 85, 1158-1173.
- Johnston, J. B. ve McFadden, G., 2004. Technical knockout: Understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. Cell. Microbial., 6, 695-7005
- King L. A., Wilkinson N., Miller D. P. ve Marlow S. A., 1998. Entomopoxvirus. Miller LK. Andrew Ball L. eds. *The Insect Viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1-25.
- Krebs, E. G., Graves, D. J. ve Fischer, E. H., 1959. Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase, Journal of Biological Chemistry, 234, 2867-2873.
- Langridge, W. H. R., 1983. Partial characterization of DNA from five entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 42, 369-375.
- Li, Y., Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1997. Transient, nonlethal expression of genes in vertebrate cells by recombinant entomopoxviruses, Journal of Virology, 71, 20, 9557–9562.
- Lin, S. Q ve Broyles, S. S., 1994. Vaccinia protein kinase 2:a second essential serine/threonine protein kinase encoded by vaccinia virus, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91, 7653-7657.

- Lin, S. Q., Wen, C. ve Broyles, S. S., 1992. The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase, Journal Virology, 66, 2717–2723.
- Lipa, J.J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Polve.
- Massung, R. F., Esposito, J. J., Liu, L. I., Qi, J., Utterback, T. R., Knight, J. C., Aubin, L., Yuran, T. E., Parsons, J. M. ve diğerleri, 1993. Potential virulence determinants in terminal regions of Variola smallpox virus genome, Nature, 366, 748-751.
- Merrihew, R. V., Clay, W. C., Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Dallas, W. S. ve Kost, T. A., 2001. Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells, Journal of Virology, 75, 2, 903–909.
- Moss, B., 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development, Science, 252, 1662-1667.
- Moss, B., 2001. Poxviridae: The viruses and their replication, Fields Virology, David M. Knipe, Peter M. Howley Editörler, 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.
- Muratoğlu, H., 2010. *Amsacta moreii* entomopoksvirüs protein kinaz geninin karakterizasyonu ve fonksiyonel analiz, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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.
- Palmer, C. P., Miller, D. P., Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M. ve King, L. A., 1995. Genetic modification of an entomopoxvirus: deletion of the spheroidin gene does not affect virus replication *in vitro*, Journal of General Virology, 76, 15-23.
- Rempel, R. E. ve Traktman P., 1992. Vaccinia virus B1 kinase: phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants and enzymatic characterization of recombinant proteins, Journal of Virology, 66, 4413–4426.
- Popov, S., 2009. Recombinant Vaccinia Viruses via Green Fluorescent Protein Selection, NA Cell Biol, 28, 103–108
- 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.

- 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.
- Senkevich, T. G., Bugert, J. J., Sisler, J. R., Koonin, E. V., Darai, G. ve Moss, B., 1996. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: Prediction of specific host response-evasion genes, Science, 273, 813-816.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2005. Entomopoksvirüsler ve biyolojik kontrol, TürkiyeParazitoloji Dergisi, 29, 4, 280-286.
- Sriskantha, A., Osborne, R. J. ve Dall, D. J., 1997. Mapping of the *Heliothis armigera* entomopoxvirus (HaEPV) genome, and analysis of genes encoding the HaEPV spheroidin and nucleoside triphosphate phosphohydrolase I proteins, Journal of General Virology, 78, 3115-3123.
- Stanbridge, L. J., Dussupt, V. ve Maitland, N. J., 2003. Journal of Biomedical Biotechnology, 2, 79-91.
- URL-1. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>, 21 Ekim 2010.
- Vago, C., 1963. A new type of insect virus, Journal of Insect Pathology, 5, 275-276.
- Vlient, V. K., Mohammed, R. M., Zhang, L., Villa, N. Y., Werden, S. J., Liu, J. ve McFadden, G., 2009. Poxvirus proteomics and virus-host protein interaction, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73, 730-749.
- 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.
- Werden, S. J., Rahman, M. M. ve McFadden, G., 2008. Poxvirus host range genes, Advances in Virus Reserch, 71, 135-171.
- Winter, J., Hall, R. L. ve 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.
- Wright, C. F., Oswald, B. W. ve Dellis, S. 2001. Vaccinia virus late transcription is activated in vitro by cellular heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, Journal of Biological Chemistry, 276, 40680-40686.
- Yuen, L. ve Moss, B., 1987. Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of Vaccinia virus early genes, Biochemistry, 84, 6417-6421.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokula 24 Şubat İlkokulu'nda başlayarak eğitimine Cumhuriyet İlköğretim okulunda devam etti ve liseyi Tevfik Serdar Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2005–2006 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesinde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında bu bölümden Biyolog ünvanıyla mezun oldu. Mezun olduktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.