

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO IRIDESCENT VIRUS'E AIT 337L VE 295L GENLERİNİN İFADESİ VE
PROTEİNLERİNİN BİRBİRLERİYLE ETKİLEŞİMİ***

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Eray KÜÇÜK

**MAYIS 2014
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO IRIDESCENT VIRUS'E AİT 337L VE 295L GENLERİNİN İFADESİ VE
PROTEİNLERİNİN BİRBİRLERİYLE ETKİLEŞİMLERİ***

Biyolog Eray KÜÇÜK

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.05.2014
Tezin Savunma Tarihi : 26.05.2014**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Eray KÜÇÜK tarafından hazırlanan

**CHILO IRIDESCENT VIRUS'E AİT 337L VE 295L GENLERİNİN İFADESİ VE
PROTEİNLERİNİN BİRBİRLERİYLE ETKİLEŞİMLERİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 13 / 05 / 2014 gün ve 1553 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Chilo Iridescent Virüs’e Ait 337L ve 295L Genlerinin İfadesi ve Proteinlerinin Birbirleriyle Etkileşimi” 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 sırasında gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, tezin değerlendirilmesinde ve geliştirilmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan sayın hocam Emine ÖZŞAHİN’ne, tezin hazırlanması sırasında desteklerini esirgemeyen Gözde GÖÇMEN’e ve laboratuvar arkadaşlarıma, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakar aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölümü yönetimine teşekkürlerimi sunarım.

Eray KÜÇÜK

Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Chilo Iridescent Virüs’e Ait 337L ve 295L Genlerinin İfadesi ve Proteinlerinin Birbirleriyle Etkileşimleri” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
05/05/2014

Eray KÜÇÜK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Böcek Virüsleri.....	3
1.3. Iridovirüslerin Keşfi	6
1.3.1. Iridoviridae Familyasının Oluşturulması.....	6
1.3.2. Iridoviridae Familyasının Özellikleri	8
1.3.3. Iridovirüslerde Genom Özellikleri.....	9
1.3.4. Iridovirüslerin Replikasyonu	10
1.3.5. Iridovirüslerde Gen İfadesi	11
1.4. Chilo Iridescent Virüs (CIV, IIV-6)	13
1.4.1. CIV'nin Genel Özellikleri	13
1.4.2. CIV'nin Replikasyonu ve Transkripsiyonel Regülasyonu	14
1.5. Bakülovirüsler	15
1.5.1. Bakülovirüslerin Biyolojisi.....	16
1.5.2. Bakülovirüslerin Replikasyonu	17
1.5.3. Bakülovirüs Ekspresyon Sistemi (BEVS)	18
1.5.4. BEVS Genel Özellikleri	19
1.5.5. BEVS'te Baküloviral Vektörler	19
1.6. Protein Etkileşimleri	21
1.6.1. Protein-Protein Etkileşimlerinin Çeşitleri	22

1.6.2.	Protein-Protein Etkileşimlerinin Analizleri	23
1.6.3.	Viral Enfeksiyon Sırasında Protein-Protein İnteraksiyonları Önemi	24
1.7.	Çalışmanın Amacı	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1.	337L ve 295L Genlerinin Elde Edilmesi	27
2.1.1.	337L Geninin Elde Edilmesi	27
2.1.2.	295L Geninin Elde Edilmesi	27
2.2.	HTB Plazmidinin Elde Edilmesi	28
2.3.	337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerinin Oluşturulması ve Transformasyonu	29
2.3.1.	Kompotent <i>E. coli</i> JM101 Hücrelerinin Hazırlanması	29
2.3.2.	337L Geninin HTB Plazmidine Klonlanması ve Transformasyonu	30
2.3.3.	295L Geninin HTB Plazmidine Klonlanması ve Transformasyonu	30
2.4.	337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerinin <i>E. coli</i> DH10 Bac Hücrelerine Transformasyonu	32
2.4.1.	Kompotent <i>E. coli</i> DH10 Bac Hücrelerinin Hazırlanması	32
2.4.2.	337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerinin DH10Bac Hücrelerine Transformasyonu.....	32
2.5.	337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerinin Sf9 Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu	32
2.5.1.	Sf 9 Böcek Hücrelerinin Temini ve Devamlılığı.....	32
2.5.2.	HTB-337L ve HTB-295L İçeren <i>E. coli</i> DH10Bac Hücrelerinden Bakmid İzolasyonu	33
2.5.3.	HTB-337L ve HTB-295L Gen Kasetlerine Ait Bakmidlerin Sf9 Böcek Kültürlerine Transfeksiyonu.....	33
2.5.4.	337L ve 295L Genlerini İçeren P1 Viral Stoklarının Üretimi ve İzolasyonu	34
2.5.4.1.	337L ve 295L Genleri İçeren Bakülovirüs Stoklarının Çoğaltılması.....	34
2.5.5.	337L ve 295L Genlerine Ait Rekombinant Proteinlerin Üretimi, İzolasyonu ve Belirlenmesi	36
2.5.5.1.	Sf9 Hücrelerinin 337L ve 295L Genlerini İçeren Viruslerle Enfeksiyonu ve Protein Saflaştırılması.....	36
2.5.5.2.	337L ve 295L Genlerine Ait Rekombinant Proteinlerin Konsantrasyonunun Ölçümü.....	37
2.5.5.3.	337L ve 295L Genlerine Ait Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri ile Belirlenmesi	37
2.5.5.3.1.	337L ve 295L Rekombinant Protein Örneklerinin SDS-PAGE’de Yürütülmesi.....	37

2.5.5.3.2.SDS-PAGE Jelin Membrana Aktarılması ve Görüntülenmesi	38
2.6. 337L ve 295L Proteinlerinin Birbiri Arasındaki Etkileşimlerin Belirlenmesi	38
3. BULGULAR	40
3.1. 337L ve 295L Genlerinin Elde Edilmesi	40
3.1.1. 337L Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	40
3.1.2. 295L Genin pGBK-T7 Plazmidinden Elde Edilmesi	41
3.2. 337 Genin CloneJET Transfer Vektörüne Klonlanması ve Koloni PCR.....	42
3.3. 337L-HTB Gen Kasetini İçeren Kolonilerin PCR ile Doğrulanması.....	42
3.4. 295L-HTB Gen Kasetini İçeren Kolonilerin Kesim Reaksiyonu ile Doğrulanması	43
3.5. 337L-HTB Bakmid Kolonilerinin PCR ile Doğrulanması	44
3.6. 295L-HTB Bakmid Kolonilerinin PCR ile Doğrulanması	45
3.7. Sf9 Hücrelerinin 337L-HTB ve 295L-HTB Genlerini İçeren Bakmidler ile Enfeksiyonları.....	46
3.8. 337L ve 295L Proteinlerinin Western Blot Analizi ile Gösterilmesi	49
3.8.1. 337L Proteininin Western Blot Analizi	49
3.8.2. 295L Proteininin Western Blot Analizi	50
3.9. 337L ve 295L Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Gösterilmesi	51
4. TARTIŞMA.....	52
5. SONUÇLAR.....	56
6. ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VIRUS'E AİT 337L VE 295L GENLERİNİN İFADESİ VE
PROTEİNLERİNİN BİRBİRLERİYLE ETKİLEŞİMLERİ

Eray KÜÇÜK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. İsmail DEMİR
2014, 66 Sayfa

Chilo Iridescent Virüs (CIV) Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera ve Orthoptera ordolarına ait çok sayıda böceği enfekte eden geniş konak spektrumuna sahip bir böcek virüsüdür. CIV virionları endositosis ile konak hücrelerine girer ve viral genom bir sinyal ile nükleusa yönlendirilir. CIV 337L geni açık okuma zinciri (412 amino asit) glikoprotein hormonu beta zincir sinyalini ve 295L geni açık okuma zinciri (1343 amino asit) ise iki yönlü nükleer lokalizasyon sinyalini kodlamaktadır. Askovirüslerde bulunan, 337L proteininin homologları ile yapılan çalışmalar, bu proteinin viral enfeksiyonun başlayabilmesi için konak hücreye tutunmayı sağladığını göstermiştir. 295L proteininin diğer Frog Virüs 3 (FV3)'te bulunan homologu ile yapılan çalışmada ise bu proteinin viral genomun nükleusa iletilmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu iki proteinin etkileşimleri viral enfeksiyonun hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, 337L HA-taq ve 295L His-taq içerecek şekilde Bac-to-Bac ekspresyon sisteminde *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinde ifade edildi. Yapılan Western Blot analizleriyle 337L'ye ait proteinin yaklaşık 46 kDa ve 295L'ye ait proteinin ise yaklaşık 95 kDa olduğu belirlendi. Pull down analizi ile 337L ve 295L proteinleri arasındaki etkileşim, HA antikoru kullanılarak Western Blot ile analiz edildi ve 46 kDa'luk bant gösterildi. Sonuç olarak, saflaştırılan 295L'ye bağlanarak 337L'nin de saflaştırıldığını ve böylece 337L ve 295L gen ürünleri arasındaki etkileşim kanıtlandı.

Anahtar Kelimeler: 337L, 295L, Pull Down, Protein Etkileşimi, CIV

Master Thesis

SUMMARY

PROTEIN INTERACTION AND EXPRESSION OF 337L ORF AND 295L ORF
BELONGS TO *CHILO* IRIDESCENT VIRUS

Eray KÜÇÜK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Doç. Dr. İsmail DEMİR
2014, 66 Pages

Chilo Iridescent Virus (CIV) belongs to Iridoviridae family and has large host spectrum because it infects insects belong to Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera and Orthoptera. After the entry of CIV virions to host cells via endocytosis, viral genome is directed to nucleus. CIV of 337L ORF (412 amino acids) encodes glycoprotein beta hormones signal and 295L ORF (1343 amino acids) encodes bipartite nuclear localization signals. Study of homologous of 337L protein belong to ascoviruses showed that the encoded protein facilitate attachment of virus and beginning of viral infection. Another study on homolog of 295L protein in Frog Virus 3 (FV3) showed that expressed protein plays a role for delivering of viral genome to nucleus. Interaction of these proteins is important in frame of making the viral infection quick and efficient. In this study, 337L and 295L were expressed in Sf9 cells using Bac-to-Bac system containing HA-tag and His-tag respectively. Western Blot analysis showed that 337L and 295L encoded proteins about 46 kDa and 95kDa, respectively. Protein-protein interaction between 337L and 295L proteins were demonstrated with pull down assay by using HA-antibody. The band that has a 46 kDa size was shown. As a result, 337L protein also purified with binding to purified 295L and thus the interaction between 337L and 295L gene products was demonstrated.

Key Words: 337L, 295L, Protein Interaction, Pull Down, CIV

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Böcek larvasının gömülü bir virüs ile enfeksiyonu	3
Şekil 2.	<i>Galleria mellonella</i> ve <i>Costelytra zealandica</i> 'da iridovirüs enfeksiyonu.	4
Şekil 3.	Iridovirüs'e ait virion yapısı ve kapsid sayısı	9
Şekil 4.	Iridovirüslerde terminal redundansinin şematik gösterimi	10
Şekil 5.	Frog virüs 3 (FV3) DNA'sının replikasyon modeli.....	11
Şekil 6.	Bir genin örnek modellenmesi, UTR: okunmayan bölge	11
Şekil 7.	Iridoviridae familyasında transkripsiyon modellenmesi.....	12
Şekil 8.	<i>Chilo Iridescent virüs</i> 'ünün transkripsiyon haritası.....	15
Şekil 9.	Bakülovirüs enfeksiyon döngüsü	18
Şekil 10.	Yaban tip, rekombinant tip bakülovirüslerin viral döngüsü	19
Şekil 11.	Klasik ve lineer bakülovirüs vektörleri.....	20
Şekil 12.	Bakmid ve yarı otomatik bakülovirüs vektörleri	21
Şekil 13.	pFastBac 1.2 HTB vektör haritası.....	29
Şekil 14.	337L geninin HTB'ye klonlanması	31
Şekil 15.	295L geninin HTB'ye klonlanması	31
Şekil 16.	337L ve 295L genleri içine alan <i>E. coli</i> DH10Bac hücresi	33
Şekil 17.	337L-HTB ve 295L-HTB gen kasetlerinin transfeksiyonu ve virüs çoğaltılması	35
Şekil 18.	337L geninin PCR ile çoğaltılması	40
Şekil 19.	295L <i>XhoI</i> kesimi.....	41
Şekil 20.	295L <i>BamHI</i> kesimi	41
Şekil 21.	337L içeren doğrulanmış koloniler	42
Şekil 22.	337L-HTB gen kasetinin PCR ile doğrulanması	43
Şekil 23.	337L ve 295L doğrulama kesimi	44
Şekil 24.	337L-HTB gen kasetinin bakmid PCR ile doğrulanması	45
Şekil 25.	295L-HTB gen kasetinin bakmid PCR ile doğrulanması	46
Şekil 26.	Sf9 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkiler	47
Şekil 26.	Sf9 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkiler:	48
Şekil 27.	337L proteinin Western blot ile gösterimi	49

Şekil 28.	295L proteininin Western blot analizi	50
Şekil 29.	337L-295L protein etkileşiminin Western blot ile gösterimi	51

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Böcek virüsleri	5
Tablo 2. Iridoviridae familyasının sınıflandırılması	7
Tablo 3. Baküloviruslerin sistematığı.....	16

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AcMNPV	: <i>Autographa californica</i> MNPV
A+T	: Adenin ve timin nükleotit
ATG	: Metiyonin başlangıç kodonu
BEVS	: Bakülovirüs ekspresyon sistemi
BmNPV	: <i>Bombyx mori</i> NPV
Bp	: Baz çifti
BV	: Tomurcuklanmış virüs
CBB	: Commasie brilliant blue
CIV	: Chilo Iridescent Virus
Dh10Bac	: Özel kompotent hücreler
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincirli deoksiribonükleik asit
KTGX1	: Kanamisin, tetrasiklin, gentamisin, x-gal, IPTG içeren agar
FBS	: Fetal bovine serum
FV3	: Frog Virüs 3
G+C	: Guanin ve sitozin nükleotit
HA	: Hemaglutinin
HIS	: Histidin
MNPV	: Çoklu nükleopolihedra virüs
mRNA	: Mesajcı RNA
ORF	: Açık okuma zinciri
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PIB	: Gömülü virüs yapısı
PBS	: Phosphate buffered saline
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: SDS içeren poliakrilamid jel elektroforezi
Sf9	: <i>Spodoptera frugiperda</i> ' dan böcek hücre kültürü

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Böcek virüsleri, böcekleri enfekte eden patojenik formlardır. Bunlar, dünya üzerinde çalışılan en dikkat çekici enfektif yapılardandır. Bu formlar böceklerin yaşamlarındaki çeşitli metabolik olaylara entegre olarak böcek biyolojilerini etkilerler. Virüsler tüm hücreler ve organizmalarda olduğu gibi, böceklerde de hastalık etmeni olarak bulunur. Bu virüsler faydalı böceklerde hastalık yaparak ekonomik zarar oluştururken, zararlı böceklerde enfeksiyon oluşturarak zararlı böceklerle mücadelede kullanılmalarına imkan sağlarlar.

Gelişen teknolojiler böceklerde bulunan virüslerin kolaylıkla tanımlanıp, yararlı biçimde kullanılmalarını sağlamıştır. Böcek virüsleri model organizma, tedavisi zor olan hastalıklara karşı gen terapi vektörü, arzu edilen genlerin ifadesinde ekspresyon vektörü ve biyolojik mücadele amacıyla kullanılmaktadır.

Tıp alanında ve özellikle hastalığın kaynağının ulaşılması zor olan durumlarda, böcek virüsleri ormugalı canlılarda enfektif olmadıklarından dolayı rahatlıkla kullanılmaktadır. Böcek virüslerinden yararlanılarak oluşturulan gen terapi vektörleri gen susturulması, yararlı mutasyon ve nokta protein üretimi örneklerinde toksin etkiler oluşturmadan tedaviye yardım amaçlı kullanılabilirler.

Gen dizileme yöntemleri geliştikçe insanların spesifik diziden protein üretme çabaları takdirle karşılanmış ve bu amaçla ökaryotik, prokaryotik veya viral sistem olarak model organizmalar keşfedilmiştir. Böcek hücre kültürlerinde istenilen dizilerden protein üretimini sağlamak için en yaygın kullanılan sistem bir böcek virüsü olan bakülovirüsü temel alan ekspresyon yöntemleridir.

Böcek virüsleri kullanılarak yapılan zirai mücadele geleceği parlak olan bir biyoteknolojik yöntemdir. Böcek virüslerinin biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmalarının pek çok avantajı vardır. Dar konak spektrumuna sahip oldukları için direkt olarak hedef üzerinde etkilidirler. İnsanlarda hastalık oluşturmadıkları için laboratuvar ortamında rahatlıkla çalışılabilirler ve kolaylıkla degridere olabilmektedirler. Virüsler birçok böcek takımıyla bağlantılıdır. Bunların büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır. Böceklerde enfeksiyon oluşturan virüsler 14 grup altında toplanmıştır.

Böceklerden elde edilen bu virüslerin çalışılması ve kullanılabilir hale getirilmesi için böcek virüslerinin *in vitro* şartlarında çoğaltılması ve devamlılığı gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmaların yapılabilmesi için böcek hücrelerinin *in vitro* şartlarda devamlılığı sağlanmalıdır. Böcek hücrelerinin *in vitro* ortamda daimi şekilde kullanımının keşfi 1962 yılında Grace tarafından yapılmıştır (Grace, 1962). Bu keşifle birlikte *in vitro* ortamda klonlanan genlerin ifadeleri uygun görülen böcek hücre kültürlerinde kolayca yapılabilmektedir. Böcek hücre kültürü genlerin ifadelerinin yanı sıra birçok avantajlara da sahiptir. Zor bulunan ve yanına yaklaşılamayan hayvanlarla çalışılmamasının önüne geçilmiş oldu. Ayrıca böcek hücrelerinin ortam şartları istenildiği gibi ayarlanabilmektedir. Ortam koşullarından pH, O₂ ve CO₂ oranı öncelikli ayarlanabilen elemanlardır. Deney koşullarına göre hem kimyasal olarak hem de fiziksel olarak kültür ortamlarına müdahale edilmesi oldukça kolaydır.

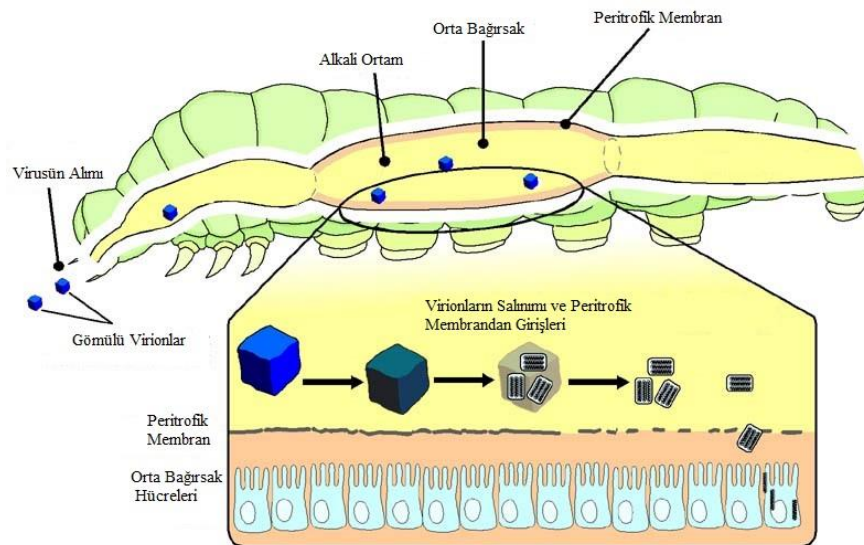
Virüsler enfekte ettikleri ister omurgalı, ister omurgasız hayvan olsun, her zaman onların nükleik asit yapıları ile sıkı bir ilişki içindedir. Virüslerin genomu düşük düzeydeki bir canlı ile karşılaştırıldığı zaman oldukça küçük boyuttadır. Virüslerin konakları büyük genomları ile virüslerin saldırılarına karşı gen regülasyon ve replikasyon sistemlerinde karmaşık, ancak bir o kadarda etkili savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Virüsler, bu savunma sistemlerine karşı kendilerine ait genomların limitlerini zorlamaktadır. Bu zorlama hususu; üst üste binmiş gen gruplarının kullanımı, savunma mekanizmalarını durdurucu maddelerin sentezi (cis yerine trans molekül) gibi olaylar ile çözümlenmektedir (Cann, 1993).

Genlerin ifade ettiği proteinlerin geniş ölçekte üretimini ve karakterizasyonunu yapabilmek oldukça önemlidir. Bu nedenle, böcek hücre kültürlerinde protein üretimi yapmak için çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Bakülovirüs ekspresyon sistemi (BEVS) en çok tercih edilenlerinden biridir. BEVS'in çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Avantajları; büyük bir gen parçasının kolaylıkla klonlanabilmesi, güçlü promotorların olması, genlerin yüksek oranda ifade edilmesi, temporal faktörlerin olması, güvenilir olması ve kullanım kolaylığı sağlaması şeklindedir. Dezavantajları ise glikolisilasyon ve kesintili ekspresyondur. Bu avantajlarla üretilen proteinler, biyolojik mücadele etmeni olarak hem doğal dengenin sürekliliği açısından hemde insanlarda hastalık yapabilen ve toksin birikimine sebebiyet veren kimyasallara karşı önemli bir koz olarak kullanılmalıdır.

Proteinler *in vitro* sistemlerde üretilirken, doğal metabolizma sırasında oluşan ve birbirleri ile etkileşimde olan proteinlerden mahrum kalırlar ve düzgün şekilde sentezlenemezler. İstenilen dizilere ait olan proteinler *in vivo* sistemlerde yaptıkları etkileşimleri inceleyen bilim insanları özellikle viral enfeksiyon kökenli hastalıkların tedavilerinde ilerlemeler sağlamışlardır. Enfeksiyon başlangıcı ve sonrasında oluşan proteinlerin tanımlanması, ayrıca birbirleri ile hangi etkileşim sonucunda enfeksiyonun nasıl ilerlediğini anlamak hem tıp alanında hem de moleküler çalışmalarda oldukça önemlidir.

1.2. Böcek Virüsleri

Böcek virüsleri 20'den fazla gruba ayrılmış ve bunlar da 14 viral familya altında sınıflandırılmışlardır (Evans ve Shapiro,1997). Böcek virüsleri gömülü ve gömülü olmayan şekilde iki gruba ayrılır. Gömülü virüslerde protein bir matriks içinde gömülü iken, gömülü olmayanlarda böyle bir protein yapı yoktur. Gömülü yapı, bakülovirüslerde polihedral inklüzyon yapı (PIB) olarak adlandırılır. Bu yapı virionların zor koşullara karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Böcek virüslerinin enfeksiyon oluşturabilmeleri için böcekler tarafından yenilmeleri gerekmektedir. Böcek tarafından yenilen virüs, protein matriks içine gömülü ise gömülü olduğu yapı böceğin orta bağırsağındaki alkali ortamda çözülür. Serbest kalan virionlar böceğin bağırsak hücrelerinden geçerek vücuda yayılmakta ve zararlılık ölümüne sebep olmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Böcek larvasının gömülü bir virüs ile enfeksiyonu (URL-1)

Doğal ortamında kristalize durumda bulunan bakülovirüse ait PIB yapıları yaprak üzerinde veya böceğin beslendiği ortamda bulunurlar. Beslenen böcek doğal yollar ile virüslerin gömülü yapılarını da yemektir. Sindirim yolundan geçerek aktifleşmek için alkali ortam arayan PIB'ler vrionlarını orta bağırsakta salarlar ve peritrofik membrandan orta bağırsak hücrelerine girişleri gerçekleşir. Bu şekilde enfeksiyon ilerlemektedir ve çeşitli fiziksel değişiklikler oluşturmaktadır.

Nükleopolihedrovirüsler ile enfekte olan larvalar beyaz renge dönüştükten sonra parçalanır veya siyah bir renge döner. Granülozis virüs enfeksiyonları böcek vücudunu sütlü beyaz renge dönüştürür. Entomopoksvirüs enfeksiyonları siyah böcekte beyaz noktalar ile gözlemlenir. İridovirüs enfeksiyonları böceğin mavi-yeşil görülmesini sağlar (Şekil 2). Böcek patojeni virüsler ile ilgili çalışmalar özellikle son zamanlarda hızlanmış ve halen devam etmektedir. Dünya üzerinde böcek virüslerinin izolasyonu ve karakterasyonu üzerine yapılan çalışmalarda böceklerde enfeksiyon oluşturan virüsler hala keşfedilmektedir.



Şekil 2. *Galleria mellonella* ve *Costelytra zealandica*'da iridovirüs enfeksiyonu (URL-2,3)

Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera ve Orthoptera başta olmak üzere 10 farklı omurgasız familya üzerinde enfektif olan böcek virüsleri, konaklarını farklı safhalarda enfekte ederler. İridoviridae üyeleri konaklarını larva safhasında enfekte ederlerken, reoviridae üyeleri ise larva, pupa ve ergin dönemlerde enfektif olurlar (Tablo 1).

Tablo 1. Böcek virüsleri*

Virüs Grupları	Genom	Konak türü	Konak Safhası
<i>Baculoviridae</i> NPV ve GV	dsDNA	Coleoptera Diptera Hymenoptera Lepidoptera Neuroptera Siphonaptera Thysanura Trichoptera	Larva, bazen pupa veya ergin
<i>Reoviridae</i> CPV	dsRNA	Diptera Hymenoptera	Larva, pupa ve ergin
<i>Entomopoxvirinae</i> EPV	dsDNA	Coleoptera Diptera Hymenoptera Lepidoptera Orthoptera	Larva ve ergin
<i>Iridoviridae</i> IV	dsDNA	Tüm Böcekler Diğer Omurgasızlar	Larva
<i>Ascoviridae</i>	dsDNA	Lepidoptera (<i>Noctuidae</i>)	Larva
<i>Polydnaviridae</i> <i>Parvoviridae</i> DNV	dsDNA ssDNA	Hymenoptera Diptera Lepidoptera Odonata Orthoptera	Ergin Larva, pupa ve ergin
<i>Birnaviridae</i> <i>Caliciviridae</i> <i>Nodaviridae</i>	dsRNA ssRNA ssRNA	Diptera Lepidoptera Diptera Coleoptera Lepidoptera	Ergin Larva Larva ve ergin
<i>Picornaviridae</i>	ssRNA	Diptera Lepidoptera Orthoptera	Larva ve ergin
<i>Rhabdoviridae</i> <i>Tetraviridae</i> <i>Nudivirüs</i>	ssRNA ssRNA dsDNA	Diptera Lepidoptera Lepidoptera Coleoptera Orthoptera	Ergin Larva Larva, pupa ve ergin

*Evans ve Shapiro, 1997

1.3. İridovirüslerin Keşfi

Claude F. Rivers adlı bilim adamı 1954 yılında Cambridge Üniversitesi'nde çalışmalarını sürdürürken yaptığı arazi çalışmalarında *Tipula paludosa* larvalarında epidermisin hemen altında parlak mavi bir renk olduğunu gözlemiştir. Rivers, bu larvalardan bol miktarda toplayarak Nick Xeros adlı başka bir araştırmacıya vermiş ve Xeros bu larvalardan ilk iridovirüsü (*Tipula paludosa* Iridovirus; IV1) izole etmiştir. Böylece, Xeros tarafından 1954 yılında iridovirüsler ile ilgili ilk yayın Nature dergisinde “*Tipula paludosa* larvasında ikinci bir virüs hastalığı” başlığı ile gerçekleştirilmiştir (Xeros, 1954). İridovirüs'ün karakteristik enfeksiyon belirtilerinin diğer virüslerden farklı ve renkli olmasından dolayı ilk karakterizasyondan sonra bilim insanları arasında oldukça yankı uyandırmıştır. Ayrıca iridovirüsler, böcek larvalarında yüksek oranda kolay şekilde üretilibilmeleri ve birçok izolatatının da hücre kültürüne uygulanabilir olması bakımından laboratuvar çalışmaları açısından da birçok avantaja sahiptir. İridovirüslerin enfekte ettiği böceklerin büyük çoğunluğunu zararlı böceklerin oluşturması ise biyolojik mücadele aşamasında virüslere ait genlerin yapısının bilinerek, virüslerin konak üzerinde çeşitli metabolik yollar üzerinde modifikasyonlar yapılmasına oldukça elverişlidir.

1.3.1. İridoviridae Familyasının Oluşturulması

Iridoviridae familyası, günümüze kadar gelen ve zamanla omurgalı, omurgasız canlılardan rapor edilen ve karakteristik olarak virüsü oluşturacak olan yapıların birleşme işlemini konak sitoplazmasında gerçekleştirdiği “ikosaedral” yapıdaki DNA virüslerini içine almak üzere 1976 yılında oluşturulmuştur (Fenner, 1976). Büyük ökaryotik DNA virüslerinin en büyük 4 grubundan birisi olan *Iridoviridae*, *Megavirales* grubu altında diğer büyük üyeler ile yeniden toplanmıştır. Virüsleri sınıflandıran bir kuruluş olan “Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi” (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından yapılan son açıklamalara göre bugün İridoviridae familyası altında *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* ve *Megalocytivirus* olmak üzere 5 cins bulunmaktadır (Colson, 2013, Tablo 2). Omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar *Iridovirus* (örnek tür: *Chilo* iridescent virüs) ve *Chloriridovirus* (örnek tür: *Mosquito* iridescent virüs) cinsleri altına dahil edilmişlerdir. Omurgalıları enfekte eden izolatlar da *Lymphocystivirus* (örnek tür: Flounder virüs), *Ranavirus* (örnek tür: Frog virüs 3) ve

Megalocytivirus (örnek tür: red sea bream Iridovirüs) cinsleri altına dahil edilmişlerdir. İridovirüsler ile ilgili çalışmaların çoğunluğu Frog virüs 3 (FV3) üzerinde yapılmıştır.

Tablo 2. Iridoviridae familyasının sınıflandırılması (Williams, 1998, Colson, 2013).

Cins	Kullanılan isim	Konak türü	Cinsin üyesi
<i>Iridovirus</i>	Küçük İridescent Böcek Virüsleri	Çeşitli omurgasız takımlar	<i>Tipula paludosa</i> IV (IV1) <i>Sericesthis pruinosa</i> IV (IV2) <i>Chilo suppressalis</i> IV (IV6) <i>Wiseana cervinata</i> IV (IV9) <i>Witlesia sabulosella</i> IV (IV10) <i>Costelytra zealandica</i> IV (IV 16) <i>Pterosticus madidus</i> IV (IV17) <i>Opogonia</i> sp. IV (IV18) <i>Odontria striata</i> IV (IV19) <i>Simocephalus expinosus</i> IV (IV20) <i>Helicoverpa armigera</i> IV (IV21) <i>Simulium</i> sp. IV (IV22) <i>Heteronychus arator</i> IV (IV23) <i>Apis cerana</i> IV (IV24) <i>Tipula</i> sp. IV (IV25) Ephemopteran (IV26) <i>Nereis diversicolor</i> (IV27) <i>Lethocerus columbiae</i> IV (IV28) <i>Tenebrio molitor</i> IV (IV29) <i>Helicoverpa zea</i> IV (IV30) <i>Armadillidium uulgare</i> IV (IV31) <i>Porcellio scaber</i> IV (IV32)
<i>Chloriridovirus</i>	Büyük İridescent Böcek irüsleri	Sivri sinekler	<i>Aedes taeniorhynchus</i> IV (IV3) <i>Aedes cantans</i> IV (IV4) <i>Aedes annulipes</i> IV (IV5) <i>Simulium ornatum</i> IV (IV7) <i>Culicoide's</i> sp. IV (IV8) <i>Aedes stimulans</i> (IV11) <i>Aedes cantans</i> (IV12) <i>Corethralla brakeleyi</i> IV (IV13) <i>Aedes detritus</i> IV (IV14) <i>Aedes detritus</i> IV (IV15) <i>Chironomus plumosus</i> IV

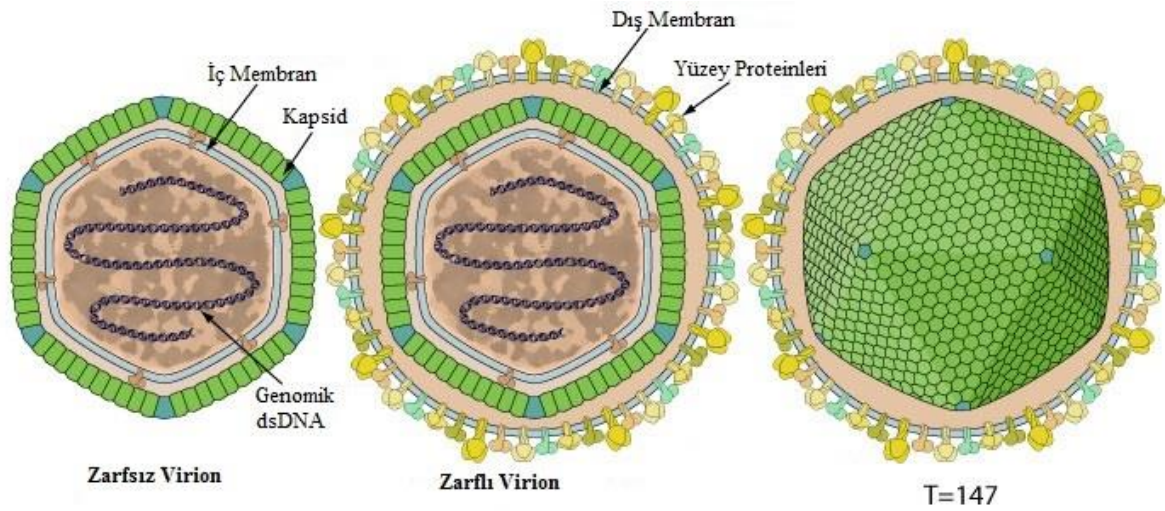
Tablo 2'nin devamı

<i>Ranavirus</i>	Kurbağa Virüsü	Amfibiler	Frog Virüs 1, 2 Frog Virüs 3 (FV3) Frog Virüs 5-24 Frog Virüs L2, L4, L5 Tadpole Edema virüs <i>Xenopus</i> virüs T21 Lucke triturus virüs LTI-LT4 Newt virüs T6-T20
<i>Lymphocystivirus</i>	Lenfosit Hastalığı Virüsü	Çeşitli balıklar	Lymphocystivirus type 1 (LCDV-1) Lymphocystivirus type 2 (LCDV-2) <i>Octopus vulgaris</i> disease virus
<i>Megalocytivirus</i>	Kızıl Deniz Çapak Virüsü	Çeşitli balıklar	<i>Spleen and kidney necrosis virus</i> (ISKNV) <i>Red sea bream iridovirus</i> (RSIV) <i>Turbot reddish body iridovirus</i> (TRBIV)

1.3.2. Iridoviridae Familyasının Özellikleri

Iridoviridae familyasına ait virüsler genellikle soğuk kanlı ormurgalılarından ve çeşitli böcekleri de içine alan poikilotermik hayvanlardan izole edilmişlerdir. Bu familyaya ait virüslerin canlılar üzerinde oluşturduğu enfeksiyonun belirlenmesinde, virüsün karakteristik özelliği olan mavi tonlardan yeşil tonlara kadar uzanan bir renk dizgisi oldukça önemlidir. Enfeksiyonun son aşamalarında ışık ile bakıldığında ise renk yelpazesi parlamaktadır. Enfeksiyon belirtileri, diğer virüs familyalarına göre daha farklı olan Iridoviridae familyası ismini İngilizce'deki gök kuşağı anlamına gelen ‘ ‘ Iridescence ‘ ‘ kelimesinden almıştır (Williams, 1996).

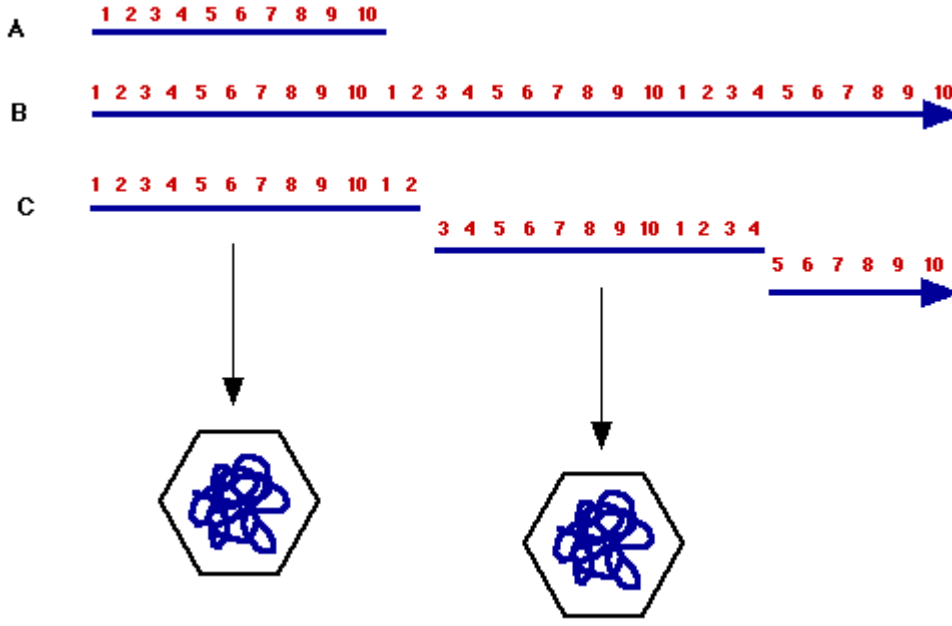
Iridoviridae familyasına ait virüsler büyük ikosahedral virüslerdir ve boyutları izolatların özelliklerine göre 120-300 nm boyutlarındadır. İkosahedral yapıları T=147 şeklinde oluşmaktadır. Virüslerin morfolojisi kapsid, zarfsız virionlarda iç lipid membranı, zarflı virionlarda dış membran ve kordan meydana gelmektedirler. Zarf yapısı genellikle hücre kültüründeki enfeksiyonlar sonucu oluşan virüslerin tomurcuklanması sonucu oluşmaktadır. Genomları çift sarmallı DNA'ya sahiptir ve boyutları 100-210 kbp arasında değişmektedir. Iridovirüslerde, bakülovirüsler ve entomopoxvirüslerde olduğu gibi gömülü virüs yapıları bulunmamaktadır (Şekil 3). Virionu oluşturan yapı ve elemanlar gömülü bir yapı oluşturmadıkları için virion birleşmesi tamamen sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bu nedenle oluşan yeni virüsler sitoplazmada toplanmaktadır.



Şekil 3. Iridovirüs'e ait virion yapısı ve kapsid sayısı (URL-4, 2009)

1.3.3. Iridovirüslerde Genom Özellikleri

Genomları omurgalı ve omurgasız konaklarına göre farklılık gösterir. Genomlarını oldukça verimli kullanmayı terminal redundansi adı verilen ve genom replikasyonu sırasında parental genomun kopyasının yaklaşık %10-12 arasında sahip olduğu genleri ard arda ekleyerek uzatmaktadır (Şekil 4).

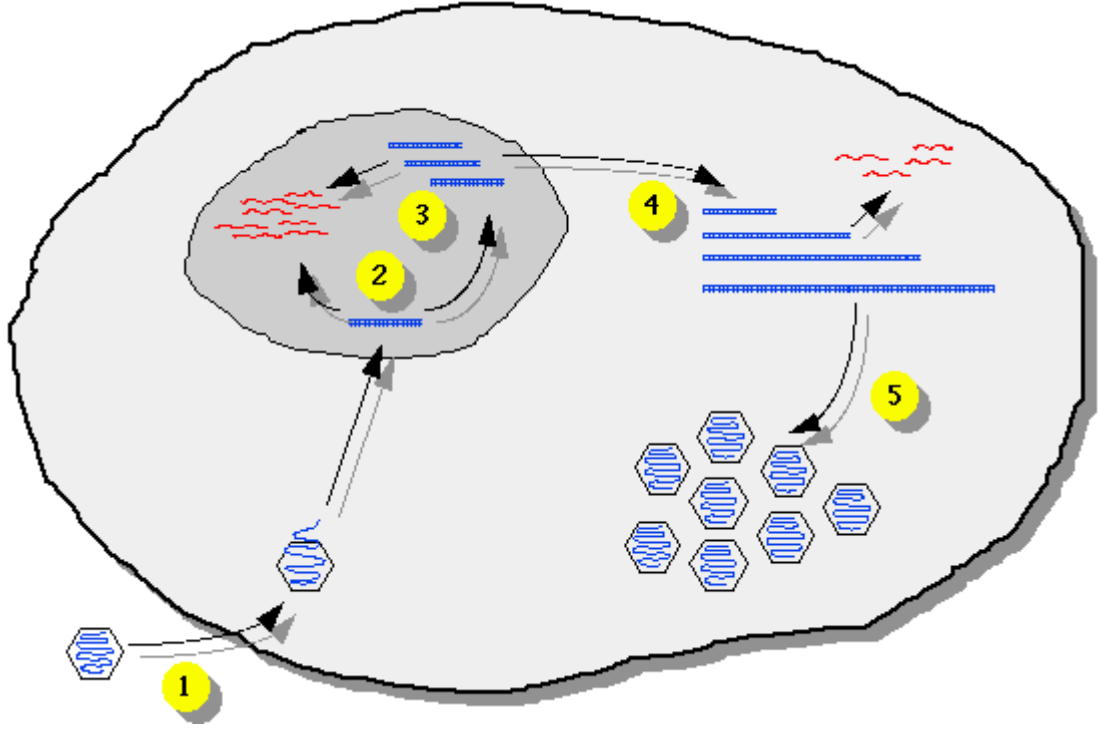


Şekil 4. Iridovirüslerde terminal redundansinin şematik gösterimi (URL-3, 1998)

1.3.4. Iridovirüslerin Replikasyonu

Iridovirüslerin replikasyonları genellikle konağın cinsine göre çeşitlenmektedir (Tajbakhsh, 1996). İridovirüslerde replikasyon hem nükleusta hem de sitoplazmada gerçekleşmektedir. Fakat virionları oluşturacak yapıların birleşmesi sitoplazmada gerçekleştiği için sadece sitoplazma kabul edilmektedir. Frog virus 3 (FV3) DNA'sı incelediğinde, enfeksiyondan sonraki ilk 3 saatinde FV3 DNA'sı sadece nükleus içerisinde, genomik boyutun iki katı oranında sentezlenir ve genomik DNA'nın 10 katı kadar olan yeni DNA parçaları sitoplazmaya geçmektedirler (Goorha, 1982).

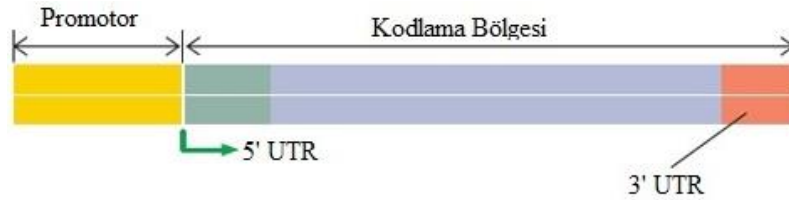
Replikasyon modeli olarak FV3 DNA'sı kullanılmıştır ve replikasyon Şekil 4'te gösterilmiştir. Buna göre, virüsler pinositoz yolu ile konak canlıının hücrelerine girer ve hücreler içerisinde nükleokapsid yapı ayrılır ve DNA serbest kalır (1). Kapsitten ayrılan virüs DNA'sı nükleusa transfer olur ve nükleusta konak RNA polimeraz II'sini kullanarak transkripsiyonu başlatır. Ana DNA kullanılarak virüs DNA'sının kopyası oluşturulur (2, 3). Yeni oluşan DNA nükleustan sitoplazmaya geçer ve sitoplazmada %10-12 büyümüş konkatemer oluşumu gerçekleşir (4). Oluşan konkatemerler virüs kapsiti içerisine paketlenir (5). Virionların hücreden ayrılmaları ise hücre kültüründe tomurcuklanma yöntemi ile normal konak hücrelerinde ise hücrenin parçalanması ile gerçekleşir (Şekil 5).



Şekil 5. Frog virüs 3 (FV3) DNA'sının replikasyon modeli (URL-3, 1998)

1.3.5. Iridovirüslerde Gen İfadesi

Gen, anlamlı bir RNA ve bunun öncülüğünde bir protein yapı sentezi için gerekli ve yaşamsal bakımdan önemli bilgileri içeren nükleotid dizileridir. Genel olarak bir genin yapısına bakıldığında, genin kodlayan bölgesinin baş ve aşağı kısımlarında translasyona uğramayan bölgeler (5'-UTR, 3'-UTR) ve translasyon başlangıç noktası olan ATG'nin yukarısında da promotor bölgesi bulunur (Şekil 6).

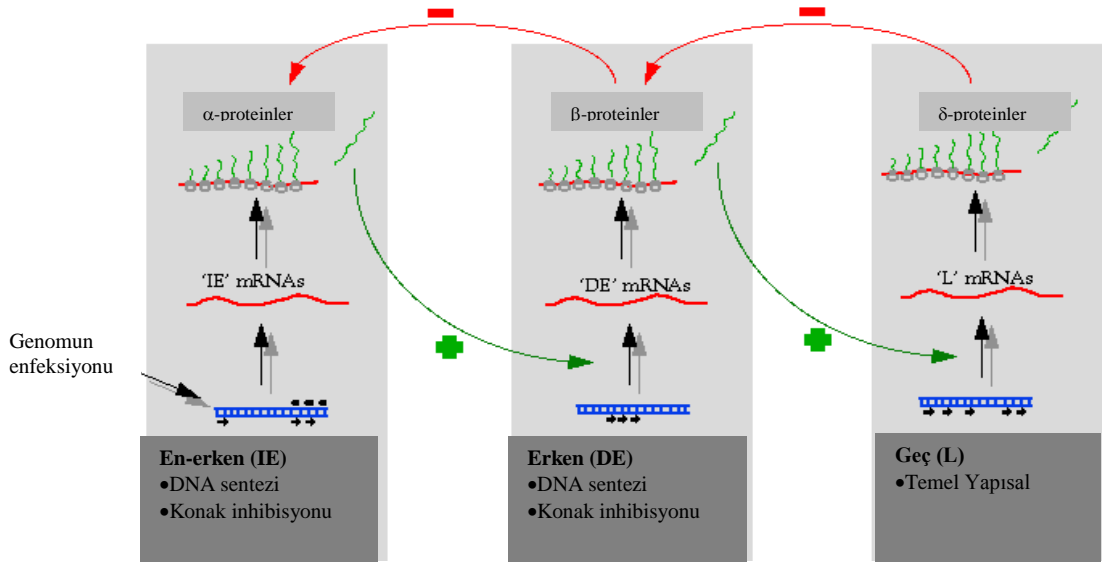


Şekil 6. Bir genin örnek modellemesi, UTR: okunmayan bölge (URL-5, 2012)

Genlerin replikasyonlarından sonra, metabolik yollarda işlem gören transkripsiyon ve translasyon mekanizmaları devreye girmektedir. Tek bir DNA zincirinin kalıp olarak kullanılması ve RNA polimeraz enziminin polimerizasyonu sonucu RNA molekülleri sentezlenir. RNA zincirinin sentezinin başlaması, zincirin uzaması ve zincir sentezinin sona ermesi olaylarının hepsine birden “transkripsiyon” denilir.

İrodoviridae familyasında transkripsiyon ve translasyon mekanizmaları en çok FV3 ve CIV’de çalışılmıştır. FV3 replikasyonu örnek olarak kullanıldığı zaman, replikasyonun konak hücrenin nukleusuna bağımlı olduğu ve replikasyon sırasında mekanizmaya gerekli olan proteinlerin replikasyonun ilk aşamalarında konak RNA polimeraz II’nin viral transkripsiyonunun yardımıyla sentezlendiği ortaya çıkarılmıştır (Goorha, 1977, 1978, 1979).

İridovirüslerde gen ifadesi basamaklı bir şekilde düzenlenmekte olup ifade edilen genler en erken (α , IE), erken (β , DE) ve geç (γ , L) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 7). Her sınıfın ürünleri bir sonraki sınıfın ürünlerini önemli bir şekilde etkilemektedir. En erken ve erken grubu genler DNA sentezinden önce sentezlenir. Fakat en erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duymaz iken, erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duyar. Geç grubu genler ise hem protein sentezine hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duyar.



Şekil 7. Iridoviridae familyasında transkripsiyon modellemesi (URL-3, 1998)

1.4. Chilo Iridescent Virüs (CIV, IIV-6)

1.4.1. CIV'nin Genel Özellikleri

Chilo iridescent virus (IIV-6) ilk olarak pirinç kök kurtlarından, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera; Pyralidae) izole edilmiştir. İridescent terimi ağır enfeksiyon sırasında turkuaz renk oluşumundan dolayı verilmiştir. *Chilo Iridescent Virus* diğer ismi ile böcek Iridovirüs 6, ikosahedral bir virüs yapısına sahip olan CIV bir kapsid, ara lipid tabakası ve uçlardan uzamış ve halkasal yapıya sahip viral genomdan oluşmaktadır (Fischer, 1990). CIV gömülü olmayan virüslere sahiptir ve viral partiküller elektron mikroskobu ile incelendiğinde, kapsidin 185 nm boyutunda olduğu belirlenmiştir. Bu kapsid 12 pentamer içeren T=147 kafesten meydana gelmektedir. Ayrıca, CIV kapsidleri 12 pentasimetron ve 20 trisimetron içermektedir. Bu özellikler *Iridoviridae* familyasındaki diğer virüslerle benzerlik göstermektedir. CIV'nin sahip olduğu çift zincirli DNA genomu 212,482 bp'den oluşmaktadır (Willis, 1990). Günümüze kadar 12 tane iridovirüs genomunun tam sekanslanması gerçekleştirilmiştir (Williams, 2005; Delhon, 2006). Baz içeriği, %71.37 A+T ve %28.63 G+C olarak bulunmuştur. CIV genomu 468 tane açık okuma çerçevesi içermektedir.

Chilo iridescent virus'ün 6 ordonun (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera) içinde bulunan yaklaşık 100 böcek türünü enfekte ettiği bulunmuştur (Fukuda, 1971; Hama, 1968; Henderdon, 2001; McLaughlin, 1972; Mitsuhashi, 1967; Ohba, 1975, 1979). CIV ziraatte bitkilere zarar veren birçok böceği enfekte ettiği için hem ekolojik bakımdan dengenin korunması amacı ile hem de ziraat ekonomisi açısından bilim insanları tarafından çalışılması tercih edilmiş ve zararlı böcekler için biyolojik mücadele amaçlı çeşitli deneylerde kullanılmışlardır. Enfekte ettiği önemli zararlılar arasında *Anthonomus grandis* (Coleoptera; Pamuk göz kurdu), *Nephotettix cincticeps* (Homoptera; Pirinç kurdu), *Colladonus montanus* (Homoptera; Dağ kirazı kurdu), *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera; Kök kurdu), *Bemisia tabaci* (Homoptera; Pamuk beyaz sineği), *Drosophila melanogaster* (Diptera; Sirkesineği), *Galleria mellonella* (Lepidoptera; Büyük balmumu güvesi), *Trichoplusia ni* (Lepidoptera; Lahana kurdu) bulunmaktadır. CIV'nin replikasyonunun tespit edildiği çok çeşitli hücre kültürleri mevcuttur. Bunlar *Choristoneura fumiferana*, *Drosophila melanogaster*, *Pieris rapae*, *Spodoptera*

frugiperda, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella*, *Aedes albopictus*, *Bombyx moorei* hücreleridir.

1.4.2. CIV'nin Replikasyonu ve Transkripsiyonel Regülasyonu

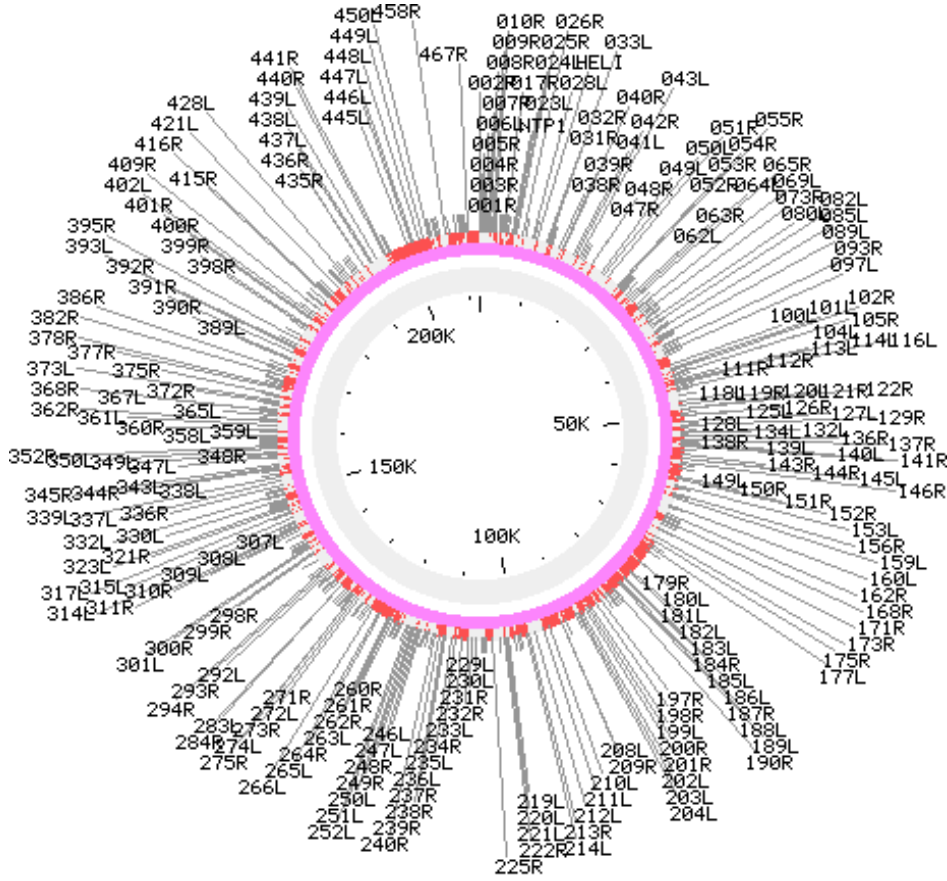
Chilo iridescent virus'ün replikasyonu, Iridoviridae familyasındaki replikasyonu anlatmak için kullanılan Frog virüs 3 (FV3) ile benzer olmakla birlikte, küçük farklılıklar göstermektedir. CIV sitoplazmik virüs olarak bilinmesine rağmen, replikasyon nukleusta başlar ve sitoplazmada tamamlanmaktadır. Virüs partikülleri konak hücrenin hücresele reseptörlerine bağlanır. Bu tutunmadan sonra, zarflı virüsler reseptör yardımcı endositoz ile hücreye girerken zarfsız virüsler ise plazma membranına füzyon yaparlar. CIV'ye ait olan 096L geni bu tutunma için örnek bağlanma proteini kodlayan dizilere sahiptir. FAS1 domainine sahip olan bu protein virion hücre tutturulmasında rol oynamaktadır.

Penetrasyondan sonra viral DNA hücre nukleusuna transfer edilir ve replikasyonla birlikte viral genom miktarında artış meydana gelir. Bu replikasyon sırasında erken viral transkriptlerin iki sınıfı olan en erken (IE) ve erken (DE) genler kalıp DNA'dan sentezlenmektedir (Williams, 2005). Daha sonra DNA viral döngü içinde sitoplazmaya genomik boyuttan 10 kat büyük konkatemerler oluşturmak için gönderilir (Willis, 1984). DNA'nın konkatemerik formu sitoplazmik viral birleşme bölgelerinde bulunmaktadır. Bu olay viral olarak kodlanmış yeni RNA polimeraz II tarafından ya da modifiye edilmiş hücresele RNA polimeraz tarafından katalizlenmiştir. Virionlar hücreden ya tomurcuklanma ile ya da hücresele lizis ile dışarı çıkmaktadır (Şekil 3).

CIV transkriptlerinde ve enfekte hücre spesifik polipeptitlerinde yapılan çalışmalarda, CIV mRNA'ları en-erken (IE, α), erken (DE, β) ve geç (L, γ) olmak üzere 3 temporal sınıfa ayrılmışlardır (Barray, 1987; Delius, 1984). Enfeksiyon sırasında oluşan CIV mRNA moleküllerinin üç sınıfının geçici ekspresyonu, mRNA'ların transkripsiyonunu başlatmak için post enfeksiyonun belirli zamanlarında hem *cis* DNA dizilerinin hem de *trans* regülatör faktörlerinin farklı etkileşimlerini göstermektedir. Post enfeksiyonun ilk 30 dakikasında görülen orta erken sınıfı 38 transkript içermektedir ve virion ilgili protein sentezleri gerekmektedir. En erken sınıfı post enfeksiyondan 3 saat sonra 34 transkript görülmüştür ve ekspresyonları için en az 1 tane erken gen ürünü gerekmektedir (D'Costa, 2001).

Yaklaşık 100 kDa boyutunda bulunan protein DNA polimerazın promotörünün aktif bölgesi ile etkileşim yaptığı ve transaktivatör protein olarak çalıştığı düşünülmektedir

(Nalçacıoğlu, 2007). Bu proteinin ekspresyon sürecinde ürünlerin ne zaman oluştuğunu belirlemek amacı ile kullanıldığı belirlenmiştir. Geç sınıfı post enfeksiyondan 6 saat sonra, sadece inhibitörlerin eksikliğinde viral RNA'ların tam düzenlenmesini içeren 65 transkript gözlemlenmiştir. Dizin analizi sonucunda CIV genomunda 468 adet genin kodlandığı tespit edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *Chilo Iridescent virüs*'ünün transkripsiyon haritası

1.5. Bakülovirüsler

Bakülovirüsler, geniş bir virus grubu olup, özellikle böceklerde bulunur (Theilmann, 2005). Genomları prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan daha küçük olmasına rağmen, bakülovirüsler, gen yapısı ve düzenleyicileri bakımından bu organizmaların ve memelilerde enfeksiyon yapan virüslerin genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadır (Bilimoria, 1991). Rekombinant bakülovirüsler, farklı ökaryotik genleri araştırmak ve biyoteknolojik

uygulamalarını arttırmak için böcek kültürlerinde üretilirler (Luckow, 1991; O'Reilly, 1992; Yin, 2007). Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS) kullanılarak, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik ve viral genlerin bu virüsler aracılığı ile ekspres edilmeleriyle üretilmesi, besin ve ilaç hammadde eksikliğinin giderilmesi ve biyolojik mücadele için gerekli çeşitli toksinlerin üretilmesi sağlanmıştır (Beljelarskaya, 2002; Demir, 2000; Demirbağ, 1998; Summers, 2006; Van Oers, 1994).

Ayrıca, bakülovirüsler gen tedavi metodu ile çeşitli hastalıkların tedavisinde gen transfer vektörü olarak kullanılmaktadır (Ghosh, 2002). Bu virüsler böcek kaynaklı oldukları için insan bağışıklık sistemine cevap oluşturmama ve insanlarda patojen olmama gibi özellikleriyle diğer virüs vektörlerine göre gen tedavisinde kullanılmaları açısından avantajlara sahiptirler (Kost, 2002; Van Oers, 2006). Yukarıda bahsedilen özelliklerden dolayı, bakülovirüsler son yıllarda yoğun şekilde çalışılan araştırma ve geliştirme materyalleri haline gelmişler ve önemli alanlarda da kullanılmaktadırlar.

1.5.1. Bakülovirüslerin Biyolojisi

Bakülovirüsler doğa içerisinde böcek popülasyonunu düzenleyen böcek patojeni virüslerdir. Bu nedenle, zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde kullanılmaktadır. Bakülovirüsler böcek popülasyonlarında sık sık ölüme sebebiyet veren virüs grubudur. *Chilo iridescent* virüslerin aksine bu virüslerin virionları gömülü yapılar içerisinde bulunmaktadır ve Hymenoptera, Diptera ordolarına ait böceklerin larval dönemlerinde enfekte etme özelliklerine sahiptirler (Federice, 1999).

Yapılan çalışmalar sonucu ve eklenen yeni gruplar ile sınıflandırma değişmiştir. *Baculoviridae* familyası, alfabaculovirus, betabaculovirus, deltabaculovirus ve gammabaculovirus olmak üzere dört cins altında toplanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Bakülovirüslerin sistematigi (URL-6)

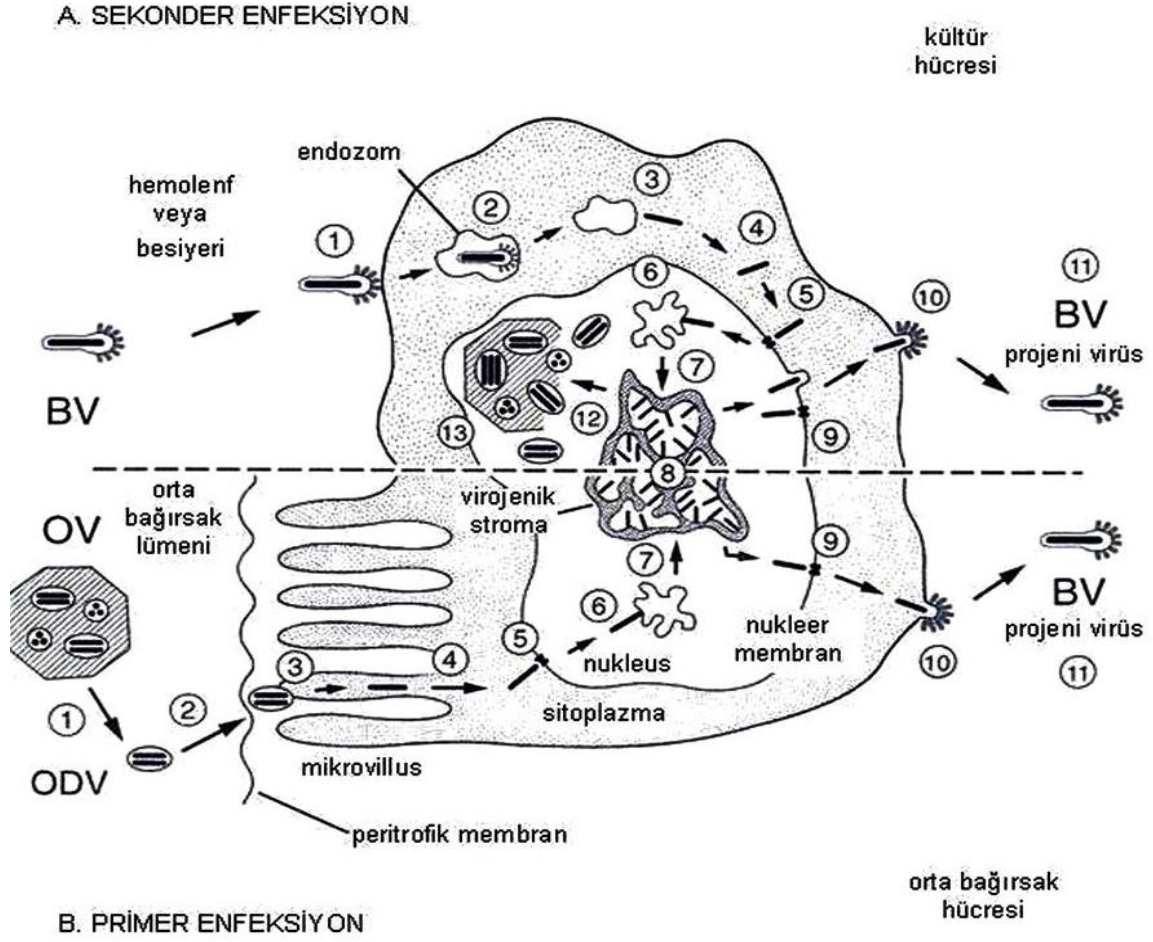
Genus	DNA	Boyut	Kodlanan Protein
<i>Alfabaculovirus</i>	ds, halkasal	80-180 kb	100-180
<i>Betabaculovirus</i>	ds, halkasal	80-180 kb	100-180
<i>Deltabaculovirus</i>	ds, halkasal	80-180 kb	100-180
<i>Gammabaculovirus</i>	ds, halkasal	81-86 kb	90

1.5.2. Bakülovirüslerin Replikasyonu

Bakülovirüslerin hücre kültürlerinde yapılan ultrayapısal ve histokimyasal çalışmalar, viral DNA replikasyonunun, nukleus içinde 'virojenik stroma' olarak adlandırılan bölgede meydana geldiğini göstermiştir (Kelly, 1982; Slack, 2007; Volkmann, 1990). Backülovirüslerde replikasyon süreci iki aşamada meydana gelmektedir (Şekil 9).

Birinci safha (A): in vitro sistemde veya konakta hücreler arasında meydana gelen BV(Budded Virus) enfeksiyonu (sekonder enfeksiyon): Zarflı BV'ler hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunur (1. Adım) ve endositosiz ile hücreye girerler (2. Adım). Viral zarf ile endozomun füzyonu (3. Adım). Sonucunda nükleokapsidler nukleusa doğru ilerler (4. Adım) ve nükleer por ile intreksiyona girerler (5. Adım). DNA, nukleusta viriondan salınır (6. Adım) ve transkripsiyona başlar (7. Adım). Yeni oluşmuş virojenik stroma ile birleşme gerçekleşir, viral DNA replike olur ve nükleokapsidler nukleustan çıkar (8. Adım). Geç fazda, nukleustan çıkar (9. Adım), plazma membranına doğru hareket eder ve ekzositozis ile buradan tomurcuklanma ile salınırlar (10. Adım). Böylece, virüs zarf proteini sağlamış olur ve enfektif BV'ler de üretilmiş olur (11. Adım). Oluşan bu zarflı virüsler konak organizmalarda ve hücre kültüründe, hücreler arasında enfeksiyon yapma özelliğine sahip, çomak şeklinde virüs formlarıdır çok geç fazda, nükleokapsidler tekrar nukleusa döner, burada zarf kazanır (12. Adım) ve OV oluşturmak üzere bir polihedrin matriksine gömülür (13. Adım). Hücrenin parçalanmasıyla OV'ler ortama yayılır.

İkinci safha (B): OV ile bir orta bağırsak hücresinin enfeksiyonu (primer enfeksiyon): Böcek tarafından beslenme yoluyla alınan OV'nin kristal yapısı orta bağırsak lümeninde alkali ortam nedeniyle çözülür (1. Adım). ODV'ler lümene yayılır ve bağırsak epitel hücrelerine girmek üzere peritrofik membranı geçerler (2. Adım). ODV zarfı ile mikrovillus membranı füzyon olayı ile kaynaşır (3. Adım). Nükleokapsidler sitoplazmaya dağılır ve buradan nukleusa hareket ederler (4. Adım). Diğer replikasyon adımları (5-11. Adımlar) kültür hücrelerindeki gibi gerçekleşir (Şekil 9).



Şekil 9. Bakülovirüs enfeksiyon döngüsü (Demir ve ark, 2008)

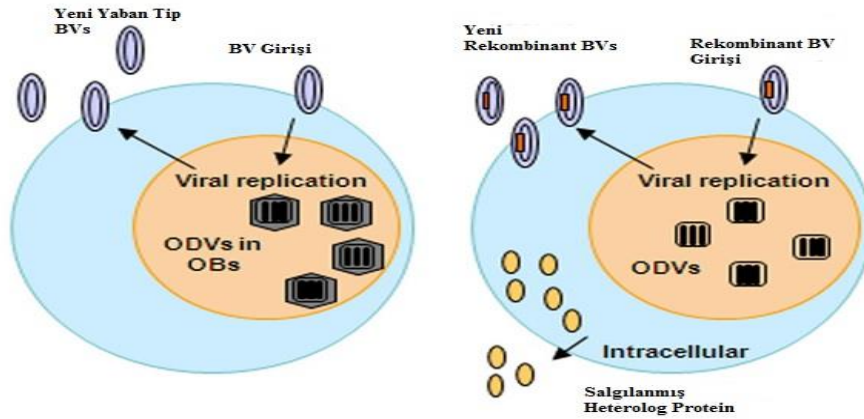
1.5.3. Bakülovirüs Ekspresyon Sistemi (BEVS)

Bakülovirüsler doğada böcek popülasyonunu kontrol eden böcek virüsleridir. Bu özelliklerinin yanı sıra bakülovirüsler, onları yabancı gen ekspresyonu için vektör olarak kullanılmalarını sağlayan yüksek seviyede geç gen ekspresyonuna sahiptirler. Bu anlamda günümüzde iki tane bakülovirüs vektör olarak rekombinat protein üretmek için yaygın olarak biyoteknoloji sahasında kullanılmaktadır. Bunlar *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) ve *Bombyx mori* NPV (BmNPV)'dir. Bakülovirüs vektörleri, prokaryotik ekspresyon sistemlerinin aksine posttranslasyonel modifikasyonları sağlayarak ve rekombinant proteinlerin yüksek seviyede üretimini sağlayarak böcek larvaları ve böcek hücre kültürlerinde kullanılmaktadır.

1.5.4. BEVS Genel Özellikleri

Bakülovirüslerde larval popülasyonlarda horizontal yayılma ile enfeksiyon döngüsünün tamamlanabilmesi için *p10* ve polihedrin proteinine ihtiyaç vardır fakat, BV'lerin üretimi için bu olay gerekli değildir. BV'ler hücre kültüründe ve larvalarda sistemik enfeksiyondan sorumludurlar, bundan dolayı enfeksiyon sırasında *polh* ve *p10* promotorları gerekli değildir ve bu promotorlar hücre kültüründeki yabancı genlerin ekspresyonu için kullanılmaktadır (Şekil 10).

Bu geç promotorlar, standart TAAG transkripsiyon başlatma bölgelerini içermektedir. Ayrıca, *polh* ve *p10* promotorları varlığında bakülovirüs genomuna farklı promotorlar eklenerek böcek larvalarında protein üretimi de hızlandırılabilir. İki bakülovirüs türü olan Alfabakülovirus genusunun tip türü ve BmNPV yabancı gen ekspresyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. AcMNPV vektörleri ile protein üretimi için 1000 L'lik geniş çaplı üretim yapılmaktadır fakat, BmNPV sadece hücre kültürü ve larvalarda kullanılmaktadır (Usami, 2010).

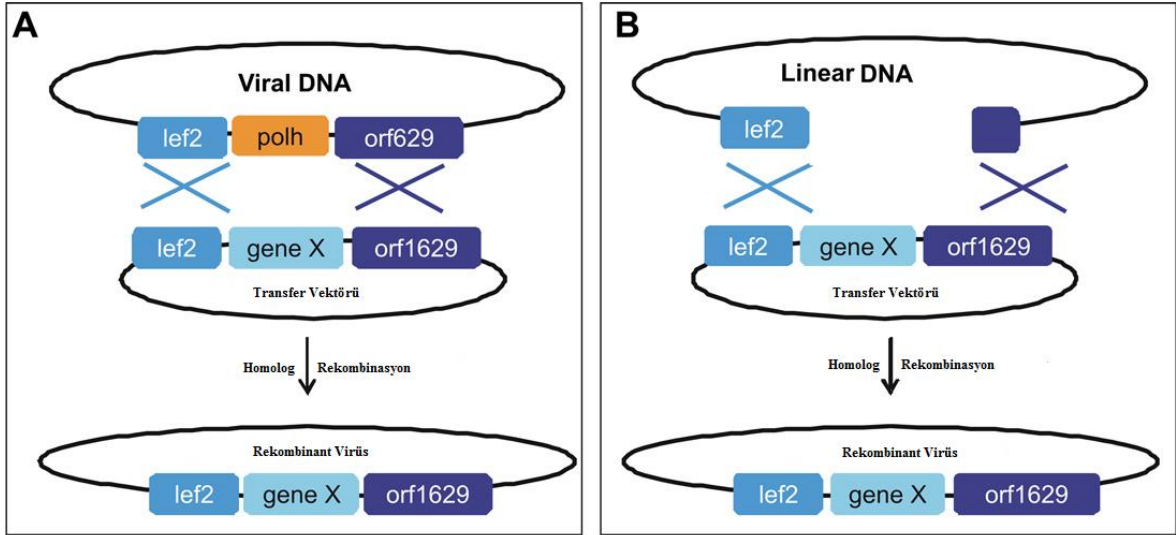


Şekil 10. Yaban tip, rekombinant tip bakülovirüslerin viral döngüsü (Van Oers, 2011)

1.5.5. BEVS'te Baküloviral Vektörler

Bakülovirüsler büyük genoma sahip olduklarından, yabancı genler için direkt olarak klonlama geçerli bir metod olarak kullanılamamaktadır. Rekombinant virüs yapmanın klasik yolu viral genom ve *p10* ya da *polh* promotor kontrolü altında yabancı gen taşıyan transfer

plazmidi arasındaki homolog rekombinasyondur (Şekil 11, A,B) (Smith, 1983; Vlak, 1990). Oluşan yabancı gen kaseti, bakülovirüs genomunda bulunan aynı bölgelerden değişim yaparak rekombinasyonu kolaylaştırmaktadır. Transfer plazmid ve viral DNA'nın böcek hücreleri içine transfeksiyonu sonrasında homolog rekombinasyon gerçekleşmektedir (O'Reilly, 1992).

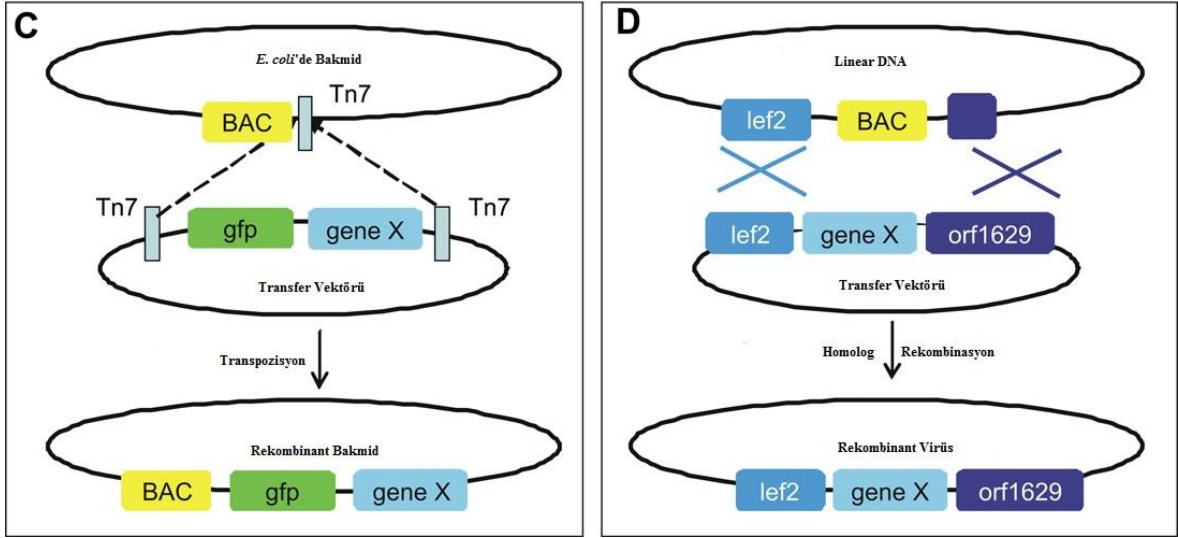


Şekil 11. Klasik (A) ve lineer (B) bakülovirüs vektörleri (Van Oers, 2011).

Bakülovirüs vektörleri arasındaki ana faktör ise bakmid olarak adlandırılan ve viral genomun *Escherichia coli* içerisinde işlenmesine izin veren, ayrıca AcMNPV genomu içeren yapay bakteri kromozomal ürünlerdir (Luckow, 1993). Yabancı genler, bakmidlere (DH10BAC hücreleri) bölgeye özel transpozisyon ile aktarılır ve bunu Tn7-rekombinaz yardımcı transpozisyon ile sağlamaktadırlar (Şekil 12, C). Bakmidler oluşturulduğu zaman PCR ile doğrulanmaktadır. Transfeksiyon için *Spodoptera frugiperda* (Sf9) ve *Trichoplusia ni* (Tn-5B1-4) hücreleri kullanılmaktadır. Enfeksiyondan sonra BV partikülleri kolaylıkla kültür süpernatantından toplanmaktadır. Bir ya da iki proteini BEVS ile ekspres etmek için ticari vektörler mevcuttur (pFastBac1 ve pFastBacDual; Invitrogen).

Bakmidlerin yanı sıra yabancı genlerin yüksek verimli ekspresyonu için rekombinant virüsler yapılarak, cDNA kütüphanelerini kullanan yarı otomatik metot geliştirilmiştir (flashbac; Oxford Expression Technologies Ltd.). Bu metot, lineer vektör metodunda olduğu gibi insersiyon bölgesindeki gerekli orf1629 geninin düzeltilmesini temel alan rekombinant virüs seçiminin yapıldığı bir transfer plazmidi ile *in vivo* rekombinasyonu ve bakmid

teknolojisinin kombinasyonundan oluşmaktadır (Posse ve ark, 2008), (Şekil 12, D). Ayrıca, viral (bakmid) DNA'nın kolayca saflaştırılması ve bakülovirüs genomunda değişiklikler yapılmasını da sağlamaktadır. Ticari olarak BacMagic (Merck) ve BaculoOne (PAA) yarı otomatik vektör sistemleri bulunmaktadır.



Şekil 12. Bakmid (C) ve yarı otomatik (D) bakülovirüs vektörleri (Van Oers, 2011)

1.6. Protein Etkileşimleri

Yaşamın en baştan beri geliştiği yeşerdiği ve son bulduğu dünyamız milyonlarca canlıya ev sahipliği yapmaktadır. Canlıyı oluşturan en temel yapı birimi hücreden itibaren evrimsel gelişim ile başlayan bu süreç ileri düzey canlıların meydana gelmesiyle devam etmektedir. Canlıların birbirleri arasındaki etkileşimler ekolojik düzen gereği olması gereken bir olaydır. Canlıların arasında gerçekleşen büyük boyuttaki etkileşimi geniş bir halka olarak düşünmeliyiz. Bu sayede de moleküler ve biyokimyasal anlamda canlılar arasındaki etkileşimleri kolay bir şekilde kavrayabiliriz. Canlılardan itibaren başlayan bu etkileşim, canlıyı oluşturan sistemler arasında, sistemleri oluşturan organlar arasında, organları oluşturan dokular arasında, dokuları oluşturan hücreler arasında da mevcuttur. Daha da ayrıntılı olarak incelenirse, hücrelerin devamlılığı için gerekli olan hücresel metabolizmada büyük rol oynayan proteinler ve ayrıca hücrelerin hastalanmasına sebebiyet veren canlı olarak değerlendirmeyen virüslere ait viral proteinler arasında da bu etkileşim gerçekleşmektedir.

Protein-protein interaksyonları (PPI), biyokimyasal olaylar sonucu veya elektrostatik kuvvetlerin bir sonucu olarak ortaya çıkan en az aynı veya farklı iki protein arasındaki fiziksel temas kurma eğilimidir. Aslında proteinler, hem hücresel hem de sistemik seviyelerde önemli roller üstlenmelerine rağmen nadiren de olsa tek başlarına hareket ederler. Bir hücre içindeki temel metabolizma olayları, hücre içinde meydana gelen protein-protein etkileşimlerinden oluşmaktadır. Protein-protein interaksyonları farklı açılardan değerlendirilerek çalışılmıştır (Westermarck, 2013).

Örneğin, biyokimyasal, kuantum kimyasal, moleküler hücre dinamiklerinin anlaşılması, sinyal aktarımı gibi alanlarda kurtarıcı rol oynamaktadır. Protein-protein interaksyonlarının seçiciliğini ve derecesini belirleyen biyofiziksel özellikler, protein yoğunluğu ve bağlanma afinitesidir. İki protein arasındaki bu olay, bağlanıp çözülme şeklinde düşünülebilir ve bir şekilde bağlanan proteinler kompleks oluşturabildiği gibi kompleks oluşturmadan da kısa süreli bir bağlanma gerçekleştirebilir.

1.6.1. Protein-Protein Etkileşimlerinin Çeşitleri

Proteinler karmaşık yapılarda olabildikleri gibi çok basit yapıda da olabilmektedirler. Karmaşık yapılar oluştururken, homo-oligomer ya da hetero-oligomer şeklinde karmaşık yapılar oluştururlar. Protein-protein interaksyonları geleneksel olduğu gibi antijen-antikor veya enzim-inhibitör şeklinde olabilir. Nadir olarak, etki alanına bağlı olarak peptidler arasında PPI'ler kurulabilmektedir. Ayrıca, bu etkileşimleri, sabit veya geçici şekilde sınıflandırabildiğimiz gibi proteinler arasında kurulan kimyasal bağların yapısına göre de ayırmak mümkündür.

Homo-oligomer protein yapısı, aynı alt ünite proteinlerden oluşan dört boyutlu yapıdır. Bu yapı kimyasal bağlanma ile yönetilmektedir. Protein yapısı tek bir alt ünitenin dönmesi aracılığı ile denatüre olabilmektedir. Çeşitli enzimler, taşıyıcı proteinler, yerleşme proteinleri ve transkripsiyon düzenleyici faktörler homo-oligomer yapıda işlev görürler. Hetero-oligomer protein yapısı, farklı alt ünite proteinlerden oluşan dört boyutlu yapıdır. Farklı alt ünitelerden oluşan bu karmaşık yapılar, hücresel sinyal olaylarında çok daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadırlar (Jones, 1996).

Sabit etkileşimlere sahip olan kompleksler, homo-oligomer ve hetero-oligomer yapılarının kendi aralarında ya da ayrı şekilde interaksyon oluşturması şeklinde meydana gelir. Diğer yandan, belli bir protein ya da protein kompleksi belli bir bölgede bulunan

proteinlerle biyokimyasal şekilde geri dönüşümlü olacak şekilde bağ kurabilir. Kurulan bu bağ geçici etkileşim olarak adlandırılır.

Kovalent etkileşimlerini en güçlü şekilde disülfid bağları ve elektron paylaşımı oluşturmaktadır (Campell, 2006). Kovalent olmayan bağlar ise, hidrojen bağları, iyonik etkileşimler, Van Der Waals bağları veya hidrofobik etkileşimler şeklinde olabilmektedir (Ansyln, 2004).

1.6.2. Protein-Protein Etkileşimlerinin Analizleri

Hücre sinyal mekanizmaları hastalıklarda olduğu gibi pek çok biyolojik olaylarda da büyük öneme sahiptir ve hücre sinyalleşmesinde pek çok protein-protein interaksyonu, iskeletler ve enzim-substrat ilişkisi kilit role sahiptir. Bu nedenle, sinyalleşme sistemi oldukça yoğun bir şekilde çalışılmış ve pek çok protein yerleşme bölgesi ve ya bağlanma bölgeleri incelenmiştir (Sharrocks, 2000). Bazı protein-protein etkileşimleri maya ikili melez, immünolojik çökeltmeler, pull down analizleri ve floresan rezonans enerji transferi (FRET) olarak sıralanan teknikler ile belirlenebilmektedir.

Pull down ve immünolojik çökeltmeler birbirlerine çok benzerlerdir. Pull down analizleri genellikle, glutasyon S-transferaz (GST) enzimi ile birlikte klonlanmış ve üretime hazır plazmidlerle yapılmaktadır. GST enzimi, kullanılan substrata yoğun bağlanma afinitesine sahiptir ve çapraz bağlanmaları önleyerek enzim-substrat ilişkisini temel alarak görevini gerçekleştirir. İmmünçökeltmelerde, proteine özel antikolar kullanılmaktadır. Bu sayede antikor-antijen prensibine dayanan mekanizma gerçekleşir ve etkileşim belirlenir.

Her iki yöntemin de en büyük dezavantajı, proteinlerin doğal olmayan bir ortamda bulunması ve dolayısıyla doğru katlanmamış olabilmeleridir. Proteinlerin doğru katlanmaları, yüzey amino asitlerinin etkileşime doğrudan katkılarının bulunmasından ötürü, etkileşimlerin doğruluğu açısından çok önemlidir. Ayrıca etkileşimler tüp içerisinde gerçekleşmekte olduğundan, etkileşimi sağlayıcı şaperon moleküller mevcut olmayabilir, bu da deney sonuçlarının doğru yorumlanamamasına neden olabilir.

Maya ikili hibrit sisteminde, transkripsiyon faktörlerinin modüler doğası olan DNA'da spesifik dizileri tanıyan bir DNA bağlanma bölgesi (DBD – DNA binding domain) ve ilgili promotor'dan gen ifadesine neden olan bir transaktivasyon bölgesi (AD – Activation Domain) değiştirilmektedir. Transaktivasyonun modüler doğasına ve DBD ile AD'nin başka proteinlere eklendiğinde özelliklerini o proteinlere taşıdıklarına (hibritlendiklerine) dair

öncü çalışmalar, 1988 yılında GAL4 transkripsiyon faktörü üzerinde Maniatis ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Bu ikili-melez sisteminde bu iki bölge birbirinden ayrılarak etkileştiğinden şüphelenilen iki proteine ayrı ayrı eklenmektedir. Bu proteinlerden bir tanesi yem (bait) olarak kullanılır. Bu yem proteinin pek çok olası av (prey) proteini arasından hangisi ile gerçekten etkileştiği ise, DBD ve AD'nin yan yana gelmesi sayesinde raportör gen anlatımı ile takip edilir (Primrose ve Twyman, 2006).

Çoğu yöntem kompleks oluşması ve etkileşimleri dolaylı metotlar ile göstermeye çalışırlar, dolayısıyla araştırmacılar uzun zamandır tek-molekül düzeyindeki etkileşimleri “doğrudan” gözleyebilmenin arayışındaydılar. FRET analizi bu açıdan oldukça değerli bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Her ne kadar yine dolaylı bir yöntem olsa da X ve Y proteinleri arasındaki etkileşim, doğrudan enerji transferi sayesinde görüntülenebilir olmaktadır. Bu yöntemin de endirek olma nedeni, her iki proteinin de floresan moleküller ile etiketlenmesindedir – farklı iki florofor tarafından etiketlenen bu proteinler eğer yeteri kadar yakınlarsa (ki bizim etkileşimden kastettiğimiz de non-kovalent etkileşimde bulunacak kadar yakın olmalarıdır), uyarılmış verici florofordan yakınındaki reseptör florofora enerji transferi olmakta ve bu da görüntülenebilmektedir (Zheng, 2006).

Mevcut floresan mikroskoplar, floresan etiketli moleküllerin optik düzlemsel çözünürlük limiti olan 200 nm içerisinde lokalize edilmelerine olanak tanımaktadır. Ancak eğer proteinler arasındaki fiziksel etkileşimler incelenmek isteniyorsa, o takdirde 200 nm'den çok daha yakın mesafelerin algılanabilmesi gerekmektedir. FRET, birbirinden sadece nm'lerce uzakta olan iki molekül arasındaki yaklaşma ve etkileşimin dolaylı olarak gözlenebilmesine olanak vermektedir (Helms, 2008).

1.6.3. Viral Enfeksiyon Sırasında Protein-Protein Etkileşimlerinin Önemi

Dünya üzerinde mikroskobik ve makroskopik milyonlarca canlı türü mevcuttur. Canlılarda bulunan hücrelerin normal yaşantısını bozarak, hastalanmasına veya olağan işlevselliğini yitirmesine sebep olan mikroskobik canlı veya cansız varlıklar da mevcuttur. Cansız varlıklar olarak isimlendirilen virüsler konak dışarısında kristalize yapıda kendilerini saklamaktadırlar. Virüsler, sağlıklı hücreler üzerinde hücresel metabolizmaya entegre olarak hücreyi kendi lehine çalışmaya zorlamaktadırlar.

Virüsler konakları üzerinde enfeksiyon oluştururken, kendi sahip oldukları genomu konak hücrelerine aktarmalı ve viral genomu ilgili bölgelere ulaştırmalıdır. Enfeksiyon sırasında virüsün dışında bulunan protein yapıdaki reseptörler konağa ait yapıları tanımalıdır. Bunu sağlayan ve viral genomun konağa aktarılmasında aktif rol oynayan yapı glikoprotein hormonu beta zincir yapısıdır. Konağa aktarılan viral genomun hücrenin stoplazmasında veya nükleusunda replike olması gerekmektedir. Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) konağa aktarılan viral genomun taşınmasında aktif rol oynar ve virüsün etkili bir şekilde çoğalmasında büyük öneme sahiptir.

Nükleer lokalizasyon sinyali, belirli bir amino asit grubudur. Bu amino asit grubu lizin ve arjinince zengin olup, hücre yüzeyinde pozitif yük oluştururlar. Bu grubu bulunduran yapılar, hücre veya nükleus zarından madde geçişini çift taraflı olarak sağlayabilirler (Boulikas, 2004). *Glikoprotein hormon yapıları*, membranlarının önemli ve aktif bileşenleri olduğu bilinmektedir. Hücre membranlarının glikoproteinleri iki lipid tabakası arasına yerleşmiştir. Glikoprotein molekülü, membranın bir ya da her iki yüzeyi ile temas edebilirler (Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım, 1996). Protein ve glikoproteinler hücre içi iletişimi sağlamada etkili elemanlardır. Protein glikozilasyonu proteinlerin en yaygın posttranslasyonel modifikasyonudur ve proteinin antijenik özelliklerine katkıda bulunur. Glikozilasyona uğramış proteinler farklı tip antijenik epitoplara taşırlar (Lisowska, 2002 ve Walsh, 2006) ve glikoproteinler immün sistem efektörlerinin anahtar bileşenleridirler (Rudd, 2001 ve Zhang, 2006). Ayrıca glikoproteinlerin detaylı analizleri konak-mikroorganizma ve konak-parazit arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına böylece protein-protein etkileşimlerinin araştırılmasındaki eksik bilgilerin tamamlanmasına yardımcı olurlar.

Viral proteinler arasındaki interaksiyonlar, virüs hareketleri, vektörler tarafından yapılan virüs dağılımı, virionların birleşmesi, virüs replikasyon komplekslerinin oluşmasını etkilemesi açısından virüs yaşam döngüsünde oldukça önemlidir (Guo, 2001). Virüs-konak ilişkisi, virüs enfeksiyon döngüsü viral proteinler arasındaki interaksiyonları anlamak açısından oldukça önemlidir.

Protein-protein etkileşimleri birçok virüs için çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Örneğin, bu interaksiyonlar maya ikili melez sistemi ve bimoleküler floransans komplementasyon (BiFC) deneyi kullanılarak patates virüs A, bezelye tohum mozaik virüsünde (PSbMV), tütün damar benek virüsünde, soya fasülyesi virüsünde (SMV) gösterilmiştir (Guo, 2001; Hong, 1995; Kang, 2006). Ayrıca, plum pox virüs üzerinde yapılan çalışmalarda yardımcı kompotent proteinazlar (HC-Pro) arası etkileşimler, viral

proteinler (VP) arasında, CP'lerin kendileri ile yaptığı interaksyonlar belirlenmiştir (Yambao, 2003).

Viral protein-protein etkileşimlerinin fonksiyonel rolü, 2013 yılında Xu tarafından çalışılmıştır. Bu çalışma, salatalık mozaik virüsü 2b proteininin viral semptom tetiklenmesinde ve RNA susturulmasının baskılanmasında hayati role sahip olduğunu belirlemiştir. Yapılan son çalışmalarda, bidensovirüs proteinleri (BmDNV-Z) ile *Bombyx mori* spesifik konak orta bağırsak proteinleri arasındaki protein-protein interaksyonları belirlenmiştir (Bao, 2013).

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu güne kadar *Iridoviridae* familyasında bulunan CIV üzerinde genom organizasyonu ve gen ürünlerinin fonksiyonel analizleri konularında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. CIV üzerinde yapılan protein interaksiyon çalışmalarında, doktora öğrencisi Emine Özşahin'nin maya ikili hibrit sisteminde belirlediği etkileşimlerden yola çıkılarak, 337L (glikoprotein hormonu β zinciri sinyali I) ve 295L (iki taraflı nükleer lokalizasyon sinyali) genlerine ait arasında bir ilişkinin olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan literatür çalışmalarına göre, bu iki gene ait ürünlerin virus enfeksiyonu sırasında virus kapsidinin hücreye yapışması ve virus DNA'sının kolaylıkla nukleusa ulaşması aşamalarında etkin roller oynadıkları belirlenmiştir. Bu tezin amacı; 337L ve 295L genlerine ait proteinlerin BEVS'de üretilerek, bu iki protein arasındaki interaksyonları tespit etmektir.

2.YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. 337L ve 295L Genlerinin Elde Edilmesi

2.1.1. 337L Geninin Elde Edilmesi

337L geni CIV genomundan PCR ile çoğaltılarak elde edildi. Primerlerin sekans dizilerine HA-Taq yerleştirildi. Reaksiyon karışımı, 1 µl CIV DNA'sı (10 ng), 0.5 µl promega go Taq enzimi, 1 µl 337L-HA ileri (CCCTCGAGGCCACCATGATTATTAGAAATTTCCAAAACAAAC) ve 1 µl 337L-HA geri (GGGGTACCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGGTAA TTACATTTTTATTTCC) primerleri, 1 µl (10 mM) dNTPs, 5 µl 5X HF tamponu ve 35.5 µl steril su içerecek şekilde 50 µl olarak hazırlandı. PCR döngüsü primerlerin annealing sıcaklığına göre düzenlendi. Reaksiyon, 98 °C'de 30 sn, 98 °C'de 10 sn, 54°C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn, 72 °C'de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirildi. Yapılan agaroz jel elektroforezi sonucu görüntüleme yapıldı. Elde edilen 1170 bp uzunluğundaki bant temizleme kiti (Macherey Nagel) ile jelden temizlendi. Nanodrop ile yapılan ölçümler sonucu 337L geninin konsantrasyonu 11.7 ng/µl olarak belirlendi.

2.1.2. 295L Geninin Elde Edilmesi

295L geni, doktora öğrencisi Emine Özşahin tarafından daha önce oluşturulan *Escherichia coli* içindeki *pGBK-T7* plazmidinden elde edildi. Bakteri amfisilin içeren LB agara çizgi ekim yapıldı ve gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Sonra plazmid izolasyonu için bu kültürden tekrar gece kültürü hazırlandı ve DNA saflaştırma sistem kiti (Promega) kullanılarak plazmidler izole edildi. 295L geni çift enzim kesim reaksiyonu sonucu elde edildi. Kesim reaksiyonu, 1 µl *XhoI*, 4 µl tampon D, 20 µl 295L DNA'sı içeren *pGBK-T7* plazmidini, 15 µl dH₂O olacak şekilde toplam 40 µl olarak hazırlandı. Karışım ilk olarak 37 °C'de 4 saat boyunca *XhoI* restriksiyon endonükleaz ile kesildi. Kesimin ardından agaroz jel elektroforezi yapıldı ve kesilmiş 295L DNA'sı jelden temizlendi.

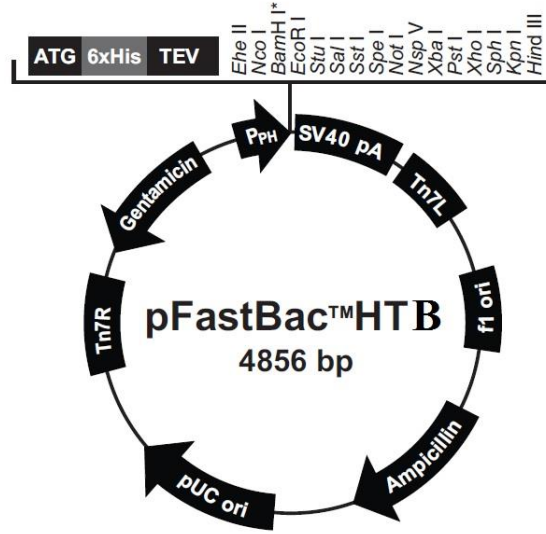
BamHI için ikinci kesim reaksiyonu 20 µl 295L kesilmiş DNA (*XhoI*), 1 µl *BamHI*, 4 µl tampon E ve 15 µl dH₂O olmak üzere 40 µl olarak hazırlandı. Restriksiyon 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Kesimin ardından jel elektroforezi yapıldı ve belirlenen 4032 bp uzunluğundaki bant temizleme kiti (Macherey Nagel) ile jelden temizlendi. Nanodrop ile yapılan ölçümler sonucu 295L geninin konsantrasyonu 10.6 ng/µl olarak belirlendi.

2.2. pFastBac HTB Plazmidinin Elde Edilmesi

pFastBac HTB plazmidi (Şekil 13) içeren *E. coli*, -80 °C stoktan amfisilin LB agar besiyerinde canlandırıldı. Plazmid izolasyonu için canlandırılan kültürden gece kültürü hazırlandı. Plazmid DNA, saflaştırma sistem kiti (Promega) ile izole edildi. Plazmid izolasyonunun ardından kesim reaksiyonu hazırlandı.

337L genin klonlanabilmesi için kesim reaksiyonu, 5 µl plazmid DNA, 1.5 µl *XhoI*, 1.5 µl *KpnI*, 1.5 µl tampon D, 1.5 µl tampon 110X, 1 µl AP (alkalin fosfataz) ve 18 µl steril su olacak şekilde hazırlandı. Kesim reaksiyonu 37 °C'de 4 saat boyunca gerçekleştirildi ve reaksiyon bitimine yarım saat kala karışıma 1 µl AP eklendi.

295L geninin klonlanabilmesi için kesim reaksiyonu, 20 µl plazmid DNA, 1 µl *XhoI* (Promega), 4 µl tampon D, 1 µl AP, 14 µl dH₂O ihtiva edecek şekilde toplam 40 µl olacak şekilde hazırlandı. Kesim 4 saat boyunca 37 °C'de gerçekleştirildi ve reaksiyonun bitmesine yarım saat kala karışıma 1 µl AP eklendi. Kesim sonrasında, karışım %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Elde edilen bant jel temizleme kiti ile temizlendi. Agaroz jelden temizlenen DNA ile yeni bir kesim reaksiyonu hazırlandı. Bu reaksiyon da 20 µl plazmid DNA, 1µl *BamHI* (Promega), 4 µl tampon E, 1 µl AP, 14 µl dH₂O ile toplam hacim 40 µl olacak şekilde hazırlandı. Kesim 2 saat boyunca 37 °C'de gerçekleştirildi ve reaksiyonun bitmesine yarım saat kala karışıma 1 µl AP eklendi. Konsantrasyon ölçümü nanodrop ile yapıldı. Ölçüm sonucu elde edilen vektörlerin konsantrasyonları 295L geni için 7.7 ng/µl ve 337L geni için 9.8 ng/µl olarak belirlendi.



Şekil 13. pFastBac 1.2 HTB vektör haritası

2.3. 337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerinin Oluşturulması ve Transformasyonu

2.3.1. Kompotent *E. coli* JM101 Hücrelerinin Hazırlanması

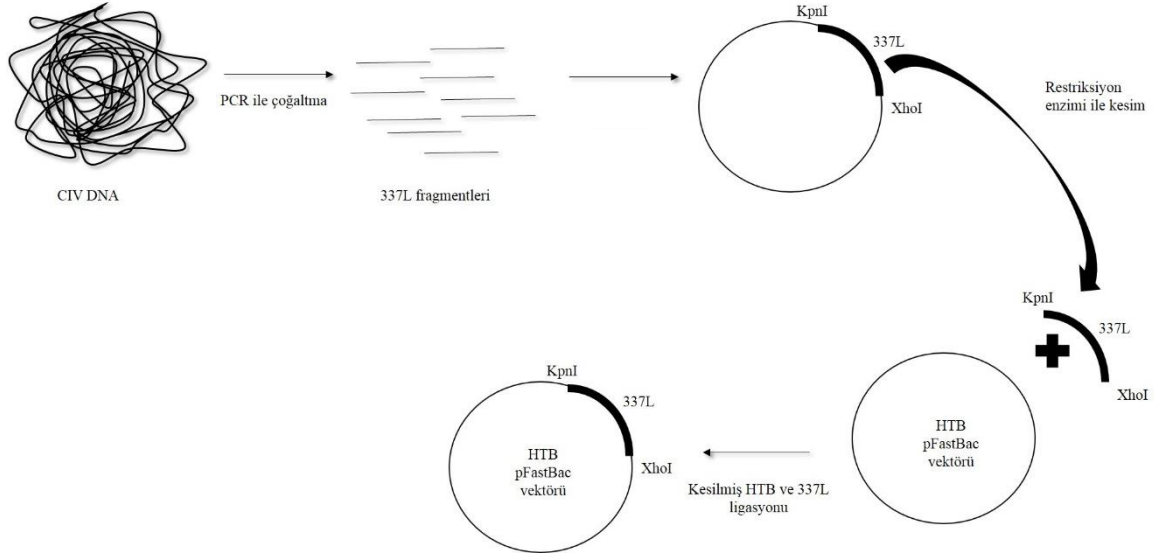
Kompotent *E. coli* JM101 hücrelerinin hazırlanması için, 4 °C'deki *E. coli* JM101 stoğundan antibiyotiksiz 3 ml Luria Broth (LB) besiyerine inokülasyon gerçekleştirilerek gece kültürü hazırlandı. İnkübasyondan sonra kültür 1:10 oranında sulandırma yapılarak 600 nm'de spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi. Son absorbans OD 600'da 0.1 olacak şekilde 30 ml antibiyotiksiz Luria Broth besiyerisine inokülasyon gerçekleştirildi. Karışım 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve inkübasyonun 50. dakikasından itibaren her 20 dakikada bir spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Son absorbans 0.45-0.55 OD olana kadar ölçüm gerçekleştirildi. Ölçümden sonra 50 ml falkon tüpe aktarılan bakteri süspansiyonu 4500 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 10 ml soğuk CaCl₂'de çözüldü ve 30 dakika buzda bekletildi. Sonra 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tekrar uzaklaştırılarak pellet 2 ml soğuk CaCl₂'de çözüldü ve kullanmadan önce 2 saat boyunca 4 °C'de bekletildi.

2.3.2. 337L Genin HTB Plazmidine Klonlanması ve Transformasyonu

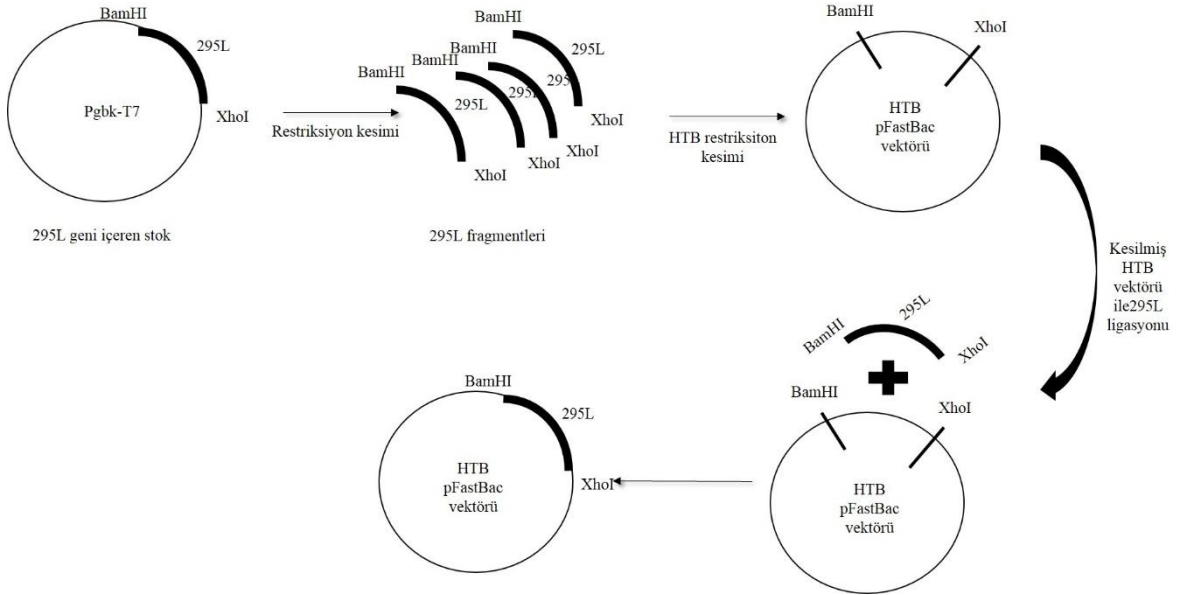
Ligasyon reaksiyonu, 0.5 µl HTB plazmidi, 4 µl 337L geni, 1 µl ATP, 1 µl T4 ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi ve son hacim 10 µl olacak şekilde 2.5 µl dH₂O eklenerek hazırlandı. Karışım gece boyu 4 °C'de bekletildi ve ertesi gün transformasyon için kullanıldı. Transformasyon yapılırken, 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 200 µl hazırlanan kompetent hücre ve 3 µl ligasyon ürünü konuldu ve 30 dakika buzda bekletildi. Bir sonraki aşamada karışıma ısıtıcı blok içerisinde 45 °C'de 2 dakika boyunca ısı şoku uygulandı ve tüp hemen buza transfer edildi. Karışım, hazırlanmış olan 1 ml LB inoküle edildi ve 45 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra 6000 × g'de 3 dakika boyunca santrifüj yapıldı ve pellet 150 µl LB besiyerisinde çözüldü. Bundan Amp⁺ katı agar besiyerisine yayma ekim yapıldı ve bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Petride büyüyen kolonilerden en büyükleri seçildi ve plazmid izolasyonu yapıldı (Şekil 14).

2.3.3. 295L Geninin HTB Plazmidine Klonlanması ve Transformasyonu

Ligasyon reaksiyonu, 6.5 µl HTB plazmidi, 11.8 µl 295L geni, 1 µl ATP, 2.5 µl T4 ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi ve son hacim 25 µl olacak şekilde 2.2 µl dH₂O eklenerek hazırlandı. Karışım gece boyunca 4 °C'de bekletildi ve ertesi gün transformasyon için kullanıldı. Transformasyon yapılırken, 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 200 µl hazırlanan kompetent hücre ve 3 µl ligasyon ürünü konuldu ve 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Bir sonraki aşamada 45 °C'de 2 dakika ısıtıcı blok içerisinde ısı şoku yapıldı ve tüp hemen buza transfer edildi. Karışım 1 ml LB besiyerisine inoküle edildi ve 45 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra 6000 × g'de 3 dakika boyunca santrifüj yapıldı pellet 150 µl LB besiyerisinde çözüldü. Bundan Amp⁺ agar besiyerisine yayma ekim yapıldı ve bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Petride büyüyen kolonilerden en büyükleri seçildi ve plazmid izolasyonu yapıldı (Şekil 15).



Şekil 14. 337L geninin HTB'ye klonlanması



Şekil 15. 295L geninin HTB'ye klonlanması

2.4. 337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerini İçeren Vektörlerin *Escherichia coli* DH10 Bac Hücrelerine Transformasyonu

2.4.1. Kompetent *E. coli* DH10 Bac Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetent DH10 Bac hücreleri hazırlanırken, 4 °C'deki stokta bulunan DH10 Bac hücrelerinden kanamisin ve tetrasiklin içeren LB Bac besiyerisi ile 3 ml gece kùltürü hazırlandı ve 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün, hazırlanan gece kùltürü 10 ml LB Bac besiyerisine inoküle edildi ve 3 saat 37 °C'de logaritmik faza ulaşana kadar büyütüldü. Bakteri kùltürü 15 dakika boyunca buzda bekletildi ve 4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 10 ml soğuk CaCl₂ ile çözüldü. Bakteri- CaCl₂ karışımı buz üzerinde 1.5 saat bekletildi ve 4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1 ml soğuk CaCl₂ ile çözüldü.

2.4.2. 337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetlerinin DH10Bac Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon işlemine gerçekleştirirken ısı çok metodundan yararlanıldı. Ependorf tüpü içerisine 100 µl kompetent DH10Bac hücreleri (şekil 16) ve 5 µl 337L-HTB gen kasetinden konuldu ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Karışıma 42 °C'de 45 saniye bekletilerek ısı şoku yapıldı. Steril ortamda cam kùltür tüpüne 900 µl LB ve ısı řoka uğramış hücreler konuldu. 37 °C'de 225 rpm'de 4 saat boyunca inkübe edildi. Seyreltikler 1:10 orasında dilüsyonlar hazırlandı ve her birinden 100 µl KTGXI agar besiyerine yayma ekil yapıldı. 37 °C'de 2 gece boyunca inkübasyon gerçekleştirildi.

2.5. 337L-HTB ve 295L-HTB Gen Kasetleri İçeren Bakmidlerin Sf9 Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu

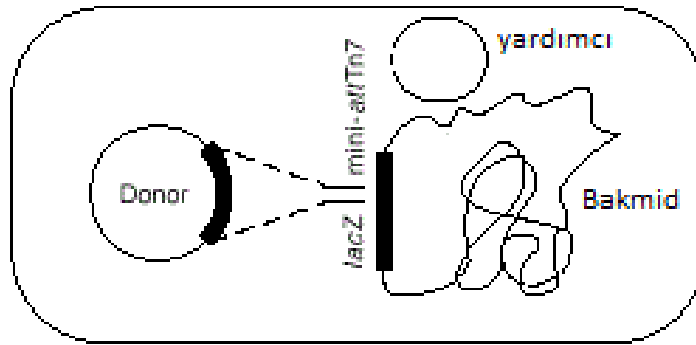
2.5.1. Sf 9 Böcek Hücrelerinin Temini ve Devamlılığı

Sf 9 hücreleri sıvı azot stoğundan temin edildi. Hücreler 27 °C'de % 5 fetal bovine serum (FBS) katılarak hazırlanmış SFM 900 II besiyerisinde canlandırıldı. 3 hafta boyunca, haftada iki kez olmak üzere pasajlandı. Pasajlama, 4 ml taze SFM 900 II (%5

FBS) besiyerinde çözülen hücrelerden yeni T25 flasklere 800 µl hücre transfer edilip, üzerine 3.2 ml taze SFM 900 II (%5 FBS) koyulması ile gerçekleştirildi.

2.5.2. HTB-337L ve HTB-295L İçeren *E. coli* DH10Bac Hücrelerinden Bakmid İzolasyonu

Transformasyon sonucu elde edilen petrillerdeki beyaz kolonilerden kanamisin, gentamisin ve tetrasiklin antibiyotiklerini içeren 2 ml LB Bac besiyerisine inokülasyon yapılarak, gece kültürü hazırlandı ve 37 °C'de gece boyu büyütüldü. Kültürün 1.5 ml'si alındı ve 14.000 x g'de santrifüj edildi. Geriye kalan 0.5 ml'lik kültür 4 °C'de muhafaza edildi. Santrifüjden elde edilen pelletin üzerine 300 µl solüsyon I (Tris-HCl, EDTA, RNase A) eklendi. Pellet hafif vorteks ve pipetleme yardımı ile çözüldü. Üzerine 300 µl solüsyon II (NaOH, SDS) eklendi. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve üzerine 300 µl 3 M potasyum asetat (pH 5.5) eklendi. Örnekler buz üzerinde 10 dakika boyunca bekletildi ve 14.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 800 µl izopropanol içeren tüplere aktarıldı ve 14.000 x g'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve pellet 2 kez 500 µl %70'lik alkol ile yıkandı ve yıkama işlemi için 14.000 x g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında 10 dakika kurutuldu. İzole edilen bakmidler 40 µl 1X TE tamponunda (pH 8.0) çözüldü ve 4 °C'de saklandı



Şekil 16. 337L ve 295L genleri içine alan *E. coli* DH10Bac hücresi

2.5.3. HTB-337L ve HTB-295L Gen Kasetlerini Taşıyan Bakmidlerin Sf9 Böcek Kültürlerine Transfeksiyonu

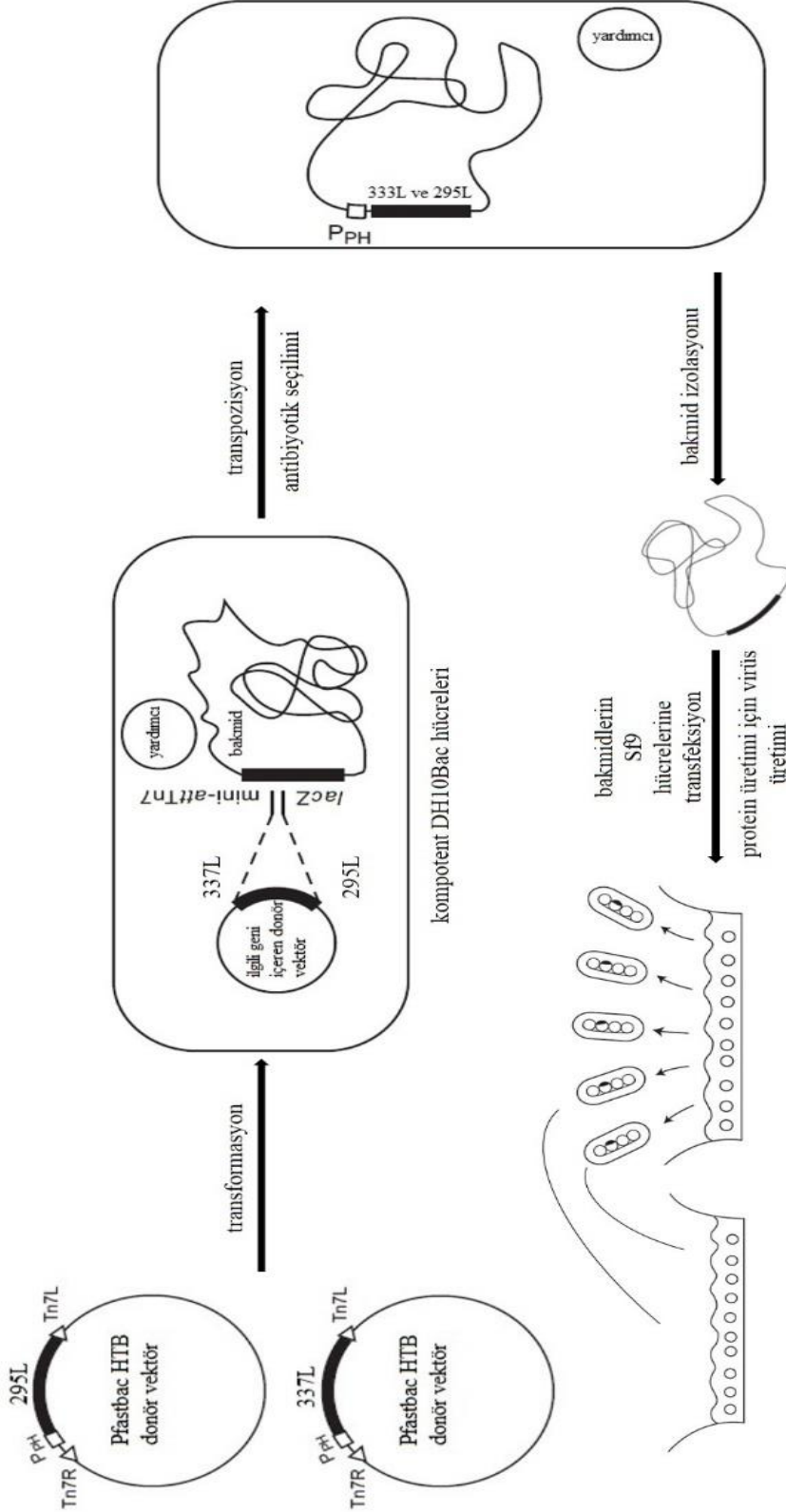
Pasajlama sırasında transfeksiyon yapmak için, ilk olarak $1.5-2.5 \times 10^6$ hücre/ml yoğunluğa sahip logaritmik fazda hücreler oluşturuldu. Hücreler, her bir gözde 8×10^5 hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde 6 gözlü sahip kültür kaplarına (3,6 mm çap) konuldu. Her bir göze 2 ml katkısız Grace's Insect besiyeri eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Her bir örnek için, 1.5 ml'lik ependof içinde 100 µl katkısız Grace's Insect besiyeri (antibiyotiksiz) ve 10 µl lipofektinamine (Invitrogen) solüsyonu hazırlandı. Her bir örnek için, 1.5 ml'lik ependorf içinde 100 µl katkısız Grace's Insect besiyeri ile 337L ve 295L genlerine ait 1 µg bakmid örneği (6 µl) eklenerek solüsyon hazırlandı. Aynı şekilde hazırlanan iki ependorf karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Hazırlanan 210 µl'lik solüsyon hazırlanan hücrelerin üzerine damla damla eklendi. Hücreler 27 °C'de 5 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra transfeksiyon karışımı uzaklaştırıldı ve antibiyotik ve % 5 FBS-SFM 900 II içeren besiyerisinden 2 ml eklendi ve 27 °C, de 72 saat inkübe edildi (Şekil 17).

2.5.4. 337L ve 295L Genlerini İçeren P1 Viral Stoklarının Üretimi ve İzolasyonu

337L ve 295L genine ait P1 viral stoklarının üretimi için, viral enfeksiyon belirtileri gösteren transfekte olmuş hücrelerin hepsi 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Hücreleri ayırmak için $500 \times g$ 'de 5 dakika santrifügasyon yapıldı. Süpernatant, 0.45 µm'lik filtreden geçirildi ve steril 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı ve 4 °C'de ışık görmeyecek şekilde muhafaza edildi.

2.5.4.1. 337L ve 295L Genleri İçeren Bakülovirüs Stoklarının Çoğaltılması

Pasajlama sırasında virüs üretimi için Sf9 hücreleri, T25 flasklarda üretildi. Hücreler gözlerdeki konsantrasyon 2×10^6 hücre olacak şekilde kuyucuklara bırakıldı. Tabana tutunmaları için hücreler bir saat boyunca inkübasyon yapıldı. Bir saat sonra, 337L ve 295L genlerine ait p1 viral stoklarından 250 µl hücrelerin üzerine eklendi ve 96 saat inkübe edildi. Sonra hücreler $500 \times g$ 'de 5 dakika santrifügasyon yapıldı. Süpernatant 0.45 µm'lik filtreden geçirildi ve 15 ml'lik tüplerde (Falcon) 4 °C'de ışık görmeyecek şekilde muhafaza edildi.



Şekil 17. 337L-HTB ve 295L-HTB gen kasetlerinin transfeksiyonu ve virüs çoğaltılması

2.5.5. 337L ve 295L Genlerine Ait Rekombinant Proteinlerin Üretimi, İzolasyonu ve Belirlenmesi

2.5.5.1. Sf9 Hücrelerinin 337L ve 295L Genlerini İçeren Viruslerle Enfeksiyonu ve Protein Saflaştırılması

Enfeksiyonda kullanılacak hücre yoğunluğu 6×10^6 hücre/ml olacak şekilde T25 flasklarda subkültür yapıldı. Enfeksiyon günü, hücreler 4 ml taze SFM 900 II besiyerisinde (%5 fetal bovine serum) süspansiyon hale getirildi ve hücreler 2 ml olmak üzere ayrı T75 flasklara aktarıldı. Hücrelerin tabana tutunması için $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de iki saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra son hacim 2 ml olacak şekilde 500 μl 337L ve 500 μl 295L genlerini içeren virüsler, T75 flasklarından 500 μl besiyeri uzaklaştırılarak eklendi. İki saat boyunca sallayıcıda inkübasyon yapıldı. Son hacim 7 ml olacak şekilde her flaska 5 ml %5 FBS içeren SF 900 SFM II besiyeri eklendi. Hücreler $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 72-96 saat inkübe edildi.

Protein izolasyonu için; 337L ve 295L genlerini içeren p2 virüsler ile enfekte olmuş hücreler enfeksiyondan 72. saat sonra 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 0.45 μm 'lik filtreden geçirilip, steril 15 ml'lik falcon tüplerine aktarıldı. Pellet, önceden hazırlanmış 1:10 oranında (1X) seyreltilmiş steril PBS (Fosfat tampon tuz) tamponu içinde çözüldü. Çözme sırasında ise 1 tane proteinaz inhibitörü tableti 1X PBS süspansiyonuna eklendi. Süspansiyon 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Protein izolasyonu Promega Mag-his protein purification system kitine uygun şekilde yapıldı. Donmuş pelletlerin üzerlerine 3 ml 1X PBS, 330 μl DNaz eklendi ve 330 μl hücre parçalama solüsyonu eklendi ve 10 dakika döndürmeli karıştırıcıda santrifüj yapıldı. Kitin içinde bulunan ve proteinlerin ilk aşamada bağlanmasını sağlayan nikel vortekslendi, çözüldü ve 90 μl nikel tüplere ayrı ayrı konuldu ve alt üst yapıldı. Oda sıcaklığında iki dakika bekletildi. Mıknatısa tutuldu ve beyaz faz ayrı tüpe alındı. Nikel ile mıknatısa tutunan kısım yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı. Her yıkama sırasında 15 defa tüpler alt üst yapıldı ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Yıkanan nikeller mıknatıs ile tekrar muamele edildi. Yıkamalar sırasında her mıknatısa tutuktan sonra beyaz faz uzaklaştırıldı ve son pellet 500 μl çözücü tamponda çözüldü oda sıcaklığında iki dakika bekletildi ve mıknatısa tutuldu. Nikel ortamdan uzaklaştırıldı. Şeffaf sıvı (faz) ayrı bir tüpe alındı ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.5.5.2. 337L ve 295L Genlerine Ait Rekombinant Proteinlerin Konsantrasyonunun Ölçümü

Protein konsantrasyon ölçümü 96 gözlü kültür kaplarında ve spektrofotometri kullanılarak gerçekleştirildi. Takara 96'lık plate içinde soldan sağa doğru (1-7) ve birinci sütundan D, E, F kuyularına da 200 µl Bradford boyası konuldu. A ve B satırındaki (1-7) her kuyuya 10 µl sırası ile 0 µg, 50 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg ve 300 µg BSA içeren solüsyonlardan konuldu. Protein örnekleri 5 µl olacak şekilde ilgili kuyulara eklendi ve üzerlerine 0.15 M 5 µl NaCl ilave edildi. Analiz için çok gözlü okuyucu, (molecular devices spretra max M2) cihaz kullanıldı. Absorbans OD₅₉₅'te ölçüldü ve 337L ve 295L genine ait rekombinant proteinin konsantrasyonu sırasıyla 9.4 µg/µl ve 6.7 µg/µl olarak belirlendi.

2.5.5.3. 337L ve 295L Genlerine Ait Rekombinant Proteinlerin SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri ile Belirlenmesi

2.5.5.3.1. 337L ve 295L Rekombinant Protein Örneklerinin SDS-PAGE'de Yürütülmesi

337L ve 295L genine ait saflaştırılmış rekombinant proteinlerden 15 µl alındı ve 60 µl yürütme boyasına koyulduktan sonra 98 °C'de 15 dakika bekletildi ve 14.000 rpm'de bir dakika santrifügasyon yapıldı.

Jel hazırlanırken ilk olarak ayırma jeli %12'lik olarak döküldü. Bunun için 4 ml akrilamid solüsyonu, 4.65 ml H₂O, %10'luk SDS'den 0.1 ml, 3M Tris tampondan (pH 8.8) 1.25 ml, %10'luk APS'den (Amonyum persülfat) 120 µl ve 12 µl TEMED'den bir beherde karıştırılarak 1.0 mm'lik *biorad sds-page jel* ünitesine döküldü. Jelin donmasından sonra yığma jel hazırlandı. Bunun için, 0.67 ml akrilamid solüsyonu, 3.63 ml H₂O, %10'luk SDS'den 0.05 ml, 3M Tris (pH 6.8)'den 0.625 ml, %10'luk APS'den 120 µl ve 12 µl TEMED alındı ve solüsyon bir beherde karıştırıldıktan sonra %12'lik jelin üst kısmına döküldü. Sonra jelin üzerine 1.0 mm'lik taraklar takıldı ve donması için beklenildi. Protein örnekleri kuyucuklara yerleştirildi. Bantlar düz hale gelene kadar 20 mAh ve sonrası 40 mAh'de bir buçuk saat yürütüldü. Bantlar uygun mesafeye yürüdükten sonra jeller cam bloklar arasından temizlendi ve SDS-PAGE Western Blot analizi için membrana aktarıldı.

2.5.5.3.2. SDS-PAGE Jelin Membrana Aktarılması ve Görüntülenmesi

SDS-PAGE jelin membrana aktarılması için, 4 tane whattman kağıdı ve 1 tane de 7.5 cm x 6.5 cm boyutlarında membran kesildi. Büyük bir petri içerisine 20 ml metanol ve 80 ml elektroblotlama tamponu konuldu. Elektroblotlama ünitesine (Biorad Trans-blot SD) öncelikle hazırlanan solüsyonda yıkanmış 2 whattman kağıdı üst üste konuldu. Üzerine hazırlanan solüsyonda yıkama membran konuldu ve üzerine proteinlerin bulunduğu jel konuldu. Diğer 2 whattman kağıdı yukarıda hazırlanan karışım ile yıkayıp jelin üzerine konuldu. Arada kalan kabarcıklar ortamdan uzaklaştırıldı. Cihaz 40 mAh'de 1 saat boyunca çalıştırıldı. Elde edilen membranlar 50 ml 1X PBS içinde çözülen 2.5 gr süt tozunda (%3) yıkandı ve bekletildi.

Membranlardan görüntüleri elde etmek için, 400 ml 1X PBS içinde 2 gr süt tozu çözüldü ve membran bu karışımla 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı. 337L geni için bu karışımın 4 ml'si içine 0.4 µl monoklonal anti his antikor (Sigma) ilave edildi ve membran bir saat süre ile dönerli halde muamele edildi. 295L geni için bu karışımın 4 ml'si içine 0.4 µl HA antikor (Sigma) ilave edildi ve membran bir saat süre ile dönerli halde muamele edildi. Birinci antikor muamelesinden sonra membranlar 3 kez 10 dakika süre ile süt tozu solüsyonu ile yıkandı. Ardından 337L geni için ikinci antikor olarak 4 ml süt tozuna 0.4 µl antifare Ig G Alkalın Fosfataz keçide üretilmiş (Sigma) ilave edildi ve 295L geni için ikinci antikor olarak 0.4 µl HA taq poliklonal antikor (Sigma) ilave edildi. Bir saat süre ile bu solüsyonla dönerli halde muamele edildi. Membranlar 3 kez 10 dakika süre ile süt tozu solüsyonu ile yıkandı ve 2 kez 10 dakika süre ile 1X A.P. (Alkalın fosfataz) tamponu ile yıkandı. En son görüntüleme için, 10 ml 1X A.P tamponu içerisine belirteç olarak 100 µl NCI/BCIP eklendi. Hazırlanan solüsyon ayrı ayrı yıkanmış membranlar üzerine eklendi ve görüntüleme gerçekleştirildi.

2.6. 337L ve 295L Proteinlerinin Birbiri Arasındaki Etkileşimin Belirlenmesi

337L ve 295L proteinleri arasındaki etkileşimi belirlemek için, proteinler böcek hücre kültüründe üretildi. 337L ve 295L genlerini içeren virüs solüsyonlarından 500'er µl alınarak Sf9 hücrelerinde ayrı ayrı enfeksiyon T75 hücre kültürü flasklarında gerçekleştirildi (*In vitro*). Bunun yanısıra, hem 337L hem de 295L virüs solüsyonundan 500'er µl alınarak sf9 hücrelerinde aynı T75 hücre kültürü kabı kullanılarak enfeksiyon

gerçekleştirildi (*In vivo*). Enfekte olmuş Sf9 böcek hücreleri kısım 2.5.5.1'de bulunan protokole uygun şekilde toplandı. Proteaz inhibitörü solüsyonunda yıkanan hücreler -80 °C'de saklandı. Daha sonra 337L ve 295L'ye ait olan hücre lizatları 4 °C'de döndürücü yardımı bir deney tüpü içerisinde 4 saat boyunca muamele edildi (*In vitro*). Aynı flask içinde yapılan enfeksiyona ait örnek (*In vivo*) için hücreler toplandı. 337L, 295L, 337L-295L (*In vivo*) ve 337L-295L (*In vitro*) karışım'a ait olan pelletlerden protein izolasyonu kısım 2.5.5.1'deki protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

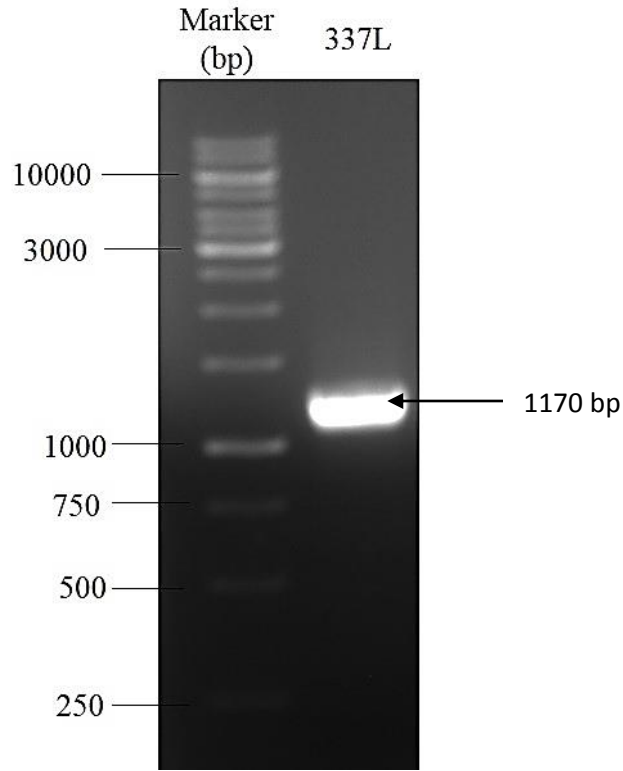
Elde edilen saf proteinler arasında etkileşimin var olup olmadığı SDS-PAGE ve Western Blot analizi H-taq'a ait olan antikolar ile gösterildi. Proteinlerin yürütüleceği %12'lik jel kısım 2.5.5.3.1'e uygun şekilde hazırlandı. Saf proteinleri ve yürütme boyası içeren dört ayrı deney tüpü 98 °C'de 10 dakika boyunca kaynatıldı. Örnekler 15 µl olacak şekilde jele yüklendi ve 50 volt/saat yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra 2.5.5.3.2'de anlatıldığı şekilde jeldeki örnekler membrana aktarıldı ve bir gece 4 °C'de süt tozu (%3) içerisinde bekletildi. Membranda görüntü elde etmek için, 400 ml 1X PBS içinde 2 gr süt tozu çözüldü ve membran bu karışımla 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı. Protein etkileşiminin var olup olmadığını görmek için bu karışımın 4 ml'si içine 0.4 µl HA antikor (Sigma) ilave edildi ve membran 1.5 saat süre ile dönerli halde muamele edildi. Birinci antikor muamelesinden sonra membranlar 3 kez 10 dakika süre ile süt tozu solüsyonu ile yıkandı. Membran, süt tozu karışımı içindeki ikinci antikor olarak 0.4 µl HA taq anti-poliklonal antikor (Sigma) bulunan bu solüsyonla bir buçuk saat süre ile dönerli halde muamele edildi. Membran 3 kez 10 dakika süre ile süt tozu solüsyonu ile yıkandı ve 2 kez 10 dakika süre ile 1X A.P. tamponu ile yıkandı. Son olarak görüntüleme için, 10 ml 1X A.P tamponu içerisine 100 µl NCI/BCIP eklendi. Hazırlanan solüsyon yıkanmış membran üzerine eklendi ve görüntüleme gerçekleştirildi.

3.BULGULAR

3.1. 337L ve 295L Genlerinin Elde Edilmesi

3.1.1. 337L Geninin PCR ile çoğaltılması

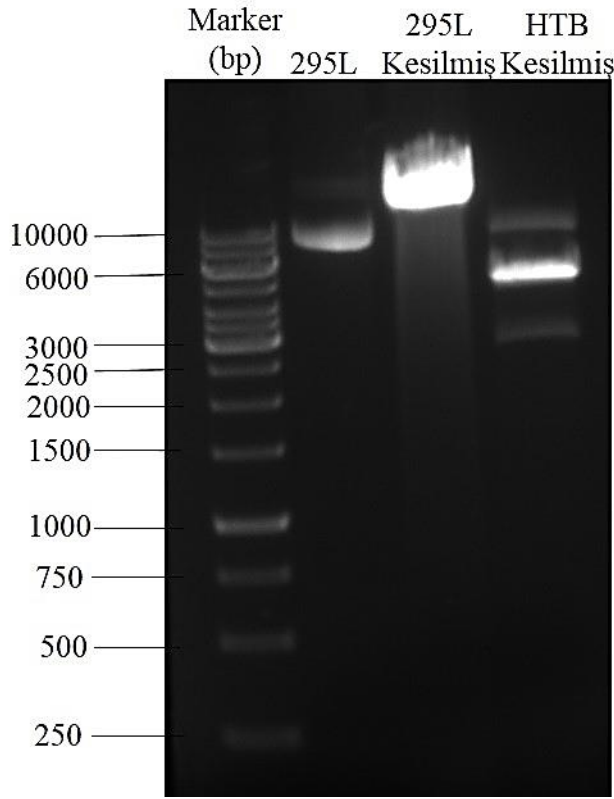
Chilo Iridescent Virus'ün 337L genini moleküler olarak elde edebilmek için hazırlanan 337L-ha primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Çođaltma sonunda 337L geni 1170 bp büyüklüğünde agaroz jelde görüntüledi (Şekil 18).



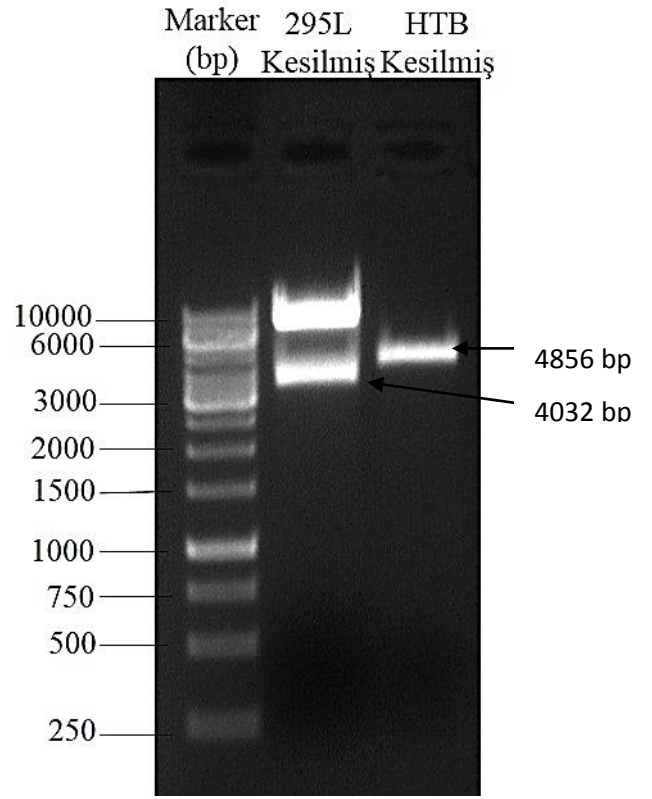
Şekil 18. 337L geninin PCR ile oğaltılması

3.1.2. 295L Genin Pgbk-T7 Plazmidinden Elde Edilmesi

295L geni Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ait -80 °C stoğundaki Emine Özşahin'e ait olan *pGBK-T7* plazmidinden *XhoI* ve *BamHI* enzimleri ile kesim yapılarak elde edildi. HTB'ye ligasyon için ayrı bir kesim yapılmadı. Çünkü birleşme noktaları aynı olacak şekilde ayarlandığı için HTB vektörü de aynı anda kesildi. Kurulan reaksiyon çift aşamalı gerçekleştirildi. Birinci kesim, *XhoI* enzimi ile gerçekleştirildi (Şekil 19) ve ikinci kesim, *BamHI* enzimi ile yapıldı (Şekil 20). Kesim sonucunda 295L geni 4032 bp büyüklüğünde, HTB vektörü ise 4856 bp büyüklüğünde agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.



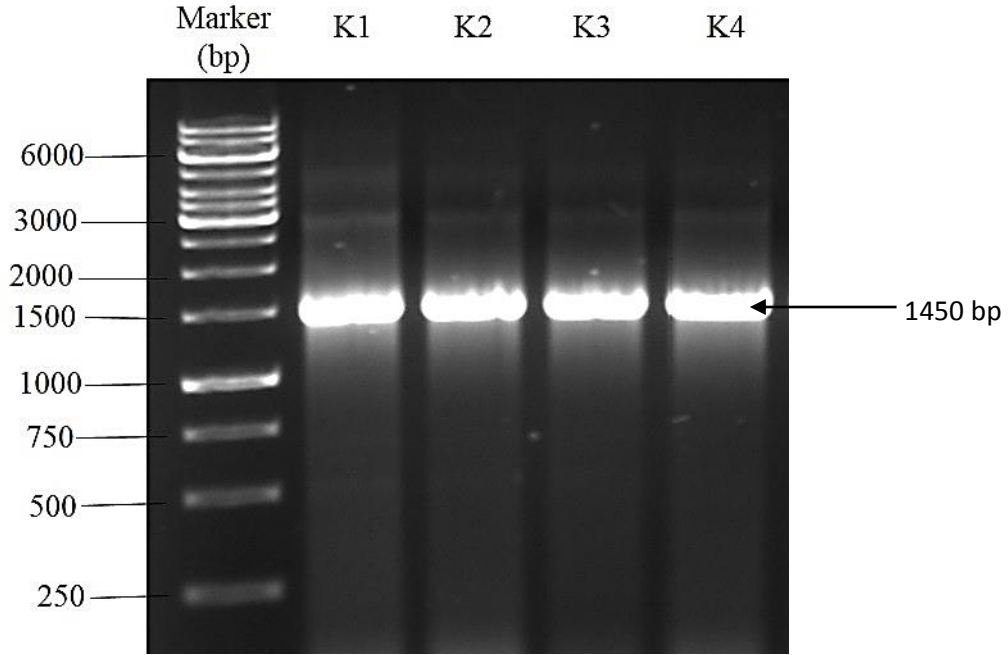
Şekil 19. 295L *XhoI* kesimi



Şekil 20. 295L *BamHI* kesimi

3.2. 337 Genin CloneJET Transfer Vektörüne Klonlanması ve Koloni PCR

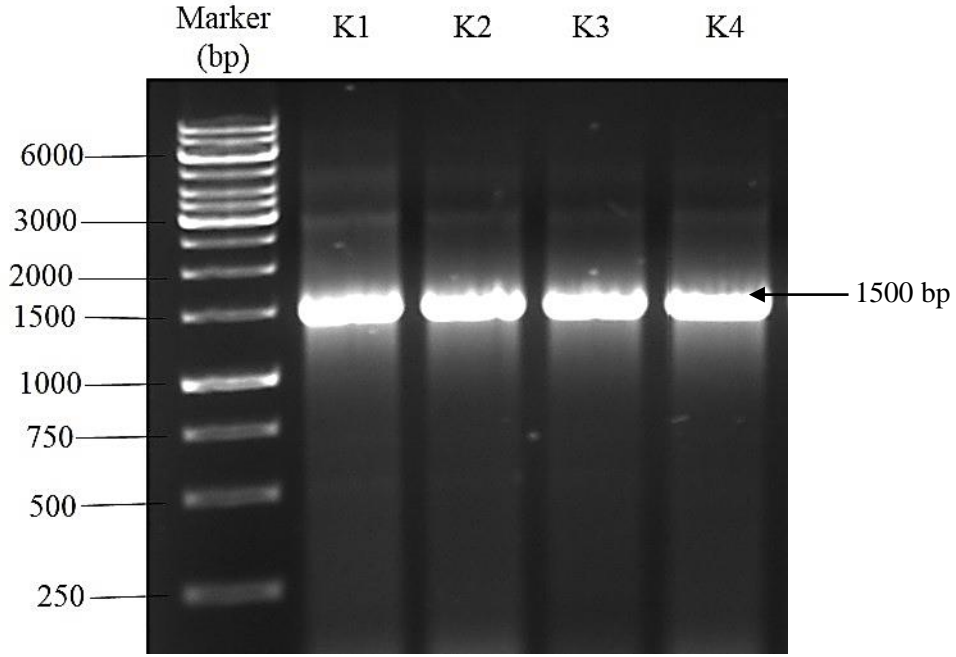
PCR sonucu elde edilen 337L geninin verimli bir şekilde, restriksiyon kesimi sırasında gen dizisinden kayıp yaşamamak için CloneJET PCR Cloning Kit ile 20 dakikalık ligasyon deneyi ile klonlandı ve transformasyon gerçekleştirildi. Yapılan agaroz jel elektroforezinde kuyulara yüklenmiş olan dört klon da pozitif olarak 1450 bp büyüklüğünde görüntülendi (Şekil 21). Koloniler HTB vektörüne klonlanmak için kesim reaksiyonu ile muamele edildi.



Şekil 21. 337L içeren doğrulanmış koloniler

3.3. 337L-HTB Gen Kasetini İçeren Kolonilerin PCR ile Doğrulması

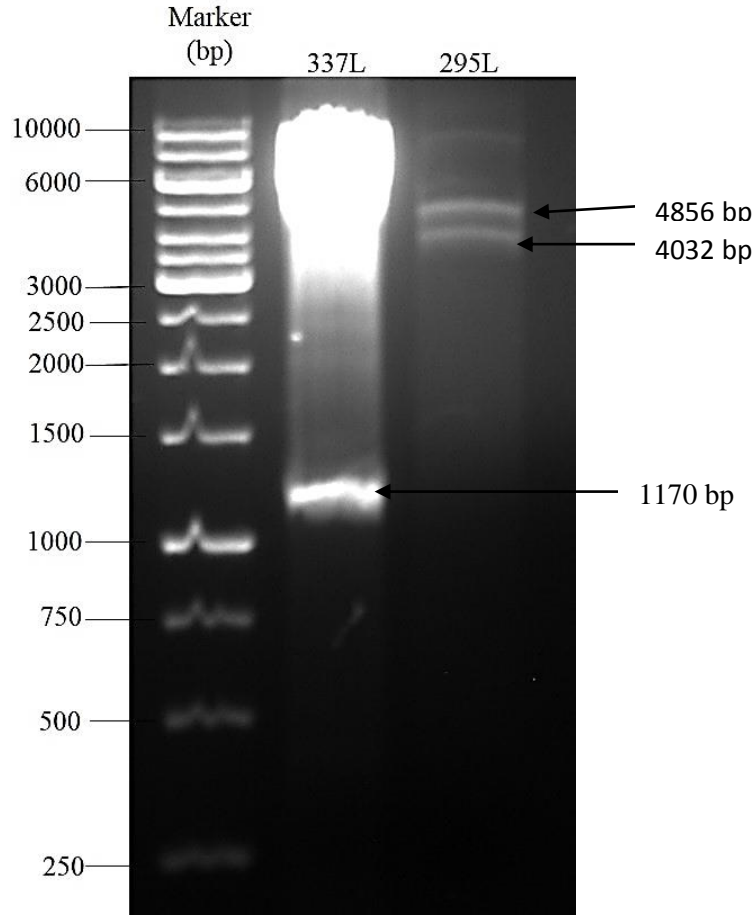
337L-HTB gen kasetini doğrulamak için PCR gerçekleştirildi. Promega *Go-Taq* enzimin kullanıldığı reaksiyon bağlanma sıcaklığı 55 °C'de 25 döngü olarak gerçekleştirildi. Döngü sırasında M13 ileri ve geri primer seti kullanıldı. Elde edilen tüm koloniler pozitif olarak 1500 bp büyüklüğünde agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 22).



Şekil 22. 337L-HTB gen kasetinin PCR ile doğrulanması

3.4. 295L-HTB Gen Kasetini İçeren Kolonilerin Kesim Reaksiyonu ile Doğrulanması

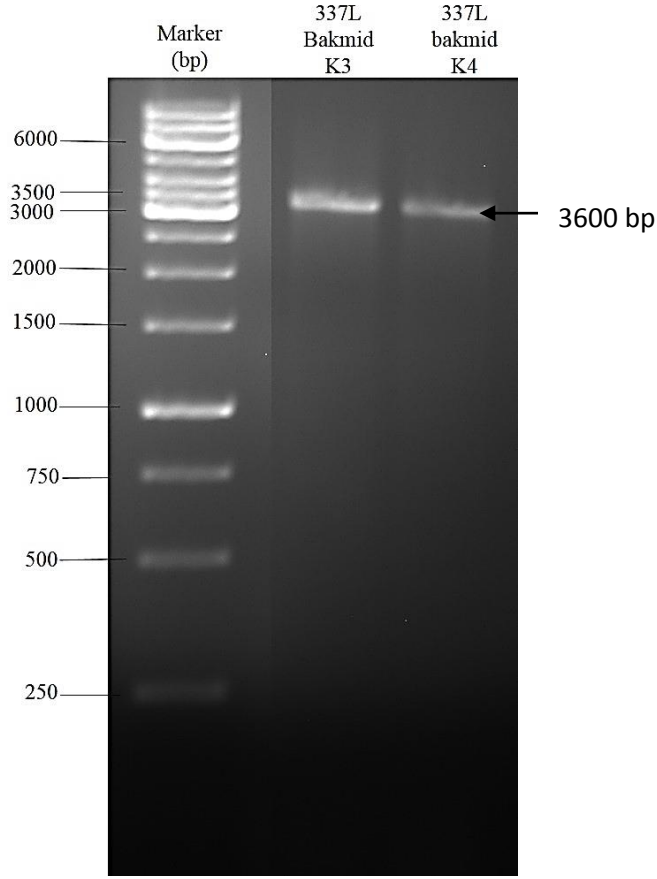
295L-HTB gen kasetini doğrulamak için yapılan PCR gen ve plazmidin toplam büyüklüğü fazla olduğu için verim alınamadı. Bu nedenle geri kesim reaksiyonu ile 295L geninin HTB vektörü içindeki varlığı doğrulandı. Kesim reaksiyonu çoklu kesim olacak şekilde *XhoI* ve *BamHI* enzimleri aracılığıyla 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Aynı anda 337L-HTB klonu da kesildi. Her iki gen kasetinin pozitif koloni olduğu belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23. 337L ve 295L doğrulama kesimi

3.5. 337L-HTB Bakmid Kolonilerinin PCR ile Doğrulanması

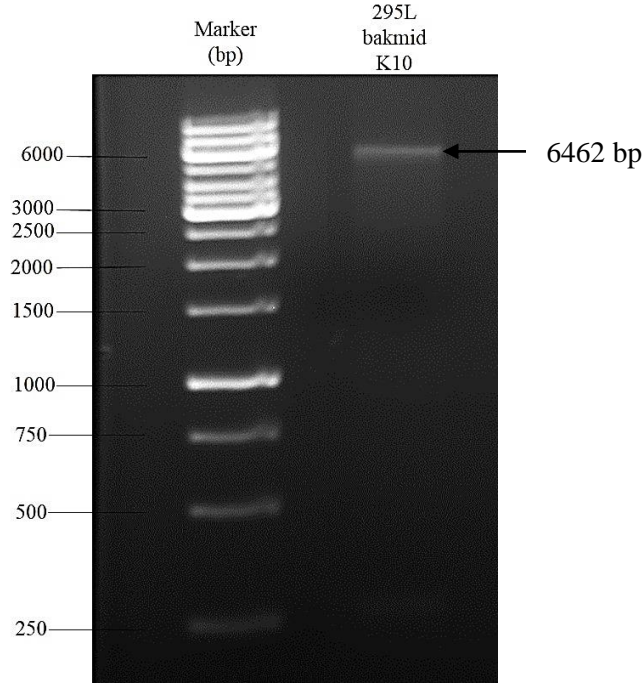
Tranfeksiyon sırasında üretilen gen kasetlerinin enfeksiyon yapması için tasarlanan DH10bac hücrelerinde 337L-HTB gen kasetinin var olduğunu ispat etmek için PCR yardımı ile doğrulama yapıldı. Doğrulama için kullanılan 5 koloniden 2 tanesi pozitif olarak belirlendi. Pozitif kolonilerin bantları 3600 (2430 bp bakmid + 1170 bp 337L) bp boyutunda agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 24).



Şekil 24. 337L-HTB gen kasetinin bakmid PCR doğrulanması

3.6. 295L-HTB Bakmid Kolonilerinin PCR ile Doğrulanması

Tranfeksiyon sırasında üretilen gen kasetlerinin enfeksiyon yapması için tasarlanan DH10bac hücrelerinde 295L-HTB gen kasetinin var olduğunu ispat etmek için PCR yardımı ile doğrulama yapıldı. Doğrulama için kullanılan 2 koloniden 1 tanesi pozitif olarak belirlendi. Pozitif koloni bantı 6462 bp (2430 bp bakmid + 4032 bp 295L) büyüklüğünde olduğu agaroz jel elektroforezi ile belirlendi (Şekil 25).

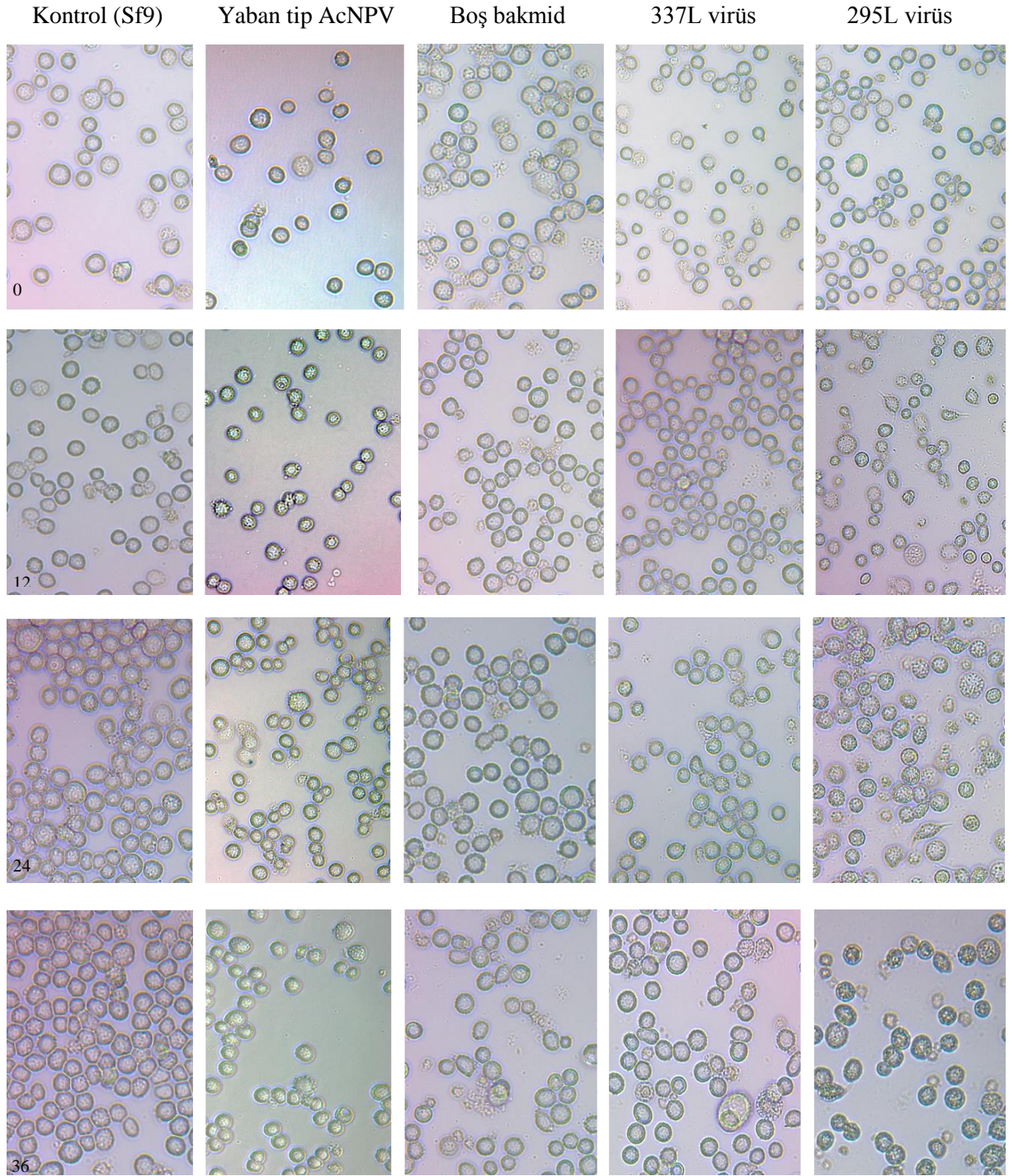


Şekil 25. 295L-HTB gen kasetinin bakmid PCR doğrulanması

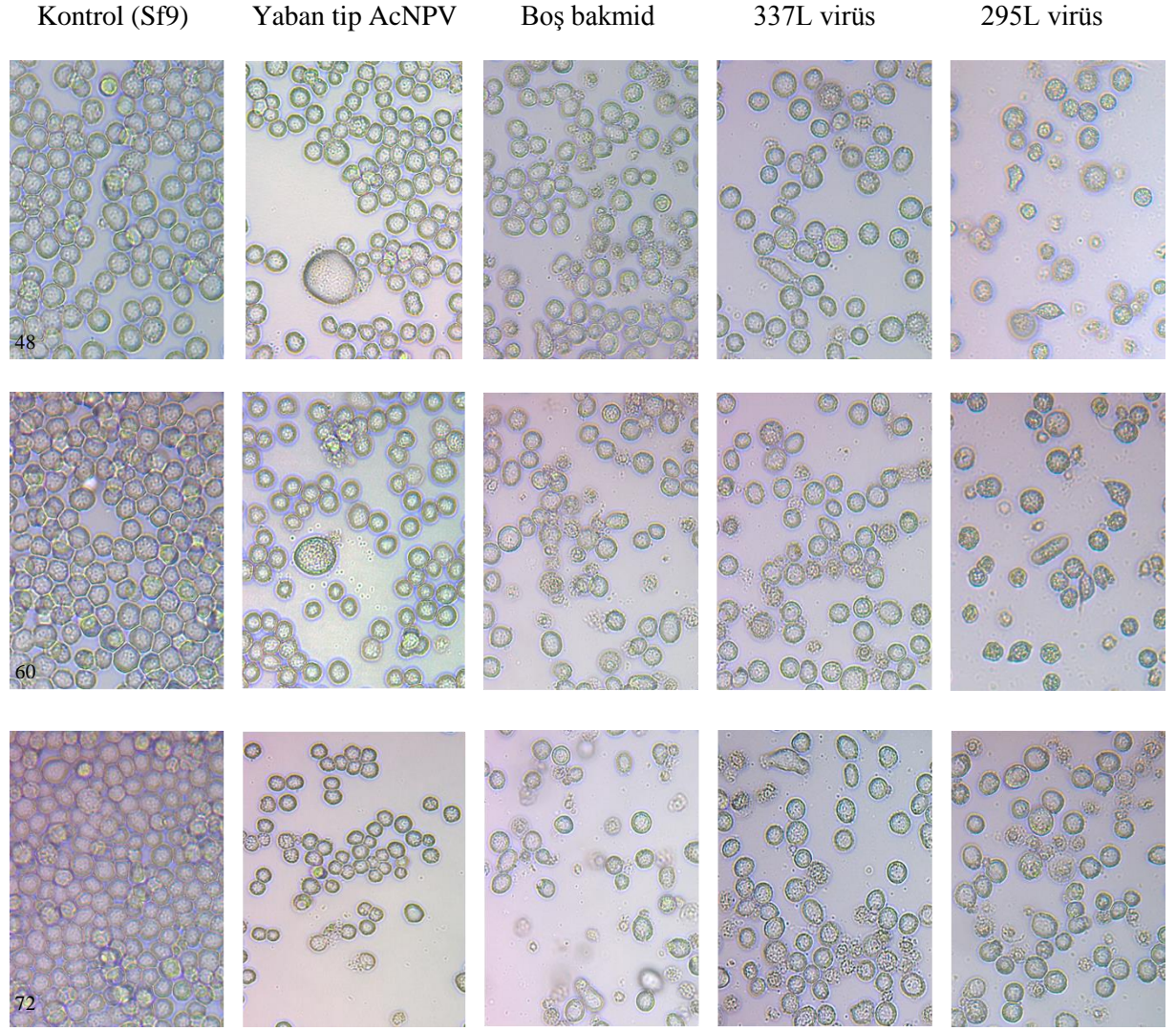
3.7. Sf9 Hücrelerinin 337L-HTB ve 295L-HTB Genlerini İçeren Bakmidler ile Enfeksiyonları

337L-HTB ve 295L-HTB gen kasetleri için Bac-to-bac Bakülovirus Ekspresyon Sistem’inde (Invitrogen) bulunan protokoller kullanılarak yapılan enfeksiyonun 0. , 12., 24., 36., 48., 60. ve 72. saatlerinde çekilen fotoğraflarda gösterildi. Enfeksiyondan 0 saat sonra pasajlamadan dolayı az stresli görülen hücreler 12 saatin sonunda hücreler granülleşmeye başladılar. Yirmi dördüncü saat içerisinde yaban tip bakülovirüs ile enfektif hücrelerde yoğun olmak üzere virüs salınımı gözlemlendi. Otuz altıncı saatin sonunda kontrol hücrelerine göre hücre çoğalması oldukça durdu ve sitopatik etkilerden hücre şekillerinin değişimi gözlemlendi (Şekil 26).

Enfeksiyondan 48 saat sonra şekilleri uzamaya başlayan Sf9 böcek hücreleri daha belirgin görülürken, patlayarak parçalanmış hücre sayısı arttı. Enfeksiyondan 60 saat sonra hücreler tamamen tabandan kopmuş şekilde gözlemlendi. Enfeksiyondan 72 saat sonra normal büyüme seyrini koruyan kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında virüs partiküllerini salan hücrelerle birlikte hücre parçaları gözlemlendi (Şekil 26).



Şekil 26. Sf9 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkiler, rakamlar enfeksiyon saatini gösterir

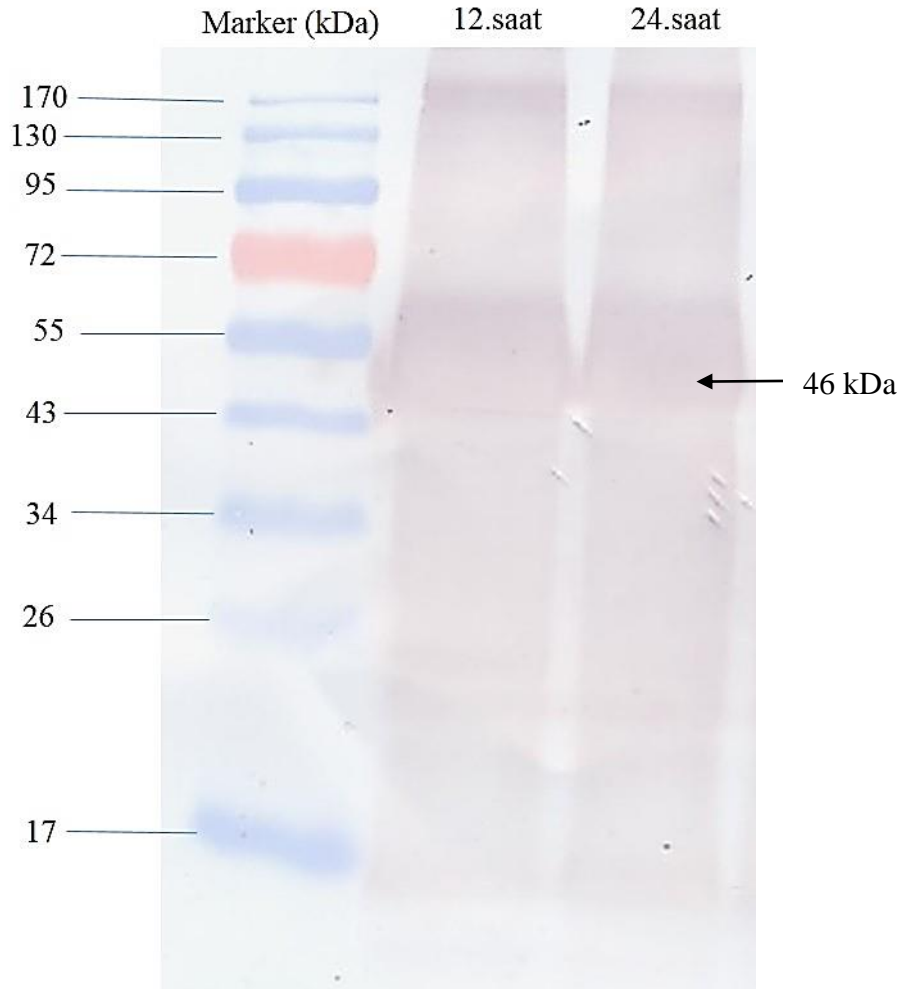


Şekil 26. Sf9 hücrelerinde meydana gelen sitopatik etkiler, rakamlar enfeksiyon saatini gösterir

3.8. 337L ve 295L Proteinlerinin Western Blot Analizi ile Gösterilmesi

3.8.1. 337L Proteininin Western Blot Analizi

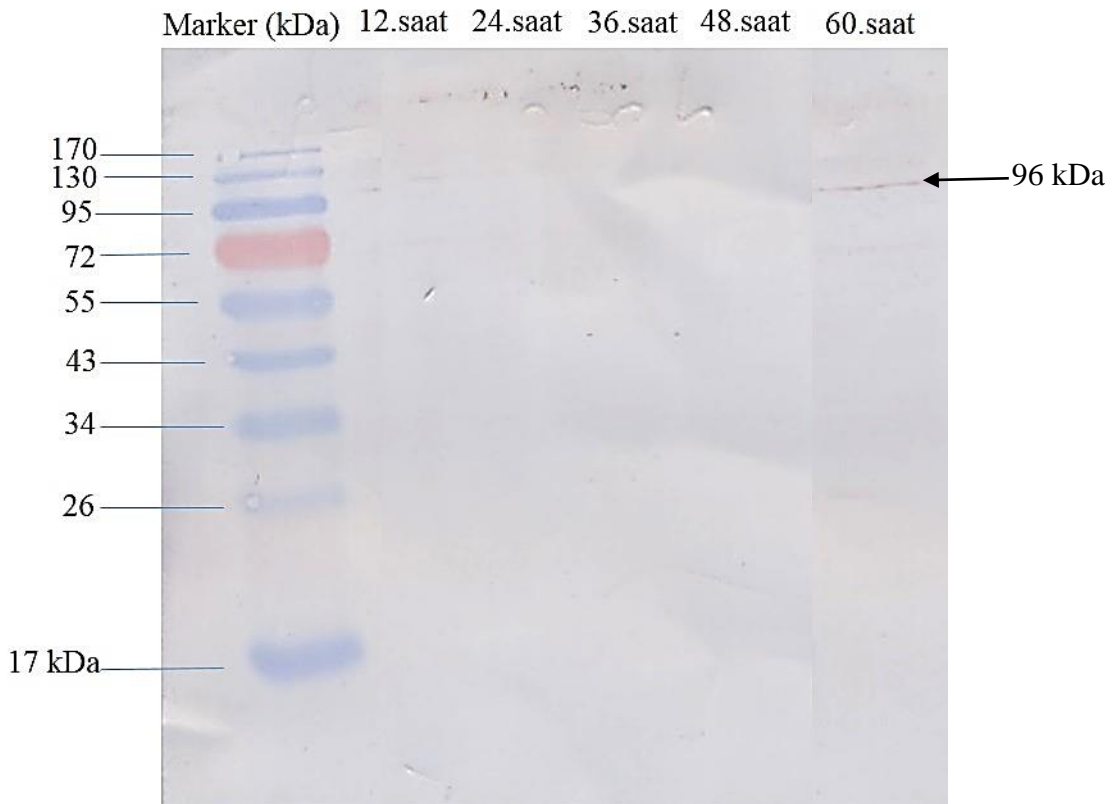
337L proteinlerinin görüntülenmesi için Western Blot analizi gerçekleştirildi. SDS-PAGE jeline yükleme yapılırken, Sf9 hücrelerinde yapılmış olan enfeksiyondan 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerde örnekler toplandı. Membrana aktarıldıktan sonra analiz HA-antikor ve HA taq poliklonal antikor (antirabbit) ile tamamlandı. Şekil 34'de görüldüğü gibi 337L proteinleri toplanan tüm örneklerde yoğun şekilde 46 kDa büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 28).



Şekil 27. 337L proteininin Western Blot ile Gösterimi

3.8.2. 295L Proteininin Western Blot Analizi

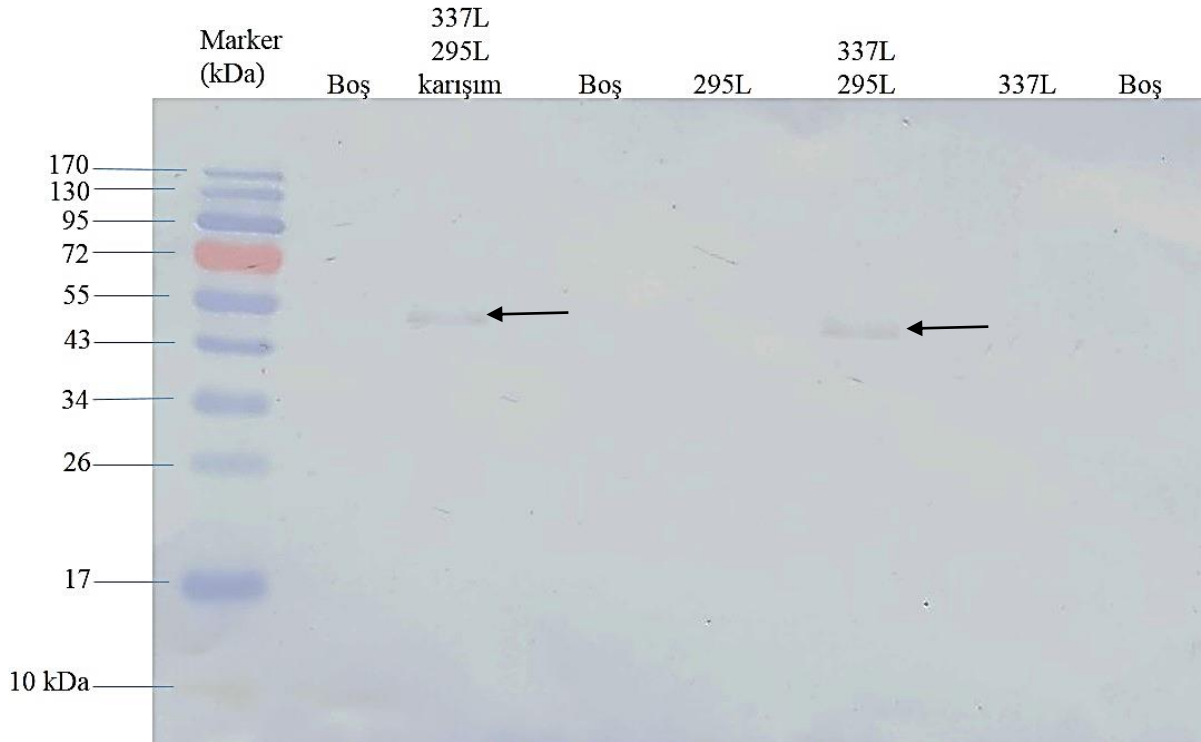
295L proteinlerinin görüntülenmesi için Western Blot analizi gerçekleştirildi. SDS-PAGE jeline yükleme yapılırken, Sf9 hücrelerinde yapılmış olan enfeksiyondan 12, 24, 36, 48 ve 60. saatlerde örnekler toplandı. Membrana aktarıldıktan sonra analiz monoklonal anti-his antikor ve Ig G alkalın fosfat (produced in goat) ile tamamlandı. Protein sentezinin 60. saatte başladığı belirlendi. Western blot analizi sonucunda elde edilen bandın boyutu 96 kDa olarak belirlendi (Şekil 29).



Şekil 28. 295L proteininin Western Blot Analizi

3.9. 337L ve 295L Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Gösterilmesi

337L av ve 295L avcı proteinleri arasındaki etkileşimi göstermek için pull down deneyi sonrasında Western Blot analizi gerçekleştirildi. Örneklerden biri için, 337L av ve 295L avcı proteinlerinin bulunduğu hücre lizatları deney tüpünde karıştırıldı. Diğer örnek ise 337L av ve 295L avcı genlerini taşıyan virüslerin aynı ortamda enfeksiyonları ile elde edildi. Magne-His protein saflaştırma kiti ile örneklerden proteinler elde edildi. Membran sadece HA-taq'a özgü antikorlar ile muamele edildi. 337L-295L karışım (*In vitro*) ve 337L-295L (*In vivo*) örnekleri protein interaksiyonları gösterdi ve 337L av proteinine ait 46 kDa boyutunda bantlar görüldü. Negatif kontrol olarak ise Magne-His saflaştırma kiti ile saflaştırılmış 295L ve 337L örneklerinde ise hiçbir bant görülmedi (Şekil 30).



Şekil 29. 337L-295L protein etkileşiminin Western Blot ile gösterimi

4. TARTIŞMA

CIV, dünyada pirinç üretiminde üst sıralarda yer alan Japonya’da ilk defa 1966 yılında bir pirinç zararlısı olan *Chilo suppressalis*’den izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu, 1966). Xeros tarafından 1954 yılında yayımlanan *Tipula paludosa* larvasında ikinci bir virüs hastalığı başlıklı makalede ilk defa belirtilen ilk iridovirüsle birlikte Iridoviridae familyası ortaya çıkmıştır (Xeros, 1954). Bu familyaya ait olan CIV’yi konu alan birçok çalışma yapılmıştır. Willis, 1990 yılında primer yürüme teknolojisi ile CIV genomunun 212,482 bp’den oluştuğunu belirtmiştir. LCDV-1 ile 1997 yılında yapılan tam DNA genom analizindeki karşılaştırmasındaki eksikliklerinden dolayı, Darai ve ark., 2001 yılında CIV için tam genom analizi yapmışlardır. (Tidona ve Darai, 1997). Jacob ve ark. (2001)’lerinin yaptığı çalışmada CIV genomunda 468 potansiyel ORF bulunmuştur.

Yapılan literatür araştırmalarına göre, CIV’yi ve sahip olduğu ORF’leri konu alan böcek hücre kültürü çalışmaları 2000 yılı öncesinde çok azdır fakat, 2001 yılından sonra yayımlanan çalışmalarda tam genom analizlerinin yanı sıra daha seçici konulara odaklanılmıştır. Dizman ve arkadaşlarının 2012 yılında yayımlanan çalışmasında, CIV’ye ait en erken promotörün transkriptomik analizi gerçekleştirildi (Dizman ve ark, 2012). İnce ve ark.’larının 2010 yılında yaptığı çalışma ise CIV’nin proteomik analizi konu almıştır.

CIV ve CIV’den elde edilen rekombinat virüsler ile yapılan böcek hücre kültürü çalışmaları için literatür araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada, Darai ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı makale de yer alan 337L ve 295L genleri ile çalışılmıştır. Bu genler viral enfeksiyon başlangıcında ve viral genomun hücre içindeki iletiminde önemlidir. Virüs, genlerden 337L’ye ait olan ORF tarafından üretilen glikoprotein zincirleri ile konak hücrelerini seçici olarak tanıyabilmektedir. 295L ORF tarafından üretilen çift taraflı nükleer lokalizasyon sinyali de viral genomun nükleusa ulaşmasında etkilidir.

Çalışmada kullanılan genler, *Galleria mellonella* (Bal mumu güvesi) larvalarında yapılan enfeksiyon sonucu izole edilen virüslerden PCR ile çoğaltılmışlardır. Larvalardan elde edilen virüslerin çalışmada kullanılmasının sebebi kolay ve fazla şekilde virüs konsantrasyonu elde edilmesidir. Ayrıca, PCR yapılırken yüksek konsantrasyonla izole edilen virüsün kullanılmasıdır (Devauchelle, 1985).

Elde edilen genlerden 337L geni Darai ve ark. (2001)'lerinin belirttiği üzere 412 amino asitten oluşmaktadır ve glikoprotein hormonu beta zincir sinyalini ifade etmektedir ve aynı çalışmada belirtildiği gibi bu genin ürününün, LCDV'ye ait olan 160L ORF'sinin kodladığı proteine homolog olduğu gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer gen olan 295L geni, 1343 amino asitten oluşmaktadır ve çift taraflı nükleer lokalizasyon sinyalini ifade etmektedir. Darai ve arkadaşlarının belirttiğine göre herhangi bir homolog proteini bulunmamıştır (Darai ve ark, 2001). İnce ve arkadaşları tarafından yapılan CIV'nin proteomiks çalışmasında ise, 337L farklı olarak poksviruse ait bilinmeyen bir proteine benzetilirken, 295L ise çift yönlü nükleer lokalizasyon sinyali olarak gösterilmiştir (Ince ve ark, 2010).

İnce ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada CIV'ye ait olan ORF'ler Chlorirido-virus, Ranavirus, Lymphocystivirus, Megalocytivirus ve Ascoviridae grup ve familyaları ile homolog olan ORF'ler karşılaştırılmıştır. Çalışmada, 337L geni IIV3'te 47R'ye, FV3'te 2L'ye, LCDV-C'de 38R'ye RBIV'de 85L'ye ve Ascoviridae'de 129L ve 54R ORF'lerine homolog oldukları belirtilmiştir. Aynı çalışmada 295L geninin ise, IIV3'te 16R'ye, FV3'te 41R'ye, LCDV-C'de 234R'ye, RBIV'de 72L'ye ve Ascoviridae'de 144R, 43R ve 84L ORF'lerine homolog oldukları belirtilmiştir.

Çalışmanın asıl konusunu oluşturan protein-protein etkileşimi pull down deneyi ile gerçekleştirildi. Literatür araştırmalarına göre protein etkileşimlerinin belirlendiği çalışmalar oldukça fazla olup genellikle protein-protein etkileşim ağını ortaya çıkartmak amacı güden projelerdir.

Deng ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı böyle bir çalışmada *Helicoverpa armigera* nükleopolihedra virüse ait gömülü virüslerle etkileşimde olan ha44 ve ha100 adında iki tane protein bulunmuştur (Deng, 2007). Bundan esinlenerek yapılan diğer araştırmada ise Peng ve arkadaşları bu iki proteine ait kendi antikorlarını üretmişler ha44'ün üst üste katlanmak sureti ile kendi kendine etkileşime girdiğini, ha100'ün ise maya 2 hibrit ile etkileşimine bakılan başka bir protein olan VP80 ile etkileşime girdiği pull-down deneyi ile ispat etmişlerdir (Peng, 2010).

Post translasyonel modifikasyonların çalışıldığı başka bir araştırmada, pull down deneyinin tasarlanması sırasında bu tez çalışmasında yapıldığı gibi antikor-antijen desteğinin aksine enzim substrat ilişkisine özel olarak üretilen avidin bağlı lizin 4 ve lizin 9 ile metillenmiş olan peptidler kullanılmıştır (Wysocka, 2006).

Jia ve ark.'larının 2013 yılında yaptığı çalışma ise hem pull down analizi hem de immünopresipitasyon yapılması bakımından yapılan tez çalışmasına oldukça benzerlik göstermektedir. Iridoviridae familyasında bulunan enfektif dalak ve karaciğer nekroz virüsü (ISKNV), Asya ülkerinde özellikle mandalina balığında (*Siniperca chuatsi*) çok ciddi zararlar vermektedir. Jia ve ark.'ları mandaline balığındaki kaveolin 1 proteini (mCav-1) ile ISKNV majör kapsid proteinleri (MCP) arasındaki etkileşimleri belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde yapılan pull down analizinde MCP ve mCav-1 proteinleri arasındaki etkileşimi belirlemeden önce farklı olarak mCav-1 örneğine anti-Flag antikoru ile pull down analizi için kullanılan antikor-antijen çalışması için ligandlar eklenmiştir. Sonraki aşamada, 4 °C'de inkübe edilmiştir ve western blot analizi için SDS-PAGE yapılmıştır. Membran tavşan anti-Myc ve fare anti-V5 antikoru ile muamele edilmiştir. Jia ve ark.'ları, mCav-1 bağlı olan ligandlarla etkileşim veren antikorlar sayesinde MCP-mCav-1 protein kompleksini belirlemişlerdir.

RNA polimeraz alt üniteleri ile yapılan başka bir çalışmada ise insan RNA polimeraz II (Hrbp) alt ünitesi bakülovirüs ekspresyon sistemine tez çalışmasında yapıldığı gibi klonlanmıştır. Sf9 böcek hücrelerinde yapılan enfeksiyon (TNM-FH besiyerisi) ile proteinler üretilmiştir. Pull down analizi antikorların çok küçük alt üniteleri kararsız kılmasından dolayı GST bağımlı şekilde gerçekleştirilmiştir (Acker, 1997).

Tez kapsamında *Chilo Iridescent Virus*'e ait olan 337L ve 295L adlı ve viral enfeksiyon aşamaları sırasında virüsün konak hücreye bağlanmasını, viral genomun CIV'nin replikasyon döngüsüne bağlı olarak, replikasyonun işleminin nükleusta başlayıp sitoplazmada sonlanmasından ötürü bu viral genomu çift taraflı taşınmasında görev alan bu iki gen ürününün aralarındaki protein etkileşimleri çalışılmıştır.

Hazırlanan örnekler; *In vitro*, *In vivo*, 337L ve 295L örnekleri yapılan çalışmalarda anlatıldığı şekilde hazırlandı ve tüm örneklerden Magne-his protein saflaştırma kiti ile protein saflaştırması yapıldı. Amacımız his-taqa afinitesi olan bir kit kullanılarak saflaştırma yapmaktır. 337L genine ait protein ha-taqa sahip olduğu için protein saflaştırılmadı ve çalışmada negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca 295L genine ait protein his-taqa sahip olduğu için protein saflaştırıldı fakat, western blot analizi ha-taqa afinitesine sahip antikorlar ile gerçekleştirildi ve membran üzerinde 337L proteininde olduğu gibi bant görülmedi ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Etkileşimlerin bakılması amacı ile hazırlanan iki örnekte ise, his-taqa afinitesine sahip kitle örneklerdeki 295L proteini saflaştırıldı ve devamında western blot analizleri ha-taqa afinitesine sahip antikorlar ile gerçekleştirildi ve sonuç olarak 337L proteinine ait 46 kDa'luk bantlar görüldü.

Bu çalışmada yapılan SDS-PAGE ve Western Blot analizleri sonucunda pull down deneyi olarak hazırlanan deney tüplerinden elde edilmiş örneklerde 337L proteinin varlığı kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, CIV'ye ait 337L ve 295L genlerinin ifadesi ile oluşan proteinlerin aralarında bir etkileşime sahip olması sonucu birbirlerine bağlanıp saflaştırıldılar. Yapılacak başka çalışmalar ile bu iki proteinin ortamdaki varlığı korunarak veya yapay olarak ortama vermek sureti ile arttırılır ise, viral enfeksiyon sonrasında hücrelerin tutunmasını kolaylaştırılmaktadır ve viral genomun verimli şekilde replike olması sağlanmaktadır. Bu şekilde, konak hücreleri aynı zamanda daha fazla virionun enfekte etmesi, enfektif karmaşık yapılar oluşturularak sağlanabilir.

5. SONUÇLAR

- 1) Bu tez çalışması sonucunda, CIV'ye ait olan 337L ve 295L genlerinin ifadesi olan proteinler Bac-to-Bac ekspresyon sistemi kullanılarak üretilmiştir.
 - a) Çalışılan genlerden 337L PCR ile çoğaltılmıştır, 295L geni ise Pgbk-T7 plazmidinden elde edilmiştir.
 - b) Bu genlere ait bakmidler üretilmiştir ve Sf9 hücrelerinde enfeksiyon ile genleri taşıyan virüsler üretilmiştir.
 - c) Proteinler için yapılan Bradford analizi sonucu 337L protein konsantrasyonu 9.4 µg/µl ve 295L protein konsantrasyonu 6.7 µg/µl olarak belirlendi.
- 2) 337L ve 295L ye ait olan hücre izatlarından yapılan SDS-PAGE ve Western Blot analizleri yapıldı. 337L proteini 46 kDa büyüklüğünde tespit edildi. 295L proteini 95 kDa büyüklüğünde ekspresyondan kaynaklı olarak az yoğunlukta tespit edildi.
- 3) Pull-down deneyi için 337L, 295L ve 337L-295L virüs karışımı ile Sf9 hücrelerinde enfeksiyon yapıldı.
 - a) Her iki virüs ile enfekte edilen hücre lizatlarından Magne-His protein saflaştırma kiti ile proteinler saflaştırıldı ve Western Blot analizi sonucunda 337L-295L proteinine ait örnek 46 kDa boyutunda görüntülendi
 - b) 337L ve 295L proteinlerini ihtiva eden lizatlar karıştırıldı; Magne-His protein saflaştırma kiti ile protein saflaştırıldı ve Western Blot analizi sonucunda 337L-295L karışım proteini 46 kDa boyutunda görüntülendi.
- 4) Tasarlanan deney sonucunda, her iki örnekte de 337L ve 295L genlerine ait proteinlerin birbirleri arasında etkileşim olduğu pull-down deneyi ile kanıtlanmıştır.
 - a) SDS-PAGE ve Western Blot analizleri sonucunda 295L proteinine bağlı His kurukları yardımıyla saflaştırılan 337L-295L protein ikilisi, 337L geninin Ha kuyruğuna bağlanan HA-antikorları sayesinde tespit edilen 46 kDa'lık bantlar ile membran üzerinde gösterildi.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada CIV'ye ait olan 337L ve 295L genlerinin Sf9 hücre kültüründe ifadesi ve ökaryotik sistemde ekspreslenen 337L ve 295L proteinleri arasındaki etkileşimler çalışıldı. Çalışma sonuçlarından hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

1. 337L ve 295L genlerinin klonlandığı pFastBac-HTB vektörü yerine gfp içeren bir vektör kullanılarak enfeksiyonun varlığı daha kolay ispat edilebilir.
2. 295L ile oluşturulan bakmidlerle yapılan enfeksiyonlarda belirlenen düşük protein ekspresyonunun nedenleri araştırılabilir.
3. CIV'ye ait ORF'lerden elde edilecek proteinler ile üretilen 337L ve 295L proteinleri arasındaki etkileşimler belirlenerek protein-protein etkileşim ağı oluşturulabilir.

7. KAYNAKLAR

- Acker, J., De Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Keding, C., and Vigneron, M., 1997. Interactions between the Human RNA Polymerase II Subunits, J. Biol. Chem., 272, 16815-16821.
- Alves, CAF., Ikeda, M. and Kobayashi, M., 2002. Identification and characterization of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus homologous repeated regions. Virus Genes, 25, 281-290.
- Anslyn, Eric V., Dougherty, Dennis A., 2004. Modern Physical Organic Chemistry. Sausalito, CA: University Science, ISBN 978-1-891389-31-3.
- Bao, YY., Chen, LB., Wu, WJ., Zhao, D., Wang, Y., Qin, X. and Zhang, CX., 2013. Direct interactions between bidensovirus BmDNV-Z proteins and midgut proteins from the virus target *Bombyx mori*. FEBS J. 280,3,939-49. doi: 10.1111/febs.12088. Epub 2013 Jan 11.
- Barray. S., Devauchelle, G., 1987. Protein synthesis in cells infected by *Chilo* iridescent virus: evidence for temporal control of three classes of induced polypeptides. Virology, 138, 253-261.
- Beljelarskaya, SN., 2002. A baculovirus expression system for insect cells. Mol Biol, 36, 281-292.
- Bilimoria, SL., 1991. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. Edouard K. ed. Viruses of Invertebrates. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 1-72.
- Boulikas, T., 1994 Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. J. Cell Biochem. 55, 32–58
- Cann, A.J., 1993. Principles of Molecular Virology, Academic Press, 110-115.
- Colson, P., 2013. “Megavirales”, A Proposed New Order for Eukaryotic Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses, Archives of Virology
- Condreay, J.P., Witherspoon, S.M., Clay, W.C. and Kost, T.A., 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 127–132.
- Condreay, J.P., Kost, T.A., 2007. Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. Curr. Drug Targets 8, 1126–1131.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Becnel, J. J., Moser, B. A., Kutish, G. F. and Rock, D. L., 2006. Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus). J Virol 80,8439–8449.

- Delius, H., Darai, G. and Flusgel, R. M., 1984. DNA analysis of Insect iridescent virus 6: Evidence for circular permutation and terminal redundancy J Virol, 49, 609-614.
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R., Gürel, N. ve Demirbağ, Z., 2008. Baculovirus'lerin Biyolojisi ve Replikasyonu, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32, 3, 295-303
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., Kılıç, AO., Beldüz, AO., 2000. Expression of *cryIVA* and *cryIVD* genes of *Bacillus thuringiensis* in baculovirus expression system. Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC WPRS Bull, 23, 267-274.
- Demirbağ, Z., Beldüz, AO., Demir, İ., 1998. Baculovirus'ün ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması. Türk J Biol, 22, 249-262.
- Deng, F., Wang, R., Fang, M., Jiang, Y., Xu, X., Wang, H., Chen, X., Arif, B. M., Guo, L. and other authors., 2007. Proteomic analysis of helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100. J Virol 81, 9377-9385
- Devauchelle, G., Attias, J., Monnier, C., Barray, S., Cerutti, M., Guerillon, J. and Orange-Balange, N., 1985. *Chilo* Iridescent Virus, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 116, 37-48.
- Dizman, YA., Demirbag, Z., Ince, IA., Nalcacioglu, R., 2012. Transcriptomic analysis of *Chilo* iridescent virus immediate early promoter. Virus Res. Aug;167,2,353-7.
- Evans, H., Shapiro, M., 1997. Viruses. Lacey, L.A. (ed). Manuel of Techniques in Insect Pathology. S. 19-53. Academic Press, San Diego.
- Federice, BA., 1999. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. Methods in Biotech, 5, 301-320.
- Fischer, M., Schnitzler, P. and Delius. H., 1990. Molecular biology of insect iridescent virus, In: Molecular Biology of Iridoviruses, Kluwer, Boston/Dordrecht/London, pp.47-80.
- Fukaya, M., Nasu, S., 1966. A *Chilo* Iridescent Virus (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: *Pyralidae*), Appl. Entomol. Zool., 1, 69-72.
- Fukuda, T., 1971. Per os transmission of *Chilo* iridescent virus to mosquitoes. J Invert Pathol, 18, 152-153.
- Ghosh, S., Parvez, MK., Banerjee, K., Sarin, SK. and Hasnain, SE., 2002. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. Mol Ther, 6, 5-11.
- Goorha, R., Murti, K.G., 1982. The Genome of Frog Virus 3, An Animal DNA Virus is Circularly Permuted and Terminally Redundant, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 248-252.

- Goorha, R.D., Willis, B. and Granoff, A., 1977. Macromolecular Synthesis in Cells Infected by Frog Virus 3. VI: Frog Virus 3 Replication is Dependent on the Cell Nucleus, J. Virol., 21, 802-805
- Goorha, R., Murti, G., Granoff, A. and Tirey, R., 1978. Macromolecular Synthesis in Cells Infected by Frog Virus 3. VIII: The Nucleus is a Site for Frog Virus 3 DNA and RNA Synthesis, Virology, 49, 86-91.
- Goorha, R., 1979. Frog Virus 3 Requires RNA Polymerase for Its Replication, J. Virol., 37, 496-499.
- Grace, T.D.C., 1962. Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissue Grown in Vitro, Nature, 195, 788-789.
- Guo, D., Rajamäki, M.-L., Saarma, M. and Valkonen, J.P., 2001. Towards a protein inter-action map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. J. Gen. Virol. 82, 935–939.
- Hama H., 1968. On the cross inoculation of *Chilo* iridescent virus (CIV). Japan J Appl Entomol Zool, 12,34-39.
- Harper, D.M., 2009. Currently approved prophylactic HPV vaccines. Expert Rev. Vaccines 8, 1663–1679.
- Hayakawa, T., Rohrmann, GF. and Hashimoto, Y., 2000. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculovirus. Virology, 278, 1-12.
- Helms, Volkhard., 2008. "Fluorescence Resonance Energy Transfer". Principles of Computational Cell Biology. Weinheim: Wiley-VCH. p. 202. ISBN 978,3,527,31555,0.
- Henderson, C. W., Johnson, C. L., Lodhi, S. A., 2001. Replication of *Chilo* iridescent virus in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay. Arch Virol, 146, 767-775.
- Hitchman, R.B., Murguía-Meca, F., Danquah, J. and King, L.A., 2011. Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation, J. Invertebr. Pathol. 107, S49–S58.
- Hu, Y.C., 2008. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. Curr. Gene Ther. 8, 54–65.
- Hong, Y., Levay, K., Murphy, J., Klein, P., Shaw, J. ve Hunt, A., 1995. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. Virology 214,159–166.
- Ince, IA., Boeren, SA., van Oers, MM., Vervoort, JJ. and Vlak, JM., 2010. Proteomic analysis of *Chilo* iridescent virus Virology. Sep 15;405(1):253-8. doi: 10.1016/j.virol.2010.05.038. Epub 2010 Jul 2.

- Jakob, N.J., Muller K, Bahr, U. and Darai, G., 2001. Analysis of the First Complete DNA Sequence of an Invertebrate Iridovirus: Coding Strategy of the Genome of *Chilo* Iridescent Virus, Virology, 286, 1, 182-96.
- Jones, S.; Thornton, J.M. 1996. "Principles of protein-protein interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 1, 13–20. PMID 8552589
- Kaikkonen, M.U., Ylä-Herttuala, S. and Airene, K.J., 2011. How to avoid complement attack in baculovirus-mediated gene delivery. J. Invertebr. Pathol. 107, S71–S79.
- Kang, S.-H., Lim, W.-S., Hwang, S.-H., Park, J.-W., Choi, H.-S. and Kim, K.-H., 2006. Importance of the C-terminal domain of Soybean mosaic virus coat protein for subunit interactions. J. Gen. Virol. 87, 225–229.
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R. and Sims, R.B., 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N. Engl. J. Med. 363, 411–422.
- Kelly, DC., 1982. Baculovirus replication. J Gen Virol, 63, 1-13.
- Kitts, P.A., Ayres, M.D. and Possee, R.D., 1990. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. Nucleic Acids Res. 18, 5667–5672.
- Kitts, P.A., Possee, R.D., 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. BioTechniques 14, 810–817.
- Kost, TA., Condreay, JP., 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. Trends Biotechnol, 20,173-180.
- Kun-Tong, Jia., Yan-Yan, Wu., Zhao-Yu, Liu., Shu, Mi., Yi-Wen, Zheng., Jian, He., Shao-Ping, Weng., Shengwen, Calvin Li., Jian-Guo, He. and Chang-Jun, Guo., Mandarin Fish Caveolin 1 Interaction with Major Capsid Protein of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus and Its Role in Early Stages of Infection J. Virol. 2013, 87,6,3027. DOI: 10.1128/JVI.00552-12.
- Long, G., 2007. Structure-function relationship of the baculovirus envelope fusion protein F. Doktora tezi, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.
- Luckow, VA., 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. Prokop A. Bajpai RK. Ho CS. eds. Recombinant DNA Technology and Applications. New York: McGraw-Hill, Inc. p. 97-152.
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F. ve Olins, P.O., 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J. Virol. 67, 4566–4579.

- Lisowska, E., 2002. The role of glycosylation in protein antigenic properties. Cell Mol Life Sci; 59, 445-455.
- Maniatis, T., Fischer, JA1., Giniger, E. and Ptashne M. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. Nature. 1988 Apr 28;332,6167,853-6.
- Martens, J.W., van Oers, M.M., van de Bilt, B.D., Oudshoorn, P. ve Vlak, J.M., 1995. Development of a baculovirus vector that facilitates the generation of p10- based recombinants. J. Virol. Meth. 52, 15–19.
- Mclaughlin, R. E., Scott, H. A. and Bell, M. R., 1972. Infection of the Boll Weevil by *Chilo iridescent virus*. J Invert Pathol, 19, 285-290.
- Mikhailov, VS., 2003. Replication of the baculoviruses genome. Mol Biol, 37, 250-259.
- Mitsuhashi, J., 1967. Infection of leafhopper and its tissues cultivated in vitro with *Chilo iridescent virus*. J Invert Pathol, 9, 432-434.
- Montgomery, R., Conway, TW., Spector, AA. and Chappell, D., 1996. Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım. ALTAN, N. (Çeviren). 6. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Nalçacıoğlu, R., Ince, IA. and Vlak, J. M., 2007. The *Chilo iridescent virus* DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif. J Gen Virol, 88, 9, 2488- 2494.
- Nalçacıoğlu, R., 2003. *Chilo İridescent Virüs*'ün *Bombyx mori* Hücre Kültüründe Replikasyonu ve Dnapol ile Mcp Genlerinin Transkripsiyonal Analizi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Neil, A., Williamson, B., Heyden, R. J., Campbell. 2006. Biology: Exploring Life. Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall. ISBN 0-13-250882-6. Retrieved 2012-02-05.
- Ohba, M. 1975. Studies on the parthogenesis of *Chilo iridescent virus* 3. Multiplication of CIV in the silkworm *Bombyx mori* L. and field insects. Sci Bull Fac Agr Kyushu Univ, 30, 71-81.
- Ohba, M., Aizawa, K., 1979. Multiplication of *Chilo iridescent virus* in noninsect arthropods. J Invert Pathol, 33, 278-283.
- Ohkawa, T., Volkman, L.E. and Welch, M.D., 2010. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. J. Cell Biol. 190, 187–195.
- O'Reilly, DR., Miller, L.K. and Luckow, V.A., 1992. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Peng, K., Wu, M., Deng, F., Song, J., Dong, C., Wang, H. and Hu, Z., 2010. Identification of protein-protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. J Gen Virol. Mar; 91Pt 3,659-70. doi: 10.1099/vir.0.017103-0. Epub 2009 Nov 11.

- Possee, R.D., Hitchman, R.B., Richards, K.S., Mann, S.G., Siaterli, E., Nixon, C.P., Irving, C.H., Assenberg, R., Alderton, D., Owens, R.J. and King, L.A., 2008. Generation of baculovirus vectors for the high throughput production of proteins in insect cells. Biotechnol. Bioeng. 101, 1115–1122.
- Primrose, S.B. and Twyman, R.M., 2006 Principles of gene manipulation and genomics 7th, pp 141-154, Blackwell Pub, Oxford. (site-directed mutagenesis)
- Rivera-Gonzalez, G.C., Swift, S.L., Dussupt, V., Georgopoulos, L.J. and Maitland, N.J., 2011. Baculoviruses as gene therapy vectors for human prostate cancer. J. Invertebr. Pathol. 107, S59–S70.
- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A. and Dwek, R.A., 2001. Glycosylation and the immune system. Science; 291, 2370-2376.
- Sharrocks, A.D., Yang, S.-H. and Galanis, A., 2000. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. Trends in Bioch. Sci. 25, 448-453.
- Slack, J., Arif, B.M., 2007. The baculovirus occlusion-derived virus: Virion structure and function. Adv Virus Res, 69, 99-165.
- Smith, G.E., Summers, M.D. and Fraser, M.J., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3, 2156–2165.
- Summers, M.D., 2006. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector system and pesticides. Adv Virus Res, 68, 3-73.
- Tajbakhsh, S., Kiss, G., Lee, P. E., and Seligy, V. L., 1990b. Semipermissive replication of Tipula iridescent virus in Aedes albopictus C6/36 cells, Virology 174-264.
- Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J.A., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S., Vlak, J.M., 2005. Baculoviridae. Fauquet CM. Mayo MA. Maniloff J. Desselberger U. Ball LA. eds. *Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press. p. 177-185.
- Tidona, C.A., Darai, G., 1997. The Complete DNA Sequence of Lymphocystis Disease Virus, Virology, 230, 207–216.
- URL-1: <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html> 28 Nisan 2014
- URL-2: http://www.trevorwilliams.info/images/Galleria_mellonella.jpg 16 Mart 2014
- URL-3: <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/Iridoviruses.html> 20 Şubat 2014
- URL-4: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/581.html 18 Mart 2014

- URL-5:<http://biomocnews.blogspot.com.tr/2012/10/daily-newsletter-october-29-2012-ground.html> 18 Aralık 2013
- URL-6: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/13.html 23 Ocak 2014
- Usami, A., Suzuki, T., Nagaya, H., Kaki, H. ve Ishiyama, S., 2010. Silkworm as a host of baculovirus expression. Curr. Pharm. Biotechnol. 11, 246–250.
- Van Oers, M.M., Flipsen, J.T.M., Reusken, C.B.E. and Vlak, J.M., 1994. Specificity of baculovirus p10 functions. Virology, 200, 513-523.
- Van Oers, M.M., 2006. Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. Adv. Virus Res. 68, 193-253.
- Vlak, J.M., Schouten, A., Usmany, M., Belsham, G.J., Klinge-Roode, E.C., Maule, A.J., Van Lent, J.W. and Zuidema, D., 1990. Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. Virology 179, 312–320.
- Volkman, L.E., Keddie, B.A., 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. Seminars in Virology, UC Berkeley. p. 249-256.
- Walsh, G., Jefferis, R., 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. Nat Biotechnol; 24,10, 1241-1252.
- Wang, Q., Liang, C., Song, J. and Chen, X., 2007. HA2 from the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus: a WASP-related protein that activates Arp2/3-induced actin filament formation. Virus Res. 127, 81–87.
- Westermarck, J., Ivaska, J., Corthals, G.L., 2013. Identification of protein interactions involved in cellular signaling. Molecular & cellular proteomics : MCP 12 7, 1752–63.
- Williams, T., 1998. Invertebrate Iridescent Viruses, In: *The Insect Viruses*, Miller, L. and Ball, A. (Eds.), Plenum Press NY, 31-68.
- Williams, T., 1996. The Iridoviruses, Adv. Virus Res., 46, 345-412.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. and Chincar, V. G., 2005. A decade of advances in iridovirus research. Adv Virus Res 65, 173–248.
- Willis, D.B., 1990. Taxonomy of Iridoviruses, in: Darai, G (Ed.), *Molecular Biology of Iridescent viruses*. Kluwer, Boston, pp. 1–13.
- Willis, D. B., Goorha, R., Granoff, A., 1984. DNA methyl transferase induced by frogvirus 3. J Virol, 49, 86-91.
- Wysocka, J., 2006. Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. Methods. Dec;40,4,339-43.

- Xu, A., Zhao, Z., Chen, W., Zhang, H., Liao, Q., Chen, J., Carr, J.P. and Du, Z., 2013. Self interaction of the Cucumber mosaic virus 2b protein plays a vital role in the suppression of RNA silencing and the induction of viral symptoms. Mol. Plant Pathol. 14, 803–812.
- Yambao, M.L.M., Masuta, C., Nakahara, K. and Uyeda, I., 2003. The central and C-terminal domains of VPg of Clover yellow vein virus are important for VPg–HCPro and VPg–VPg interactions. J. Gen. Virol. 84, 2861–2869.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., and Herrler, G., 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression system for foreign genes. J Biotech. 127, 335-347.
- Zheng, J., 2006. Spectroscopy-Based Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis. In Stockand, James D.; Shapiro, Mark S. *Ion Channels: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, Volume 337.* Totowa, NJ: Humana Press. pp. 65–77. doi:10.1385/1-59745-095-2:65. ISBN 978-1-59745-095-9.
- Zhang, XL., 2006. Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases. Curr Med Chem; 13,10, 1141-1147.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Gölcük/Kocaeli’de doğdu. Eğitim ve öğretim hayatına Samsun’da Necatibey İlkokulu’nda başladı. İlköğretimin son zamanlarını ve ortaöğretimini Ankara/OR-AN’da bulunan Rauf Orbay İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Lise öğretimini Ankara/Birlik Mahallesi’nde bulunan Reha Alemdaroğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde tamamladı. 2006-2007 eğitim-öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2011 yılında bölüm birinciliği ile lisans eğitimini bitirdi. 2011-2012 eğitim-öğretim yılında yüksek lisans eğitimine Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda başladı. Yüksek lisans eğitiminin ikinci senesinde Erasmus öğrenci değişim programı çerçevesinde Universitat für Boden Kultur ‘de bir dönem boyunca çalışmalarını sürdürdü. İngilizce seviyesi B1 seviyesindedir. Ayrıca, orta seviyede Almanca bilmektedir.