

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO IRIDESCENT VİRÜS (CIV)'E AİT MATRİKS METALLOPROTEİNAZ
GENLERİNİN (136R & 165R) BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ
VE ÜRÜNLERİNİN AKTİVİTE TAYİNİ***

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Aydın YEŞİLYURT

**MAYIS 2014
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO IRIDESCENT VİRÜS (CIV)'E AİT MATRİKS METALLOPROTEİNAZ
GENLERİNİN (136R & 165R) BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ
VE ÜRÜNLERİNİN AKTİVİTE TAYİNİ***

Biyolog Aydın YEŞİLYURT

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06.05.2014

Tezin Savunma Tarihi : 27.05.2014

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Aydın YEŞİLYURT tarafından hazırlanan

***CHILO IRIDESCENT VİRÜS (CIV)'E AİT MATRİKS METALLOPROTEİNAZ
GENLERİNİN (136R & 165R) BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ
VE ÜRÜNLERİNİN AKTİVİTE TAYİNİ***

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. Remziye NALÇACIOĞLU

Üye :Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Chilo Iridescent Virüs (CIV)*’e Ait *Matriks Metalloproteinaz* Genlerinin (136R & 165R) Bakülovirüs Vektör Sisteminde İfadesi ve Ürünlerinin Aktivite Tayini” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benden esirgemeyen ve tüm imkânları sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve tez jüri üyeliğini kabul ederek tezimi okuyan, değerlendiren ve aynı zamanda çalışmalarımda bana yardımcı olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Emine ÖZŞAHİN’e, tezimdeki yardımlarından dolayı başta Mehtap DANIŞMAZOĞLU olmak üzere diğer mikrobiyoloji laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma ve çalışmalarımda faydalandığım Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman inanan ve desteğini esirgememiş olan babama, varlıklarıyla bana her zaman güç veren anneme ve ailemin tüm diğer bireyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK’a (Proje no: 212T218) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu’na (Proje no: 9585) teşekkür ediyorum.

Aydın YEŞİLYURT

Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chilo Iridescent Virüs (CIV)*’e Ait *Matriks Metalloproteinaz* Genlerinin (*136R & 165R*) Bakülovirüs Vektör Sisteminde İfadesi ve Ürünlerinin Aktivite Tayini” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri 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. 06/05/2014

Aydın YEŞİLYURT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. İridovirüsler	2
1.3. <i>Iridovirüs</i> Cinsi	3
1.3.1. <i>Chilo Iridescent Virüs</i> (CIV)	7
1.4. Matriks Metalloproteinazlar	8
1.4.1. Bakülovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi	12
1.4.2. Çalışmanın Amacı	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini.....	14
2.2. Viral Genomik DNA İzolasyonu	14
2.3. CIV <i>136R</i> ve <i>165R</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizi	15
2.4. Genlere Uygun Primerlerin Hazırlanması	15
2.5. Genlerin Viral Genomik DNA'dan PCR ile Çoğaltılması ve Klonlama Vektörüne (pGEM-T Easy) Klonlanması.....	15
2.6. Elektrokompentent <i>E. coli</i> DH10 β Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon	16
2.7. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Analizi	17
2.8. Genlerin pFastBacHT Ara Transfer Vektörlerine Klonlanması	18
2.9. Genlerin Bac-to-Bac® Bakülovirüs Ekspresyon Sistemine Aktarılması	19
2.9.1. <i>E. coli</i> DH10Bac Kompetent Hücrelerinin Hazırlanışı	19
2.9.2. Rekombinant pFastBacHT Vektörlerinin <i>E. coli</i> DH10Bac Kompetent Hücrelerine Transformasyonu ve Transpozisyon	20
2.9.3. Rekombinant Bakmid DNA'ların İzolasyonu ve PCR İle Doğrulanması	21
2.9.4. Böcek Hücre Suşunun Stoktan Canlandırılması.....	21

2.9.5. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması	22
2.10. Proteinlerin Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Saflaştırılması.....	23
2.11. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	24
2.12. SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE) ve Western-Blot Analizi	24
2.13. Protein Aktivitesinin Araştırılması	26
2.13.1. Enzimlerin Çalıştığı pH ve Sıcaklıkların Belirlenmesi	26
2.13.2. Enzimlerin Substratlar Aracılığıyla Aktivite Tayini.....	26
3. BULGULAR.....	28
3.1. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini.....	28
3.2. Viral DNA İzolasyonu	28
3.3. <i>136R</i> ve <i>165R</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizi	28
3.4. Genlerin pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	30
3.5. Genlerin pFastBacHT Ara Transfer Vektörlerine Klonlanması	31
3.6. Ara Transfer Vektörlerinin Bakteriyal Hücreye Aktarılması ve Transpozisyon.....	32
3.7. Rekombinant Bakmid DNA'larının Böcek Hücre Kültürüne Transfeksiyonu.....	35
3.8. Protein Saflaştırılması ve Western-blot Analizi	35
3.9. Proteaz Aktivite Analizi	37
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇLAR.....	42
6. ÖNERİLER.....	43
7. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VİRÜS (CIV)'E AIT *MATRİKS METALLOPROTEİNAZ*
GENLERİNİN (*136R* & *165R*) BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ VE
ÜRÜNLERİNİN AKTİVİTE TAYİNİ

Aydın YEŞİLYURT

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

2014, 50 Sayfa

Lepidoptera larvalarının dokularını saran bazal membranlar virüslerin hareketi için fiziksel bir bariyer gibi iş görürler. Bu yüzden tarım zararlısı böceklerin biyolojik kontrolünde potansiyel yaklaşımlardan biri bazal membran proteinlerini parçalayan enzimleri kullanmaktır. Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstraselüler matriksin tüm bileşenlerini parçalayabilecek kapasiteye sahip çinko-bağımlı endopeptidazlardır. *Chilo* iridescent virüs (CIV) genomu, çinko-bağımlı MMP bölgesine sahip protein kodlayan iki gen (*136R* ve *165R*) bölgesi içerir. Bu genler diğer virüslerdeki muhtemel metalloproteinazlarla %40' tan fazla amino asit dizi benzerliği göstermektedir.

Bu çalışmada CIV genomundaki *136R* ve *165R* açık okuma zincirleri PCR ile çoğaltılarak pFastBacHT transfer vektörlerine klonlandılar. Rekombinant transfer vektörleri kullanılarak bu genleri taşıyan bakmidler oluşturuldu. CIV genlerini taşıyan bakmid DNA'ları rekombinant bakülovirüs üretmek amacıyla Sf9 hücrelerine transfekte edildiler. Oluşan bakülovirüsler kullanılarak yüksek seviyede rekombinant protein ekspresyonu gerçekleştirildi. Üretilen proteinlerin varlığı western blot analizi ile teyit edildi. İfade edilen proteinlerin proteaz genel substratları olan Azocoll ve Azo-caseini parçaladıkları gösterildi.

Elde edilen bu sonuçlar, CIV'e ait *136R* ve *165R* genlerinin kodladığı fonksiyonel metalloproteinazların lepidoptera zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılabilme potansiyeline sahip olduklarını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Chilo* iridescent virüs, matriks metalloproteinaz, biyolojik mücadele

Master Thesis

SUMMARY

EXPRESSION OF *CHILO* IRIDESCENT VIRUS (CIV) *MATRIX*
METALLOPROTEINASE GENES (*136R* & *165R*) IN BACULOVIRUS EXPRESSION
VECTOR SYSTEM AND DETERMINATION OF THE ACTIVITIES OF THE
PRODUCTS

Aydın YEŞİLYURT

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Remziye NALCACIOGLU
2014, 50 Pages

Basement membranes that surround the tissues of lepidopterous larvae act as physical barrier to the movement of viruses. Therefore, one of the potential approaches is to use the enzymes that disrupt the basement membrane proteins in biological control of agricultural pest insects. Matrix metalloproteinases (MMP) are zinc-dependent endopeptidases that have the combined capacity to degrade all the components of the extracellular matrix. *Chilo* iridescent virus (CIV) genome contains two genes (*165R* and *136R*) encoding proteins with zinc-dependent MMP domains. These genes contain over 40% amino acid sequence identity to hypothetical metalloproteinases of other viruses.

In this study open reading frames *165R* and *136R* in CIV genome were amplified and cloned into the pFastBacHT transfer vectors, individually. The transfer vectors were used at generating the bacmids carrying these genes. The bacmids DNA's carrying CIV genes were transfected to the Sf9 cells in order to produce the recombinant baculoviruses. The produced baculoviruses were used for high-level expression of recombinant proteins. Expressed proteins were confirmed by western blot analysis. Expressed proteins disrupted the protease substrates Azocoll and Azo-casein.

Obtained results showed that CIV *136R* and *165R* genes encode functional metalloproteinases which have usage potential in biological control of lepidopteran pests.

Key Words: *Chilo* iridescent virus, matrix metalloproteinase, biological control

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İridovirüs ile enfekte <i>G. mellonella</i> larvası.....	4
Şekil 2. İridovirüslerde kapsid simetrisini ve içyapıyı gösteren diyagram	5
Şekil 3. Frog virus 3 (FV 3)' ün hayat döngüsü.....	6
Şekil 4. İnsektisidal proteazların hedef bölgelerini gösteren böcek anatomisi	11
Şekil 5. Bac-to-Bac ekspresyon vektör sistemi.....	23
Şekil 6. CIV genomik DNA'sının jel görüntüsü.....	28
Şekil 7. CIV165R genine ait amino asit sırasının belirlenen korunmuş bölgeleri.	29
Şekil 8. Matriks metalloproteinazların aktif bölgelerinin homolojileri.....	30
Şekil 9. 136R ve 165R genlerinin CIV genomundan PCR ile çoğaltılması.	30
Şekil 10. 136R ve 165R genlerinin pGEM®-T Easy transfer vektöründe doğrulanması. .	31
Şekil 11. Rekombinant pFastBacHT plazmidlerinin restriksiyon endonükleazlarla muamelesi.	32
Şekil 12. 136R genini içeren Bakmid DNA'larının doğrulanması.....	33
Şekil 13. 165R genini içeren Bakmid DNA'larının doğrulanması.....	34
Şekil 14. Bakmid DNA'larının M13Fw & GentaRv primerleriyle PCR görüntüsü	34
Şekil 15. Rekombinant virüslerle yapılan enfeksiyonlar	35
Şekil 16. CIV 136R geninin kodladığı proteinin Western-Blot ile gösterilmesi.....	36
Şekil 17. CIV 165R geninin kodladığı proteinin Western-Blot ile gösterilmesi.....	36
Şekil 18. Azo-casein ile yapılan enzim-aktivite grafiği.	37
Şekil 19. Azocoll ile yapılan enzim-aktivite grafiği.	38

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Iridoviridae familyasına ait cinsler.....	3
Tablo 2. <i>Iridovirus</i> cinsine ait türler	4
Tablo 3. Proteazların sınıflandırılması	9
Tablo 4. CIV <i>136R</i> ve <i>165R</i> genlerine ait primer dizileri	15

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AcNPV	: <i>Autographa californica</i> nükleopolihedrovirüs
ADAMTS	: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif
AGIV	: <i>Anticarsia gemmatalis iridescent virus</i>
ATP	: Adenozin trifosfat
BEVS	: Bakülovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi
Bm	: <i>Bombix mori</i>
Bp	:Baz çifti
BSA	: Bovine (sığır) Serum Albumin
BV	: Budded virus (tomurcuklanan virüs)
CIV	: <i>Chilo iridescent virus</i>
CPV	: Sitoplazmik polihedrovirüs
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
dNTP	:Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
EPV	: Entomopoksvirüs
ESM	: Ekstrasellüler matriks
FBS	: Fetal sığır serumu
FV	: <i>Frog virüs</i>
GV	: Granulovirüs
IIV	:Invertebrate iridescent virus
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosit
ISKNV	: <i>Infectious spleen ve kidney necrosis virus</i>
IV	: İridovirüs
kDa	:Kilo dalton
LB	: Luria Bertani (besiyeri)
LCDV	: <i>Lymphocystis disease virus</i>
LTR	: uzun uç tekrarları
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NCBI	: National Center for Biotechnology Information

NPV	: Nükleopolihedrovirüs
ODV	: Gömülü virüs
ORF	: Açık okuma zinciri
PAGE	:Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIB	: <i>polihedral inklüzyon yapı</i>
PMSF	: fenilmetilsülfonil florid
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
Sf	: <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFM	: Serum-free Medium (serumsuz besiyeri)
TCA	: Trikloroasetik asit
X-gal	:5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tarım ve ormancılık Türkiye ekonomisinde büyük bir yer işgal etmektedir. Maalesef bu iki önemli geçim kaynağımız ciddi tehditler ile karşı karşıya bulunmaktadır. Bu tehditler arasında en önemlilerinden biri de zararlı böceklerdir.

Günümüzde maalesef zararlı böceklerle karşı kullanılan mücadele yöntemlerinin başında kimyasal mücadele gelmektedir. Ne yazık ki bu zararlılara karşı kimyasal mücadele yapılmasının birçok olumsuzlukları bulunmaktadır. 1950’li yıllarda hedeflenen zararlı böcek popülasyonları, artan bir şekilde kimyasal insektisitlere karşı dirençli hale gelmiştir. Üstelik kimyasal insektisitlerin seçici bir özelliği olmadığına farkına varılmıştır. Sonuç olarak zararlı bu insektisitler, hedeflenen zararlı böceğin yanı sıra, doğadaki yararlı böceklerde de yüksek oranda ölüme neden olmuştur. Hatta bazı durumlarda zararlı böceklerin doğal düşmanları, hedef organizmadan daha etkili bir şekilde yok edilmiştir. Bunun yanı sıra kullanılan kimyasalların fazlası toprakta birikirler. Biriken bu kimyasallar, bitkiler tarafından bünyelerine alınırlar ve bu bitkiler de besin zincirinin en sonunda yer alan insanlar tarafından tüketilirler. Dolayısıyla uygulanan kimyasal maddeler dolaylı olarak insan bünyesinde birikime sebep olur ve uzun süre sonra ortaya çıkan birçok hastalığa sebep olurlar. Ayrıca uygulandığı alandan farklı alanlara rüzgâr ve su akıntıları gibi doğal olaylar ile ulaşarak bu yeni alanlarda da toksik etki göstermeleri, kimyasal mücadelenin başlıca yan etkilerindedir. Son 30 yılı aşkın bir süredir, zararlı böceklerin kontrolünde, bahsedilen bu zararları nedeniyle kimyasal insektisit kullanımının yerine alternatif araçlar aranmaya başlanmıştır. Bu alternatif araçlardan biri olan biyolojik mücadele gelecek vaat eden bir alan olarak öne çıkmaktadır.

Biyolojik mücadelede kullanılan ajanlar böcek patojeni mikroorganizmaları (bakteri, virüs, fungus, protozoa) ve onlardan elde edilen bazı insektisidal ürünleri kapsamaktadır. Zararlı böcekleri enfekte eden virüsler biyolojik mücadelede kullanılabilecek potansiyel ajanlar olarak karşımıza çıkarlar. Bu virüsler arasında başta bakülovirüsler olmak üzere ardından entomopoksvirüsler, iridovirüsler, sipovirüsler ve diğer böcekleri enfekte eden virüs grupları sıralanabilir.

Bu viral etmenler hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, doğada ayrıştırılabilmeleri (biodegradable bileşikler) ve kendilerine karşı direnç gelişiminin oldukça yavaş olması bakımından çok avantajlıdırlar. Fakat mevcut olanların düşük tesirli olmaları, yüksek üretim maliyetleri ve özellikle de belirli özgünlüğe sahip olmaları açısından bakıldığında farklı uygulamalar için olan kullanımları kısıtlanmış olur. Ancak rekombinant DNA teknolojisi bunun gibi birçok negatif özelliğin üstesinden gelebilmek için çeşitli imkânlar sağlamaktadır. Böylece çok yönlü ve endüstriyel üretim kapasitesi dikkate alındığında bu alanın gelecek vadeden bir araştırma sahası olduğu görülmektedir.

1.2. İridovirüsler

Iridoviridae familyası mensupları iridovirüs ismi ile anılmaktadırlar. Bu familya da omurgasızları ve omurgalıları enfekte eden cinsler bulunmaktadır. Virüslerin sınıflandırılmasını yapan ve uluslararası bir kuruluş olan “Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi” (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından yapılan son açıklamalara göre bugün Iridoviridae familyası altında *Chloriridovirus*, *Iridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* ve *Ranavirus* olmak üzere 5 cins bulunmaktadır (Tablo 1) (Williams, T. ve Ward, V.K., 2010). Omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar *Iridovirus* (tip tür: *Chilo iridescent virus*, IIV-6) ve *Chloriridovirus* (tip tür: *Mosquito iridescent virus*, IIV-3) cinsleri altına dâhil edilmişlerdir. Omurgasız konakların çoğunluğunu böcekler oluşturmaktadır. Şöyle ki; mevcut omurgasız iridovirüslerinin 40 tanesi Diptera, 8 tanesi Coleoptera ve 7 tanesi de Lepidoptera ordolarından izole edilmişlerdir. Bunun yanında böcek olmayan omurgasız konaklar da vardır. Bilinen iridovirüslerden 8 tür, izopodlar ve dafnidlerden izole edilmiştir. Omurgalıları enfekte eden izolatlar da *Lymphocystivirus* (tip tür: *Flounder virüs*), *Megalocytivirus* (tip tür: *Infectious spleen and kidney necrosis virüs*, ISKNV) ve *Ranavirus* (tip tür: *Frog virüs 3*, FV 3) cinsleri altına dâhil edilmişlerdir. İridovirüsler ile ilgili çalışmaların çoğunluğu *Frog virüs 3* üzerinde yapılmıştır.

Tablo 1. Iridoviridae familyasına ait cinsler

Cins	Enfekte ettiği konaklar	Tip türü (kısaltması)
<i>Chloriridovirus</i>	Diptera	<i>Invertebrate iridescent virus 3</i> (IIV-3)
<i>Iridovirus</i>	Böcekler ve karasal izopodlar	<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (IIV-6)
<i>Lymphocystivirus</i>	Yassı balık	<i>Lymphocystis disease virus 1</i> (LCDV-1)
<i>Megalocytivirus</i>	Balık (Güneydoğu Asya)	<i>Infectious spleen ve kidney necrosis virus</i> (ISKNV)
<i>Ranavirus</i>	Soğukkanlı omurgalılar (özellikle amfibiler, balıklar ve sürüngenler)	<i>Frog virus 3</i> (FV 3)

1.3. *Iridovirüs* Cinsi

Iridovirus cinsi Iridoviridae familyasının en geniş cinsi olup omurgasızları enfekte eden türleri ihtiva etmektedir. Şu an için ICTV tarafından kabul edilmiş iki tür ve henüz kesin kabul edilmemiş 12 tür ihtiva etmektedir (Tablo 2) (Williams, T. ve Ward, V.K., 2010; Pie'gu vd., 2013).

Bu virüslerin ağızdan enfeksiyonu çok yavaştır. Böcek vücudundaki ilk çoğalma alanı yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasıdır. Enfekte ettikleri konak böceğin kuru ağırlığının %25'ini teşkil edecek kadar çok miktarda çoğalabilirler. Salgın enfeksiyonlara neden olmazlar. Eğer larva erken gelişme evrelerinde enfekte olursa, hastalık öldürücü olur. Bu tip enfeksiyon açık enfeksiyon olarak bilinir ve larva vücudu mavi-yeşil karışımı bir renge bürünür (Şekil 1). Hafif enfeksiyonlarda ise krem rengindeki larva vücudu beyaza yakın açık bir renk alır. Bu tip enfeksiyonlar da gizli enfeksiyon olarak bilinir ve ölümcül değildir. Bu şekilde enfekte olan böcekler sağlıklı görünürler ve ergin döneme kadar gelişerek çoğalabilirler. Zararlı böceklerle karşı biyolojik kontrol ajanı olarak düşük potansiyele sahip oldukları düşünüldüğünden bu virüslere olan ilgi sınırlanmıştır. Ancak böcek popülasyonlarının canlılığı üzerine öldürücü seviyenin altındaki iridovirüs hastalığının potansiyel etkisinin farkındalığı her geçen gün artmaktadır (Williams, 2008). *Iridovirus*'ler *in vitro* olarak pek çok böcek hücresinde ve hatta sürüngen hücrelerinde replike olabilirler. Çoğunluğu virüsün ağız yoluyla uygulanmasına kıyasla enjekte edildiğinde oldukça geniş konak aralığına sahiptirler (Williams, 2008).



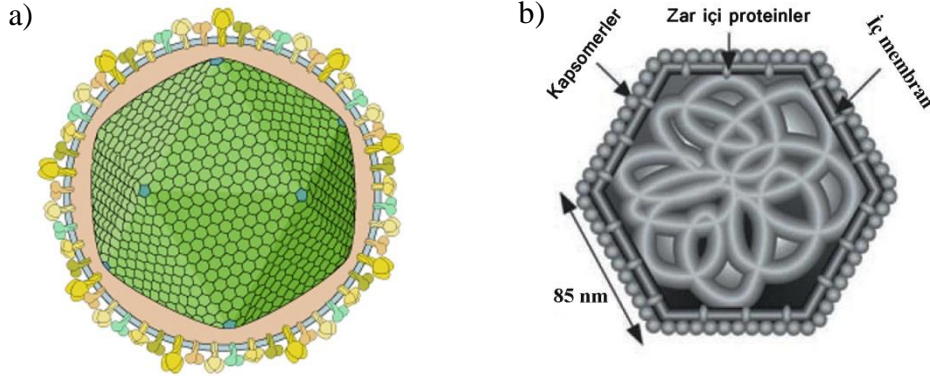
Şekil 1. İridovirüs ile enfekte *G. mellonella* larvası. Larvalar, ağır iridovirüs enfeksiyonu nedeniyle sağlıklı olandan açıkça fark edilebilecek şekilde mavileşirler (URL1).

Tablo 2. *Iridovirus* cinsine ait türler

Cins, virüs (alternatif isim)	Kısaltma	Konak Türü (Ordo) ^a	Konum
<i>Iridovirus</i>			
<i>Invertebrate iridescent virus 1</i> (<i>Tipula iridescent virus</i>)	IIV-1 (TIV)	<i>Tipula paludosa</i> (D)	İngiltere
<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (<i>Chilo iridescent virus</i>)	IIV-6 (CIV)	<i>Chilo suppressalis</i> (L)	Japonya
<i>Anticarsia gemmatalis iridescent virus^b</i>	AGIV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (L)	Amerika
<i>Invertebrate iridescent virus 2^b</i>	IIV-2	<i>Sericesthis pruinosa</i> (C)	Avustralya
<i>Invertebrate iridescent virus 9^b</i>	IIV-9	<i>Wiseana cervitana</i> (L) ^c	Yeni Zelanda
<i>Invertebrate iridescent virus 16^b</i>	IIV-16	<i>Costelytra zealandica</i> (C)	Yeni Zelanda
<i>Invertebrate iridescent virus 21^b</i>	IIV-21	<i>Helicoverpa armigera</i> (L) ^d	Malawi
<i>Invertebrate iridescent virus 22^b</i>	IIV-22	<i>Simulium variegatum</i> (D)	İngiltere
<i>Invertebrate iridescent virus 23^b</i>	IIV-23	<i>Heteronychus arator</i> (C)	Güney Afrika
<i>Invertebrate iridescent virus 24^b</i>	IIV-24	<i>Apis cerena</i> (Hy)	Kaşmir
<i>Invertebrate iridescent virus 25^b</i>	IIV-25	<i>Simulium spp.</i> (D)	İngiltere
<i>Invertebrate iridescent virus 29^b</i>	IIV-29	<i>Tenebrio molitor</i> (C)	Amerika
<i>Invertebrate iridescent virus 30^b</i>	IIV-30	<i>Helicoverpa zea</i> (L)	Amerika
<i>Invertebrate iridescent virus 31^b</i>	IIV-31	<i>Armadillidium vulgare</i> (Is) ^e	Amerika

^aColeoptera (C), Diptera (D), Homoptera (H), Hymenoptera (Hy), Lepidoptera (L) ve karasal izopodlar (Is) (Crustacea). ^bMuhtemel üye. ^c*Witlesia sabulosella* (L) ve *Opogonia sp.* (C) simpatrik böcek türlerinden de izole edildi. ^dUganda'da Victoria Gölü'nde *Lethocerus colombiae* (H)'dan da izole edildi, fakat kontamine olmuş olabilir. ^e*Porcellio dilatatus*'tan ve muhtemelen karasal izopodların diğer bazı türlerinden de izole edildi.

İridovirüsler, nükleopolihedrovirüsler (NPV'ler), granulovirüsler (GV'ler), sitoplazmik polihedrovirüsler (CPV'ler) ve entomopoksvirüslerden (EPV'ler) farklı olarak koruyucu bir protein matrisi içine gömülü değildirler (Williams, 1998). İkosahedral geometriye sahiptir ve virüsün yapısını sırası ile en içte proteinler ile kompleks oluşturmuş DNA, bunları çevreleyen yaklaşık 4 nm kalınlığında enfektivite için gerekli olan lipid tabaka ve bu tabakayı da çevreleyen protein yapıdaki kapsid tabakası oluşturmaktadır (Şekil 2). Bazı iridovirüslerde virüsü çevreleyen bir zarf bulunmaktadır. Bu zarf genellikle hücre kültüründe çoğalan iridovirüslerde virüsün hücreden tomurcuklanma yöntemi ile ayrılması durumunda kazanılmaktadır (Williams, 1998 ve 2008).

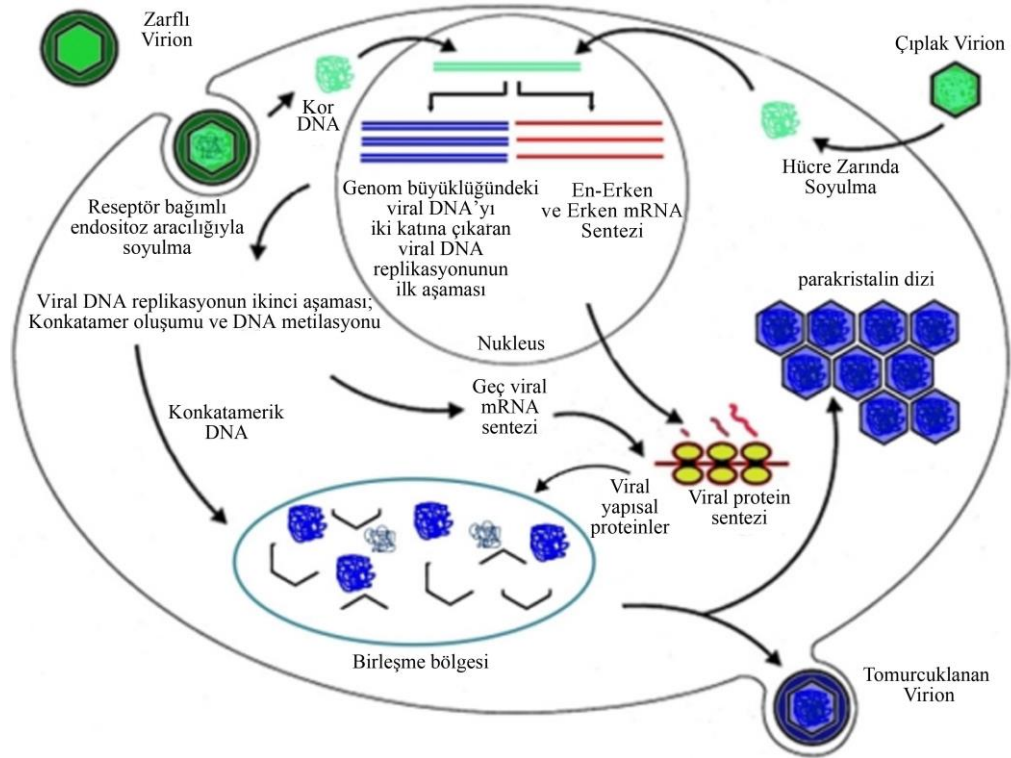


Şekil 2. İridovirüslerde kapsid simetrisini ve iç yapısını gösteren diyagram
a) kapsid simetrisi (URL2) b) ayrıntılı yapı (Tripiet-Darcy vd., 1984).

İridovirüslerde genom 140-210 kbp arasında değişen doğrusal DNA molekülüdür ve bu genom dairesel permütasyon ve terminal redundansi özelliğine sahiptir. Dairesel permütasyon, bir popülasyonda her genomun uçlarındaki dizilerin birbirine benzemediği anlamına gelirken, terminal redundansi DNA molekülünün bir ucundaki dizinin bir kısmının diğer uca da tekrar ettiği anlamını taşımaktadır. Örneğin; bir genomun tamamı 0-9 arası numaralarla gösterilecek olursa, altı çizili numaraların olduğu yerler terminal redundansiyi belirtmek üzere her bir virüs partikülünün DNA molekülü şu kombinasyonlarla gösterilebilir: 012345678901, 234567890123, 4567890123456 gibi. IIV-6'da terminal redundansi derecesi %12 olarak tahmin edilmektedir ve genomda altı replikasyon orijini bulunmaktadır (Williams, 2008).

İridovirüslerde replikasyon Frog Virus 3 (FV 3)'de çalışılmıştır. İridovirüsler nükleositoplazmik virüsler olarak bilinirler. Replikasyonları nükleusta başlar sitoplazmada

tamamlanır. Enfeksiyondaki ilk basamak, virüs partikülünün konak hücre yüzeyine reseptör bağımlı bir yol ile bağlanmasıdır. Konak hücreye bağlanmanın ardından zarflı virionlar, reseptör bağımlı endositoz ile hücreye girer. Buna karşın zarfsız virionlar ise hücre membranını ve virüs arasında meydana gelen füzyon olayı ile konak hücreye girer (Braunwald vd., 1985). Hücreye girişin ardından viral DNA hücre nükleusuna taşınır. En erken (IE) ve erken (DE) sınıflara ait erken viral transkriptler virion DNA'sı kalıp olarak kullanılarak sentezlenirler (Williams vd., 2005). Bu transkriptler DNA replikasyonu ve geç genlerin ekspresyonu için gerekli olan proteinleri kodlar. Replikasyon nükleusta başlar ve viral genomun miktarını iki katına çıkaracak kadar DNA sentezlenir. Yeni sentezlenen DNA sitoplazmaya geçer ve konkatamerleri oluşturur (Willis vd., 1984). Geç (L) viral mRNA sentezi, DNA replikasyonundan sonra hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir. Geç viral mRNA sentezi, virüsün değiştirdiği hücresel RNA polimeraz ya da viral RNA polimeraz II enzimiyle gerçekleştirilir. Geç viral transkriptler, virion oluşumunda görevli viral yapısal proteinleri kodlar. Son olarak oluşan konkatamerler virüs kapsidi içerisine paketlenir. Virionların hücreden ayrılması ya tomurcuklanma yoluyla ya da hücrenin parçalanması ile gerçekleşir. FV3 DNA'sı için replikasyon modeli Şekil 3'de şematik olarak gösterilmiştir (Williams, 2008).



Şekil 3. Frog virus 3 (FV 3)' ün hayat döngüsü (Chinchar vd., 2011).

1.3.1. *Chilo Iridescent Virüs (CIV)*

Iridovirus cinsinin tip türü olan *Chilo iridescent* virüs (CIV)' ün alternatif adı Insect Iridescent Virus Type-6 (Böcek iridescent virüs tip-6, IIV-6)'dir. CIV, lepidopter grubuna dâhil olan kök delici *Chilo suppressalis* (pirinç sap kurdu; Fukaya ve Nasu, 1966) böceğinden izole edilmiştir. IIV-6 önemli zararlı böcek türlerinde ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu için, bu böcek iridovirüsü potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak değerlendirilebilir (Kleespies vd., 1999; Hernandez vd., 2000). CIV'nin avantajlarından biri, *Anthonomus grandis* (boll weevil) hücre suşu (BRL-AG-3A) kültüründe kolayca büyütülüp çoğaltılabilmesidir (D'Costa vd., 2012). İkosahedral CIV virüs partikülünün yapısında dışta protein yapıda kapsid örtü, arada lipid tabaka ve iç kısımda da dairesel permütasyon ve terminal redundansi özelliği gösteren lineer çift zincirli bir DNA molekülü mevcuttur (Delius vd., 1984; Schnitzler vd., 1987; Soltau vd., 1987; Fischer vd., 1990). Bu genomik özellik, frog virus 3 (FV3, Goorha ve Murti, 1982), lymphocystis disease virus (LCDV, Darai vd., 1983, 1985; Schnitzler vd., 1990) ve insect iridescent virus type 9 (Ward ve Kalmakoff, 1987) gibi diğer iridovirüslerde de ortaktır. İlerleyen zamanlarda virion yapısı, viral proteinler, enzimatik aktiviteler (Cerutti ve Devauchelle, 1980, Cerutti vd., 1981; Darai, 1985 ve 1990), en az altı replikasyon orijininin konumu ve tekrarlayan DNA elemanları (Fischer vd., 1988a,b; Handermann vd., 1992; Sonntag ve Darai, 1992; Stohwasser vd., 1993; Schnitzler vd., 1994; Tidona ve Darai, 1997) gibi CIV'nin biyolojik ve genomik özellikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmaları takiben, CIV genomunun 2001 yılında Jakob vd. tarafından dizin analizi yapılmıştır. Böylece CIV genomu ilk dizin analizi yapılan iridovirüs olarak literatüre geçmiştir.

Viral genomik DNA dizisinin baz bileşiminin önceden de ifade edilen değerlerle uyumlu olacak şekilde, %71.37 oranında A+T, %28.63 oranında da G+C'den oluştuğu tespit edilmiştir (Jakob vd., 2001). Genomda çok sayıda kısa doğrusal, ters ve palindrom yapıda tekrarlı DNA dizileri mevcuttur. Ayrıca diğer büyük DNA virüsleriyle benzerliğine bakıldığında replikasyon, transkripsiyon, protein modifikasyonu ve virüs-konak etkileşimiyle ilgili olan proteinlerle ve transkripsiyon, replikasyon ve nükleotid metabolizmasıyla ilgili gen bölgelerinin önemli homoloji gösterdiği belirlenmiştir. CIV genomunun bilgisayar destekli analizi sonucu polipeptid kodlama kapasitesi 40'tan 2432 amino asit arasında değişen 468 potansiyel açık okuma zincirinin (Open Reading Frames, ORF'ler) varlığı ortaya çıkarılmıştır.

CIV'nin moleküler biyolojisiyle ilgili bilgiler genomik, transkriptomik ve proteomik alanlarda yapılmış birkaç çalışmayla sınırlı olup (Bigot vd., 2013; Ince vd., 2013; Dizman vd., 2012; Ince vd., 2010; Nalcacioglu vd., 2007; 2003; D'Costa vd., 2004; 2001), apoptosisle ilgili bazı çalışmalar da mevcuttur (Chitnis vd., 2008; 2011; Ince vd., 2008; Paul vd., 2007). Omurgasız iridovirüsler üzerine yapılan ilk proteomik analiz çalışması CIV'de yapılmış olup, virion yapısında 8 tanesi tek peptide dayalı olmak üzere toplam 46 viral protein tespit edilmiştir. Ayrıca 54 proteinden 36'sının diğer omurgasız veya omurgalı iridovirüsleriyle benzer homologlara sahip oldukları belirlenmiştir (İnce vd., 2010). Apoptoz inhibitör geni olan 193R'nin fonksiyonel analizi İnce ve arkadaşları tarafından bu geni taşıyan plazmidlerin böcek hücre kültürüne transfekte edilerek susturulması şeklinde gerçekleştirilmiştir (Ince vd., 2008). CIV'nin moleküler biyolojisi hakkında daha fazla bilgi edinmek, bu virüsün böceklerdeki patolojisini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

CIV genomunun biyoinformatik analizlerine bakıldığında, genomdaki *136R* ve *165R* kodlu iki ORF'nin literatürdeki metalloproteinaz proteinlerini kodlayan genlere benzer oldukları belirtilmektedir. Metalloproteinazlar böcek yapısındaki çeşitli dokuları parçalayabilme yeteneğinde proteinlerdir. Bu özellikleri nedeni ile bu genlerin virüs patojenitesinde rol alan genler olabileceği düşünülmüştür. Dolayısı ile bu çalışmada bu genlerin fonksiyonel metalloproteinazlar kodlayıp kodlamadıkları araştırılmıştır.

1.4. Matriks Metalloproteinazlar

Proteazlar proteinlerin peptid bağlarının hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimlerdir. Proteazlar etki bölgelerine bağlı olarak ekzopeptidaz ve endopeptidaz olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar (Tablo 3). Endopeptidazlar substratın uçlarına uzak bölgeden peptid bağını keserken, ekzopeptidazlar substratın amino veya karboksi ucundan peptid bağını keserler (Rao vd., 1998).

Tablo 3. Proteazların sınıflandırılması (Rao vd., 1998).

Proteaz	EC Numarası
Ekzopeptidazlar	
Aminopeptidazlar	3.4.11
Dipeptidil peptidaz	3.4.14
Tripeptidil peptidaz	3.4.14
Karboksipeptidazlar	3.4.16-3.4.18
Serin tipi proteazlar	3.4.16
Metallokarboksipeptidazlar	3.4.17
Sistein tipi proteazlar	3.4.18
Peptidil dipeptidaz	3.4.15
Dipeptidazlar	3.4.13
Omega peptidazlar	3.4.19
Endopeptidazlar	3.4.21-3.4.34
Serin proteazlar	3.4.21
Sistein proteazlar	3.4.22
Aspartik proteazlar	3.4.23
Metalloendopeptidazlar	3.4.24
Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar	3.4.99

Matriks metalloproteinaz (MMP)'ler, çinko içeren nötral endopeptidaz enzim ailesi olup, ekstrasellüler matriks (ESM)'in tüm elemanlarını yıkma özelliğine sahiptirler. Matriks metalloproteinazlar ilk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından insanların da içinde olduğu omurgalılarda tanımlansalar da sonradan omurgasızlarda, bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda da bulunmuşlardır. MMP'ler, diğer endopeptidazlarla karşılaştırıldıklarında, kendi özel DNA dizileri ve ekstrasellüler matriksi bozma yetenekleri ile kolaylıkla ayırt edilirler. Yapılarına ve substrat özelliklerine göre 5 alt grupta incelenebilirler: kollajenazlar, stromelisinler, jelatinazlar, membran tipi MMP'ler (MT-MMP) ve sınıflandırılmayan MMP'ler.

Yapısal olarak incelendiğinde MMP'ler 5 ana kısımdan oluşur:

1-Sinyal peptit; endoplazmik retikulumdan ilk sentezlenen protein

2-Propeptit: katalitik çinko bağlayan bölge ile etkileşerek enzimin inaktif formda kalmasını sağlar

3-Zn bağlayıcı bölge içeren katalizör kısım; propeptit bölgenin ayrılması ile yapısındaki çinko iyonları sayesinde enzim aktivitesini sağlayan bölge

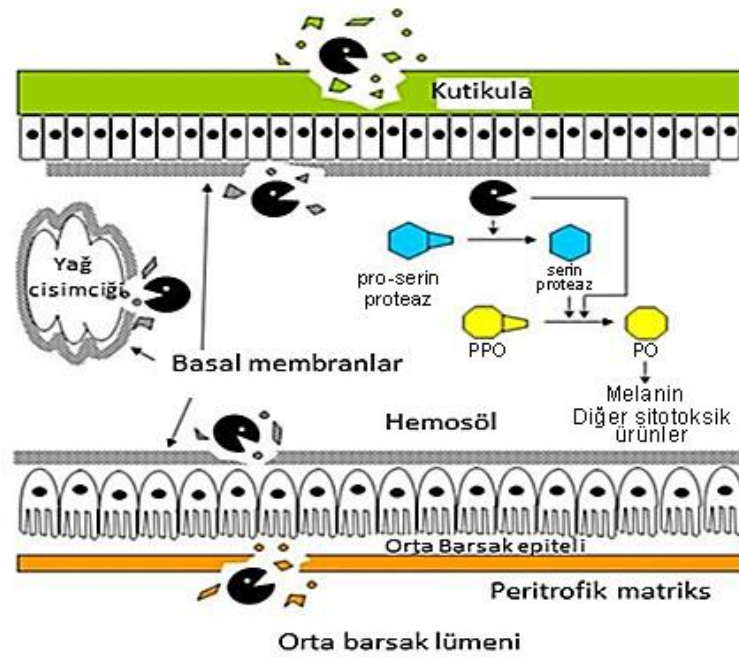
4-Hemopeksin benzeri kısım; substrat seçiciliğini belirler

5-Prolince zengin bölge; katalizör kısmı hemopeksin benzeri kısma bağlar (Bourbouli, 2010).

Çinko metalloproteinazları ayrı bir familyada sınıflandırmak için çinko bağlanma bölgelerine dayalı bir şema geliştirilmiştir. Jiang ve Bond (1992), çinko metalloproteinazları termolizin, astasin, serratiya, matriksin ve reprotizin metalloproteinazlar olmak üzere beş ayrı familyada sınıflandırmak için HEXXH motifinin etrafındaki dizileri karşılaştırmışlar. Yapılan bu çalışmaya göre, thermolysin familyasında çinko bağlayıcı olarak bir glutamik asit bulunurken (HEXXH.....E), diğer dört familyada glutamik asit yerine daha uzak mesafede bir histidinin yer aldığı çinko bağlayıcı bölge (HEXXHXXGXXH) bulunmaktadır. Bu iki familyanın üyelerine ait kristal yapıların incelenmesinden sonra, Bode ve arkadaşları (1993) bu dört familyayı metiyoninin benzer konformasyon değişimini (Med-turn, HEXXHXXGXXH.....M) içerdikleri için 'metzincinler' diye bir süperfamilyada gruplandırdılar. Aynı kişiler ayrıca 'zincinler' olarak adlandırılan HEXXH motifini bulunduran daha geniş çinko metalloproteinazlar süperfamilyasını da öne sürdüler. Verilerden anlaşıldığı üzere metzincinlerin ayrı familyalarda gruplandırılabilirdiği gibi, thermolysin benzeri çinko metalloproteinazlar da beş ayrı familyada gruplandırılabilir. Yeni amino asit dizileri elde edildiğinde metalloproteinazlarda çinko bağlanma bölgelerini tanımlamak için HEXXH motifi yaygın şekilde kullanılıyor olmasına rağmen, çinko metalloproteinazlarda en azından üç tane daha çinko bağlama motifi tanımlanmıştır. Bu motiflerden ters dönmüş zincin motifi, HXXEH, insülin parçalayan inverzincin enzim ailesini, HXXE motifi karboksipeptidaz ailesini, ve HXH motifi DD-carboxypeptidase ailesini tanımlar (Jiang ve Bond, 1992).

Son zamanlarda, böcek virüsleri ve böceklerin genomlarında da çok sayıda MMP homologları tanımlanmıştır. Bunların böcek virüslerinin patogeneğinde veya böceklerde bazal membranın parçalanması ve yeniden biçimlenmesinde görev alabilecekleri düşünülmektedir (Liu, 2006). Dolayısı ile bu proteazların zararlı böceklerin kontrolünde kullanılabilme potansiyeli söz konusudur.

MMP'ler böceklerde özellikle bazal membran üzerinde etkili olurlar (Şekil 4). Bazal membran, böceklerde tüm dokuları saran, yapısal destek oluşturan, filtrasyon görevi yapan, hücrelerin tutunması için yüzey oluşturan bir tabaka konumundadır (Timpl ve Brown 1996). Böceklerde bazal membran embriyonik gelişme, hücre/doku farklılaşması ve metamorfoz süresince yeniden düzenlenir. Bu yeniden düzenlenme işinde matriks metalloproteinazların yanında katepsinler ve ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) gibi enzimler görev yaparlar (Zhao vd., 1998; Maeda vd., 2001; Porter vd., 2005). Bazal membran tüm dokuları sarması nedeni ile virüs infeksiyonları için bir bariyer konumundadır. Ayrıca virüsler nispeten büyük oldukları için tüm dokuları saran bazal membran porlarına rahatça giremezler (Reddy ve Locke, 1990).



Şekil 4. İnsektisidal proteazların (●) hedef bölgelerini gösteren böcek anatomisi (Harrison ve Bonning, 2010).

Bazal membranın tahrip olması durumunda virüslerin enfekte konağa dağılıp dağılmadığını görmek için, bir rekombinant bakülovirüs inşa edilmiştir (Harrison ve Bonning, 2001). Bu amaç için, bir karasinek çeşidi olan *Sarcophaga peregrina*'dan elde edilen ve bazal membran parçalayıcı özellikte olan *katepsin L* geni, hazırlanan

bakülovirüse yerleştirilmiştir. Rekombinant virüs, yaban tip virüse göre *Heliothis virescens* larvalarını %50 daha hızlı öldürmüş ve yine rekombinant virüs ile enfekte larvalar, yaban tip virüs ile enfekte olanlara göre 5 kat daha az besin tüketmişlerdir. Ayrıca, rekombinant virüs iç dokuların parçalanmasına ve dolayısı ile enfekte larvanın ölmeden önce melanizasyonuna (melanin pigmentinin vücutta fazlaca birikerek koyu renk oluşmasına) neden olmuştur. Yaban tip bakülovirüs ile enfekte larvalar ise ölümden sonra melanize olmuştur. Dolayısı ile bu sonuç böcekler ile mücadelede bazal membranın hedef alınabilecek önemli bir yapı olduğunu göstermektedir.

1.4.1. Bakülovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi

Tıbbi, endüstriyel ve zirai bakımdan önemli olan çeşitli viral, bakteriyel, bitkisel ve hayvansal proteinlerin, değişik özelliklerdeki ekspresyon vektörleri aracılığı ile sentezlenmeleri biyoteknolojide büyük önem arz etmektedir. DNA'larından önemli proteinlerin üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak yararlanılmalarından dolayı böcek virüsleri son zamanlarda biyoteknolojide yeni bir dönem başlatmıştır. İlaç, toksin ve besin maddesi gibi çeşitli ürünleri kodlayan ilgili yabancı genler, özellikle hücre kültüründe bakülovirüslerin replikasyonu için zorunlu olmayan viral genler yerine klonlanarak, oldukça fazla miktarda üretilmektedirler (Luckow ve Summers, 1988; Summers, 2006; Yin vd., 2007).

Diğer vektörlere göre bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminin (BEVS) sahip olduğu üstünlükler ve avantajlar, bunları biyoteknolojinin önemli bir çalışma sahası haline getirmiştir. Pek çok bilim adamı tarafından halen devam ettirilmekte olan, bakülovirüslerin daha etkili bir ekspresyon vektörü haline getirilme ve virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması çalışmaları, bunların gelecekte biyoteknolojinin daha da önemli bir materyali olmalarına yardımcı olacaktır.

Bakülovirüslerin ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmasının en önemli üstünlüğü, polihedrin ve p10 proteinlerini kodlayan genlerden (*polh* ve *p10*) gelmektedir. Bu proteinler, enfekte olmuş hücrelerde virüs replikasyon siklusunun en geç safhasında fazla miktarda üretilir. Doğada konukçular arasında virüs partiküllerini koruyan inklüzyon yapıların oluşumunda veya virüs partiküllerinin polihedrin içerisine paketlenmesinde polihedrin proteinine ihtiyaç duyulur. Polihedraya, böceklerin ağız yoluyla enfeksiyonunda ihtiyaç duyulmasına rağmen, hücre kültüründeki virüs replikasyonunda ihtiyaç duyulmaz.

Bu nedenle, bu genleri kodlayan bölgeler çıkarılıp, yerlerine arzu edilen yabancı genler yerleştirilerek bakülovirüs ekspresyon vektör sistemleri geliştirilmekte ve bu vektörler çeşitli yabancı genlerin fazla miktarda ifade edilmesinde kullanılmaktadır.

Bakülovirüslerin ekspresyon vektör sistemi (BEVS) olarak kullanılmalarına ait ilk çalışmalar, Smith ve arkadaşları (1983) ve Pennock ve arkadaşları (1984) tarafından, *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (AcNPV) kullanılarak *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde β -interferonu ve β -galaktozidazı üretmeleriyle ilgili yapılan araştırmalardır. Sonraki yıllarda BEVS kullanılarak tıbbi, ekonomik ve endüstriyel öneme sahip viral, fungal, bakteriyel, bitkisel ve hayvansal kaynaklı çeşitli rekombinant proteinler bol miktarda üretilmiştir. Günümüzde ise özellikle tıbbi alanda yapılan çalışmalarla çeşitli hastalıklara karşı yeni antijenler, büyüme faktörleri ve kinazlar üretilip, yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Vlak ve Keus 1990). Geliştirilen yeni ilaçlarla birlikte yeni tedavi yöntemleri de ortaya çıkarılmıştır. Bunların sonucunda, başta rekombinant ve sentetik olmak üzere birçok yeni aşı bulunmuştur. Yine bu alanda yapılan çalışmalar sayesinde immünoglobulinler, insülin, interferon ve interleokin gibi proteinler de bol miktarda üretilmiştir (Hasemomn ve Capra 1990). Endüstriyel öneme sahip çeşitli bitkisel proteinler de bu sistemde yaygın olarak sentezlenmektedir. Ayrıca, zirai mücadelede zararlı böceklerle karşı etkili olan bazı patojenik özelliğe sahip proteinler de BEVS'de üretilerek zirai mücadele çalışmalarında kullanılmaktadır (Martens vd., 1990).

1.4.2. Çalışmanın Amacı

Bu tezde Iridoviridae familyası ve *Iridovirüs* cinsinin bir üyesi olan *Chilo* iridescent virüs (CIV)'e ait *matriks metalloproteinaz* genlerinin (*136R*, *165R*) fonksiyonel proteazlar kodlayıp kodlamadıkları araştırılmıştır. Literatürdeki mevcut bilgilere göre, metalloproteinaz enzim grubunun böcek patogenezinde rollerinin olabileceği düşünülmektedir. Bu önemli rollerinden dolayı CIV genomundaki bu genlerin aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışılan gen bölgeleri ökaryotik ekspresyon sistemlerinden biri olan Bakülovirüs ekspresyon sisteminde ifade edilerek elde edilen proteinlerin katalitik aktiviteleri *in vitro* ortamda substrat aracılığıyla belirlenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Çalışmada, *Iridovirüs* cinsine ait olan *Chilo* iridescent virüs (CIV) (Dr. C. Joel Funk, USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona) ve bu virüsü çoğaltmak için de konak olarak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları kullanıldı. Larvaların virüs ile enfeksiyonu enjeksiyon ile gerçekleştirildi. Enfekte edilen larvalar, 27 °C'de 3 hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enfeksiyonun geliştiği larvalar –80 °C'de muhafaza edildi.

Virüsün saflaştırılması, Marina ve arkadaşlarının (1999) geliştirdikleri metoda göre gerçekleştirildi. –80 °C'de muhafaza edilen larvalardan 1 adet alınarak 1 ml steril ddH₂O'da homojen hale getirildi. Homojenat, sırasıyla 490xg, 960xg ve 1.250xg'de 10'ar dakika santrifüj edilerek doku parçalarından ve kaba partiküllerden arındırıldı. Ardından 15300xg'de santrifüj edilerek virüs çökelti haline getirildi. Çökelti 500 µl steril ddH₂O'da çözüldü ve % 30'luk sükröz çözeltisi üzerine bırakılarak 15.300×g'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelti 1 kez yıkandı ve 1 ml steril ddH₂O'da çözüldü. Bu şekilde saflaştırılan virüs 0,22 µm'lik filtreden süzülerek steril tüplerde toplandı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

Virüs konsantrasyonunun tayini spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. 260 nm de 1 absorbans değeri 55 µg/ml olarak kabul edildi (D'Costa vd., 2001).

2.2. Viral Genomik DNA İzolasyonu

CIV ile enfekte olmuş 1 adet *G. mellonella* larvası 500 µl steril su içerisinde homojen hale getirildi. Nükleazları inaktive etmek için 100 °C'de 5 dakika ısıtıldı. Homojenat soğuduktan sonra üzerine 50 µl %10'luk SDS eklenerek karıştırıldı. Böcek kalıntılarını uzaklaştırmak için 600xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alınarak üzerine 2 µl proteinaz K (10 mg/ml) ilave edildi. Karışım 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve 16000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. DNA, süpernatanttan fenol-kloroform muamelesi ile saflaştırıldı ve gece boyu 4 °C'de TE tamponu içerisinde (10 mM

Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) diyaliz edildi. İzole edilen DNA'nın varlığı ve kalitesi jelde yürütülerek kontrol edildi.

2.3. CIV 136R ve 165R Genlerinin Biyoinformatik Analizi

136R ve 165R genlerinin sahip oldukları sıralar ve protein aktif bölgeleri NCBI Blast ve PROSITE programlarıyla, sinyal dizisinin ve transmembran domaininin var olup-olmadığı ise sırasıyla SignalP ve Expasy-TMHMM programları kullanılarak belirlendi. Genlerin karşılaştırmasında MEGA5 ve GeneDoc programları kullanıldı.

2.4. Genlere Uygun Primerlerin Hazırlanması

Primer tasarlamak için gen bankasındaki CIV'e ait 136R ve 165R gen bölgelerinin nükleotid sıraları alındı. Genlerin başlangıç ve bitiş kısımlarına uygun primerler dizayn edildi (Tablo 4). Primerlerin uçlarına klonlamalarda kullanmak amacıyla restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri eklendi.

Tablo 4. CIV 136R ve 165R genlerine ait primer dizileri

Primer	Sıra (5'-3')
136R Fw	5'-CCC GGATCC ATAGAAGATGCTATAATTG-3'
136R Rv	5'-CG AAGCTT GAAATGAATAGTTAAGACGG-3'
165R Fw	5'-CCC GGATCC CCATGAAAATAAATACAACAG-3'
165R Rv	5'-CG AAGCTT CATTTAATTAACTTTATGATAGAAG-3'

pGEMT-Easy vektörüne klonlama yaparken yardımcı olması için 136R ve 165R genlerine özgü primerlere restriksiyon bölgeleri eklendi; *Bam*HI, kalın harflerle, *Hind*III, kalın ve altı çizili harflerle gösterilmiştir.

2.5. Genlerin Viral Genomik DNA'dan PCR ile Çoğaltılması ve Klonlama Vektörüne (pGEM-T Easy) Klonlanması

Genlere ait tasarlanan primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. Deney tüplerinin her birine 2 µl CIV genomik DNA'sı, 1.5 µl 1 mM ileri primeri, 1.5 µl 1 mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP, 10 µl 5X Phusion HF tamponu (1.5 mM MgCl₂ içerir), 1

ünite Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz (Finnzymes) enzimi bırakıldı ve son hacim steril dH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 98 °C'de 30 saniyelik denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 98 °C'de 10 saniye, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve son olarak da 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda çoğaltılan DNA fragmentleri 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi ve agaroz jelden kesilerek Nucleospin Extract II DNA Safılaştırma (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Son olarak mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodropla tespit edildi.

Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz enziminin aktivitesi neticesinde küt uçlu olarak çoğaltılan ve jelden temizlenen PCR ürünlerine, pGEM-T Easy vektörüne klonlanabilmeleri için A nükleotitleri takıldı. Her bir gen için bir deney tüpüne 7 µl jelden temizlenmiş PCR ürünü, 5 ünite Taq DNA Polimeraz (Go-Taq), 1 µl Taq DNA Polimeraza ait 10X reaksiyon tamponu (MgCl₂'lü) ve reaksiyonda konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde dATP eklendi. Son hacim dH₂O ile 10 µl'ye tamamlandı, karışım 70 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

A-kuyruğu eklenen 136R ve 165R 'ye ait DNA fragmentleri, pGEM-T Easy vektörüne (Promega) 3 DNA fragmenti : 1 vektör oranında (0.3 µg DNA fragmenti ve 0.1 µg PGEM-T Easy) klonlandı. Klonlama için kurulan ligasyon reaksiyonu, 1 µl pGEM-T Easy vektörü, 7.5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 5.5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım klonlamanın gerçekleşmesi için 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.6. Elektrokompotent *E. coli* DH10β Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

Çalışmada kullanılacak elektrokompotent bakteri hücrelerini hazırlamak için petride koloni halinde bulunan *E. coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyu büyütüldü. Bu taze kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0.6-0.9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi.

Ardından 4 °C'de 4000*xrpm* hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve sürede santrifüj edildi. Çökelti %10'luk soğuk gliserolde çözüldü ve 5000*xrpm*'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti pellet miktarına göre ayarlanan hacimde %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompetent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl'lik hacimlerde) ve -80 °C'de saklandı.

Yukarıdaki işleme göre hazırlanan elektrokompotent *E. coli* DH10β hücreleri alınarak buza yerleştirildi. Tüplere 3 µl yukarıda hazırlanmış ligasyon ürünlerinden bırakılırken, bir tanesine de hiçbir şey eklenmeyerek kontrol olarak kullanıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dakika buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nin elektriksel tetik kısmına yerleştirilerek elektrik uygulandı. Kuvvetler cihazdan alınarak içlerine 1 ml LB besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra tüm karışım steril bir cam tüpe bırakılarak 37 °C'de 200*xrpm*'de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktararak 6000*xg*'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorfta 100 µl kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilere (üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl emdirilmiş petrilere) yayıldı. Gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda içerisine rekombinant plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.7. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Mavi/beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200*xrpm*'de gece boyu inkübe edildi. Plazmid DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14000*xg*'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vorteksenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, % 0.5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. 14000*xg*'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %100'lük etanol ilave edilerek 14000*xg*'de

2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti tekrar %70'lik etanol ile 14000 xg 'de 2 dakika santrifüj yapılarak yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 25 μ l dH₂O'da çözüldü.

İzole edilen plazmid DNA'ların klonladığımız DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmid DNA'ları genlere ait primerlerin uçlarına eklediğimiz restriksiyon enzimleri ile muamele edildiler. Bunun için 10 μ l DNA, 0.5 μ l *Bam*HI (promega), 0.5 μ l *Hind*III (promega), 2'şer μ l enzimlere ait 10X reaksiyon tamponlarından ve 5 μ l H₂O olacak şekilde 20 μ l'lik hacimlerde reaksiyon hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. *I36R* ve *I65R* genlerinin DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. PCR ile çoğaltılarak vektöre klonlanan bu genlerde PCR kaynaklı bir hata olup olmadığını belirlemek için bu genlerin dizin analiz yapılması gerekmektedir. Bunun için bu genleri ihtiva eden klonlardan plazmid izolasyon kiti (Promega) kullanarak kitteki kullanma prosedürüne göre plazmid DNA'ları izole edildi. İzole edilen plazmidler dizin analizi yaptırılmak üzere MacroGen firmasına (Hollanda) gönderildi. Analiz sonucunda elde edilen nükleotit sıraları gen bankasındaki bu genlere ait sıralar ile NCBI web adresindeki Blast programı kullanılarak karşılaştırıldı.

2.8. Genlerin pFastBacHT Ara Transfer Vektörlerine Klonlanması

I36R ve *I65R* genlerini pGEM-T Easy vektöründe klonlanmış halde içeren *E.coli* DH10 β bakterilerine ait kolonilerden 50 μ g/ml ampisilin içeren 5'er ml LB besiyerlerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 $xrpm$ 'de gece boyunca büyütüldü. Elde edilen kültürler, 14000 $xrpm$ 'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra kit kullanılarak bunlardan plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmid DNAların herbirinden 200 ng, 1'er μ l *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ve 2 μ l 10X universal kesim tamponu bir araya getirilerek toplam 20 μ l son hacimde reaksiyonlar hazırlandı ve bu reaksiyonlar 37 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. pGEMT-Easy vektöründen restriksiyon enzimlerle kesilerek ayrılmış gen bölgeleri agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA temizleme kiti kullanılarak temizlendi.

Bu aşamadan sonra genlerin klonlanacağı ara transfer vektörleri hazır duruma getirildi. Ara transfer vektörü olarak pFastBacHT vektörleri kullanıldı. Bu vektörlerde daha sonraki işlemlerde gerekli olacak homolog rekombinasyon bölgeleri (Tn7R, Tn7L) mevcuttur. Bu işlem için pFastBacHTb ve pFastBacHTc ara transfer vektörlerini içeren *E.*

coli DH5a bakterilerine ait birer koloniden 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C’de 200xrpm ‘de gece boyu büyütüldü. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültür 14000xrpm’ de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra pelletten kit kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmid DNA’ları restriksiyon endonükleazlar ile lineer hale getirildi. Bunun için her iki tüplere her vektör için 500’er ng plazmid DNA, 1 µl *Bam*HI, 1 µl *Hind*III ve 2 µl 10X Universal tampon bırakıldı. Son hacim steril dH₂O ile 20 µl’ye ayarlandı ve reaksiyon 37 °C’ de 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen reaksiyon %1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Restriksiyon endonükleazlarla lineer hâle gelmiş ve 4856 bp büyüklüğündeki pFastBacHTb ve pFastBacHTc vektörleri, DNA temizleme kiti kullanılarak jelden temizlendi.

Restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelden temizlenmiş *I36R* ve *I65R* genlerine ait DNA’lar, yine restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek lineer hale getirilmiş pFastBacHTb ve pFastBacHTc vektörlerine aynı sırada 3 vektör : 1 DNA oranında birbirine yapıştırıldılar. Buna göre reaksiyon; 2 µl 10X T4 DNA ligaz enzim tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 2 µl pFastBacHT vektörü, 6 µl DNA fragmanı ve 9 µl dH₂O olacak şekilde hazırlandı ve reaksiyon 16 °C’de gece boyu bekletilerek ligasyon gerçekleştirildi.

2.9. Genlerin Bac-to-Bac® Bakülovirüs Ekspresyon Sistemine Aktarılması

I36R ve *I65R* genlerinin ökaryotik bir sistemde ekspresyonlarını gerçekleştirmek amacıyla Bac-to-Bac bakülovirüs ekspresyon sistemi kullanıldı. Bu sisteme aktarım olayı Şekil 5’te şematize edilmiştir.

2.9.1.E. coli DH10Bac Kompetent Hücrelerinin Hazırlanışı

Yukarıda hazırlanan ara transfer vektörlerinin bakülovirüs sistemine aktarılması için *E. coli* DH10Bac bakteri hücrelerine transform edilmeleri gerekir. Bu hücreler özel hücreler olup transpozisyon için gerekli enzimi üreten helper/yardımcı plazmide ve bakteriyal replikasyon orijinine sahip *Autographa californica* multi nükleopolihedrovirus (AcNPV) viral DNA’sına (bakmid) sahiptirler.

Transformasyon işlemi için önce bu hücreler kompotent hale getirildi. Bunun için daha önceden petride bulunan agar üzerinde büyütülmüş *E. coli* DH10Bac hücrelerinden tek bir koloni alınıp kanamisin (50 µg/ml) ve tetrasiklin (10 µg/ml) varlığında 3 ml LB besiyerinde gece boyu büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C’de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0.6-0.9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşınca, hücreler 15 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C’de 4000*xrpm* hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti 1 ml soğuk CaCl₂ (100 mM)’de çözülerek aynı CaCl₂ solüsyonuyla hacim 10 ml’e tamamlandı. Buz üzerinde 1.5 saat bekletildikten sonra 4 °C’de 4000*xrpm* hızında 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti 1 ml 100 mM’lık CaCl₂ solüsyonunda çözülerek 100’er µl şeklinde ependorf tüplere dağıtıldı.

2.9.2. Rekombinant pFastBacHT Vektörlerinin *E. coli* DH10Bac Kompetent Hücrelerine Transformasyonu ve Transpozisyon

Ependorf tüplerde daha önceden hazırlanmış olan 100’er µl iki DH10Bac kompetent hücre tüpünün üzerlerine 5’er µl (1 ng) rekombinant vektörlerden ilave edilerek buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Deney tüpleri 45 °C’ de 45 saniye tutularak ısı-şok işlemi yapıldı ve hemen ardından buz üzerine alınarak 2 dakika soğuması için bekletildi. Tüplere 900 µl LB (oda sıcaklığında) eklendi ve 37 °C’ de 225*xrpm* hızda 4 saat inkübe edilerek transformasyon gerçekleştirilmiş oldu. Bu hücreler gentamisin (gen bölgesini içeren pFastBacHT donör plazmidinin seçimi için), kanamisin (Bakmid seçimi için), tetrasiklin (transpozisyon için gerekli enzimi üreten helper/yardımcı plazmid seçimi için), IPTG ve X-Gal (Bakmid için, boş bakmidler LacZ genini içermektedir, transpozisyon bu LacZ geni içinde gerçekleşmekte ve sonuçta transpozisyon olanlar beyaz kolonilerin oluşması ile belirlenmektedir) içeren besiyerinde 48 saat büyütüldü. Transformasyonun ardından ara transfer vektörü ile bakmid DNA arasında her ikisinde sahip olduğu homolog bölgeler sayesinde transpozisyon olması gerekmektedir. Transpozisyonun gerçekleşmesi büyüyen hücrelerin beyaz renkli olmasını sağlayacaktır. Dolayısı ile transformasyon işlemi takip eden 48 saat sonra oluşan büyükçe beyaz kolonilerden 10 tanesi yine aynı içeriğe sahip besiyeriye kolonilerin tamamen saf olmasını sağlamak amacıyla çizgi ekim yapıldı ve 48 saat 37 °C’de inkübe edildi. Oluşan beyaz kolonilerden rekombinant bakmid DNA izolasyonu yapıldı. *136R* ve *165R* genlerinin varlığı PCR ile kontrol edildi.

2.9.3. Rekombinant Bakmid DNA'ların İzolasyonu ve PCR ile Doğrulanması

Beyaz fenotipte büyüyen koloniler kanamisin, tetrasiklin ve gentamisin içeren 2 ml sıvı besiyerine inoküle edildi. Hücreler 37 °C'de durgun faza kadar büyütüldü. Kültürün 1.5 ml'lik kısmı 14000*xrpm*'de 1 dakika santrifüj edildi. Pellet kısmı 300 µl Solüsyon I (15 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaz A)'de hafif vorteks yapılarak çözüldü ve üzerine 300 µl Solüsyon II (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklenerek karıştırıldı. Hücrelerin parçalanması için oda sıcaklığında bu şekilde 5 dakika bekletildi. Üzerine 300 µl 3 M Potasyum Asetat (pH 5.5) yavaşça ilave edilerek karıştırıldı. Örnekler buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra 14000*xrpm*'de 10 dakika santrifüj edildiler. Süpernatant kısmı içerisinde 800 µl izopropanol bulunan tüplere aktarıldı, tüpler alt üst edilip 10 dakika buzda bekletildiler. 14000*xrpm*'de 15 dakika çöktürme yapıp süpernatantlar dikkatlice döküldü. Tüplere 500 µl etanol (%70) koyulup alt üst edildi ve 14000*xrpm*'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Süpernatant dökülüp tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. En sonunda pellet haldeki bakmid DNA 40 µl TE tamponda çözülerek 4 °C' e kaldırıldı.

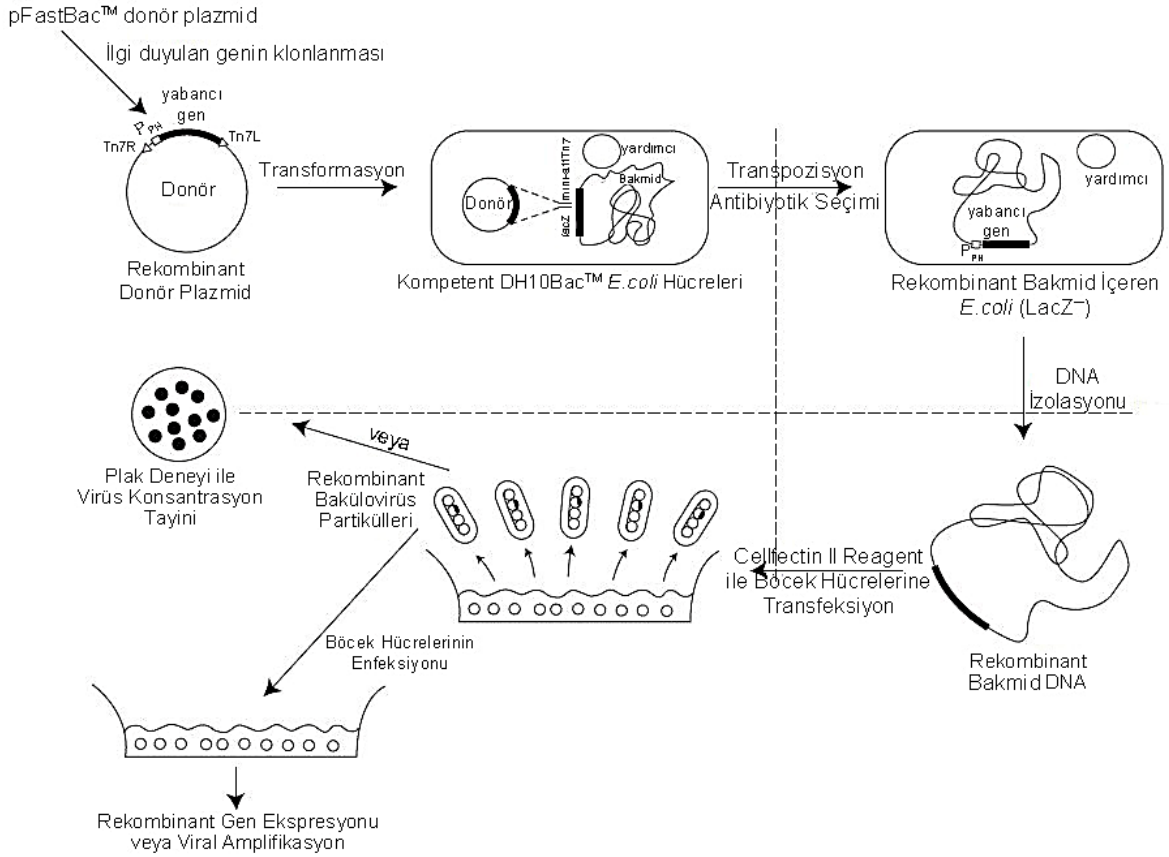
Bakmid DNA'ların *I36R* ve *I65R* genlerini ihtiva edip etmedikleri PCR ile analiz edildi. Bunun için M13Fw&M13Rv primer çifti ve M13Fw&GentaRv primer çifti kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Doğruluğu teyit edilen klonlardan bir tanesi seçildi ve bundan transfeksiyon işleminde kullanılmak üzere bakmid DNA'sı izole edildi.

2.9.4. Böcek Hücre Suşunun Stoktan Canlandırılması

Önceden %5 FBS içerecek şekilde hazırlanarak kontaminasyon kontrolleri yapılan Sf-900 II SFM (Gibco®) besiyeriden flask içerisine yaklaşık 5 ml bırakıldı. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerini ihtiva eden tüpler sıvı azottan çıkarılıp, 37 °C'de bırakılarak buzları çözüldü. Tüpler ve kapaklar EtOH (%70 etanol) ile silinip kapaklar dikkatlice gevşetildi. Tüp içerisindeki hücrelerin hepsi besiyeri ihtiva eden flask içerisine transfer edilerek iyice yayılmaları sağlandı. Hücreler tabana yapıştıktan yaklaşık 30-40 dakika sonra monolayer hale gelen tabaka, besiyeri ile yıkanarak flaske tekrar taze besiyeri bırakıldı. Kontaminasyon olup olmadığı sürekli kontrol edildi. Herhangi bir problem olmadığı için normal yolla subkültür yapılmaya devam edildi.

2.9.5. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması

Bir gün önceden Sf9 hücreleri her gözde 2×10^6 hücre olacak şekilde 6 gözlü hücre kültür kaplarına bırakıldı ve tabana tutunmaları için 2 saat 28°C 'de bekletildi. $1 \mu\text{g}$ rekombinant bakmid DNA ($\sim 5 \mu\text{l}$) ile $100 \mu\text{l}$ katkısız Grace's Insect medium (Gibco®) karıştırıldı (Solüsyon A). Diğer taraftan $8 \mu\text{l}$ Cellfectin® II Reagent (Invitrogen) ile $100 \mu\text{l}$ katkısız Grace's Insect medium homojen bir biçimde karıştırıldı (Solüsyon B). Ardından bu iki Solüsyon polystyrene tüpte birbirine karıştırılıp 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir alt-üst edilerek oda sıcaklığında bekletildi. Tutunan hücreler üzerlerinde 2 ml katkısız Grace's Insect yavaşça gezdirilerek yıkandı. Lipid-DNA karışımının üzerine $800 \mu\text{l}$ katkısız Grace's Insect eklendi, nazikçe karıştırıldı ve hücrelerin üzerine yavaşça ilave edildi. Hücreler bu şekilde 28°C 'lik etüvde 5 saat inkübe edildi. Transfeksiyon solüsyonu hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve üzerine %5 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren 2 ml Sf-900™ II SFM (Gibco®) besiyeri eklendi, 72 saat 28°C 'de inkübasyona bırakılarak transfeksiyon gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra oluşan rekombinant virüsler hücrelerin toplanması ve $500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj yapılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatant P1 viral stok olarak adlandırıldı. P1 viral stoğun konsantrasyonu oldukça düşük olduğundan daha yüksek konsantrasyona sahip bir viral stok elde edebilmek için bu viral stok kullanılarak tekrardan enfeksiyon yapıldı ve oluşan rekombinant virüsler izole edildi. Bu izole edilen virüsler P2 viral stok olarak adlandırıldı. T75 flasklere bırakılan 9.0×10^6 hücre P2 viral stoktan $500 \mu\text{l}$ kullanılarak enfekte edildi. Enfeksiyondan 3 gün sonra hücreler toplandı ve rekombinant bakmid DNA'ları barındıran bakülovirüsü içeren süpernatant kısmı $0,22 \mu\text{m}$ 'lik filtrelerden süzülerek daha sonraki enfeksiyonlarda kullanılmak üzere 4°C 'de muhafaza edildi.



Şekil 5. Bac-to-Bac ekspresyon vektör sistemi. Bu sistem, rekombinant bakülovirüs oluşturma, çoğaltma ve gen ekspresyonu için kullanılan bir sistemdir.

2.10. Proteinlerin Hücre Kültüründe Üretilmesi ve Saflaştırılması

136R ve 165R genlerine ait proteinleri hücre kültüründe üretmek için öncelikle Sf9 hücreleri T75 flasklerde 9.0×10^6 hücre/flask olacak şekilde dağıtıldı. Bu hücreler CIV genlerini bakmid DNA üzerinde içeren rekombinant bakülovirüsler ile enfekte edildi. Enfeksiyon işlemi için 2 ml hacimde olacak şekilde virüs solüsyonu T75 flasklerde bulunan hücrelerin üzerine yavaşça ilave edilip 2.5×10^6 rpm hızda yatay sallayıcıda 2 saat boyunca sallandı. Bu şekilde virüslerin hücrelere tutunması sağlandıktan sonra flasklere %5 FBS içeren Sf900 II SFM besiyeri ilave edilerek son hacim 10 ml'ye tamamlandı ve 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldılar. 72 saatlik enfeksiyon sonunda hücreler içerisinde buldukları besiyeride süspansiyon hâle getirilerek 4 °C'de $500 \times g$ 'de 5 dakika çöktürüldü. Hücrelerden oluşan pellet kısmı protein saflaştırmak için kullanıldı, hemen kullanılmadığı zamanlarda -80 °C'de saklandılar.

Bu hücre pelletinden “MagneHis™ Protein Purification System (Promega)” protein saflaştırma kiti kullanılarak N-terminalinde His-taq uzantısına sahip proteinler saflaştırıldı. Her 2.5×10^6 hücre için 1 ml olacak şekilde PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X)’te çözülen pelletin üzerine her 1 ml için 330 μ l Cell Lysis Reagent ve 1 μ l DNaz I ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dakika rotator yardımıyla döndürülerek inkübe edildi. Her 1 ml örnek için 30 μ l Ni partikülü ilave edilerek proteinin bu parçacıklara bağlanması için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Magnetik standı koyulup Nikel parçacıklarının çekilmesi sağlandıktan sonra geri kalan sıvı kısım atıldı, 500 mM NaCl içeren Wash/Binding tamponuyla Nikel tozları süspanse hâle getirilip tekrar mıknatıs yardımıyla çekilmeleri sağlanarak yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. En son başlangıçta elimizde bulunan her 1 ml örnek için 100 μ l olacak miktarda çözücü tamponuyla muamele edilip 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi, tekrar standı yerleştirilip protein içeren sıvı kısım alınarak az miktarlara bölünüp $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'e kaldırıldılar.

2.11. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein miktarının tayini Bradford’un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 μ g BSA içeren çözeltiler dH_2O ile 500 μ l’ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çözeltilerden ve konsantrasyonları öğrenilmek istenen örneklerden 10’ar μ l alınıp üzerine 200’er μ l hazır boya çözeltilerinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve örnekler 96 gözlü mikropate üzerine 3 tekrarlı olacak şekilde aktarıldı. 15 dakikalık inkübasyon süresinden sonra SpectraMax M2 (Molecular Devices) cihazı kullanılarak 595 nm’de ölçümler yapıldı.

2.12. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve Western-Blot Analizi

SDS poliakrilamid jel elektrofrezisi yöntemi ile her bir örnekten 80 μ g protein kullanılarak iki farklı jel yürütüldü. Jellerden biri boyama işlemi için, diğeri de western-blot tekniği için kullanıldı. Her bir örnek üzerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6.8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β -merkaptoetanol, %0.1 bromofenol blue) ilave

edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %12'lik SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 40 mA akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (%0.125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından yıkama çözeltisinde (%36 Metanol, %9 Asetik Asit) 1-2 saat yıkandı. Jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

Western blot analizi için diğer jel içeriği semi-dry elektroforetik blotlama cihazı kullanılarak immobilon membrana aktarıldı. Bunun için Immobilon-P membranı ve whatman kâğıtları poliakrilamid jel büyüklüğünde kesildi. Membran ve kağıtlar elektroblotlama tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glycine, %0.0375-w/v SDS) ıslatıldıktan sonra cihaza 2 whatman kağıdı, 1 immobilon-P membranı, poliakrilamid jel ve 2 whatman kağıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildiler. Cihaz 0.04 Amper'de 1 saat çalıştırıldı ve böylece blotlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından membran PBS de hazırlanmış %0,3'lük süt tozunda 2 dakika yıkandıktan sonra 3 saat oda sıcaklığında yine PBS de hazırlanmış %3'lük süt tozu içinde bloke edildi. Takiben 3 kere 10`ar dakika %0,3'lük süt tozunda yıkandı. Daha sonra 1 saat anti-poly Histidine antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, H-1029) içeren %0,3'lük süt tozunda oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve bu sürenin sonunda tekrar 3 kere 10`ar dakika %0,3'lük süt tozunda yıkandı. Ardından 1 saat Anti IgG-Alkalin Fosfataz antikor (1:1000 sulandırma) (Sigma, A-3562) içeren %0,3'lük süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Sonra tekrar 3 kez 10`ar dakika %0,3'lük süt tozu içinde ve 2 kezde 10`ar dakika AP (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5, 1X) tamponu içinde yıkama gerçekleştirildi. Son olarak membran 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stock solution, Roche, 11681451001) içeren 10 ml AP tamponu içinde boyandı. Reaksiyon, membranın bolca dH₂O ile yıkanmasıyla durduruldu.

2.13. Protein Aktivitesinin Araştırılması

2.13.1. Enzimlerin Çalıştığı pH ve Sıcaklıkların Belirlenmesi

Metalloproteinaz enzimlerinin en iyi çalıştığı pH'yı bulmak için pH'sı 6.5, 7.0, 7.6 ve 8.0 olan 50 mM'lık Tris ve Tris-HCl tamponları kullanılarak aktivite deneyleri gerçekleştirildi. Sıcaklık olarak da 28, 30 ve 37 °C 'de Eppendorf Termomixer cihazında aktivite deneyleri kuruldu.

2.13.2. Enzimlerin Substratlar Aracılığıyla Aktivite Tayini

Protein aktivitesini tespit etmek için proteazlara özgü genel substratlardan Azo-casein (Sigma) ve Azocoll (Sigma) kullanıldı.

Azo-casein substratı tampon içerisinde %5 olacak şekilde (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM CaCl₂, 10 µM ZnCl₂, 150 mM NaCl) hazırlandı ve homojen hâle getirmek için 37 °C' de arada bir vorteksenerek 1 saat sallandı. Bu şekilde hazırlanan substrattan her iki protein için 200'er µl alındı ve üzerlerine her proteinden ayrı ayrı 20'şer µg ilave edildi ve yine vorteksenerek karıştırıldı. Karışım 1 saat 37 °C' de inkübe edildi. Reaksiyon, hacmi kadar %10 TCA (trichloroacetic acid) eklenerek reaksiyon durduruldu ve en yüksek hızda 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantla eşit hacimde NaOH (2 N) karıştırıldı ve renk değişimi 440 nm dalga boyunda SpectraMax M2 (Molecular Devices) cihazıyla ölçüldü.

Diğer substrat olan Azocoll (Azo dye-impregnated collagen, Sigma)'den ise 50 mg 10 ml tampon (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM CaCl₂, 10 µM ZnCl₂, 150 mM NaCl) içerisinde süspanse edildi (5 mg/ml). 37 °C'de 90 dakika boyunca 300*xrpm* hızda karıştırılarak boyasının giderilmesi sağlandı. 10000*xg*' de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Substratın bulunduğu pellet kısmı 10 ml yeni tamponda tekrar çözüldü. Oda sıcaklığında homojen görüntü sağlanacak şekilde karıştırılırken 1000'er µl alınıp 2 ml'lik propilen ependorflara bırakıldı. Her bir deney tüpüne matriks metalloproteinaz enzim grubu dışındaki proteazların aktivitesini engellemek üzere proteaz inhibitör karışımı ilave edilerek ependorfların sıcaklıkları 37 °C'ye gelmesi için 10 dk ısıtıcı blokta bekletildiler. Üzerlerine 500 µg her bir proteinden eklenip ısıtıcı blokta 800*xrpm*'de sallanmaya bırakıldılar. Bir deney tüpü de sadece substrat konularak kontrol

amaçlı kullanıldı. 6000*xrpm*'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatantlardaki renk değişimi zamana bağlı olarak 520 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

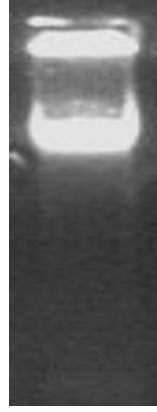
3. BULGULAR

3.1. Virüsün oğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Chilo iridescent virüs süspansiyonu ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* larvaları 27 °C' de 3 hafta boyunca inkübe edildikten sonra enfeksiyonun geliştiği larvalar toplandı. Hafif enfekte larvalarda mavi ile karışık beyaz renk, ağır enfekte larvalarda ise mavi- yeşil renk gözlemlendi. Bu renklerin gözlemlendiği larvalar toplandı ve -80 °C' de muhafaza edildi. Larvalardan virüs izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen virüsün konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü ve konsantrasyon 250 ng/μl olarak belirlendi.

3.2. Viral DNA İzolasyonu

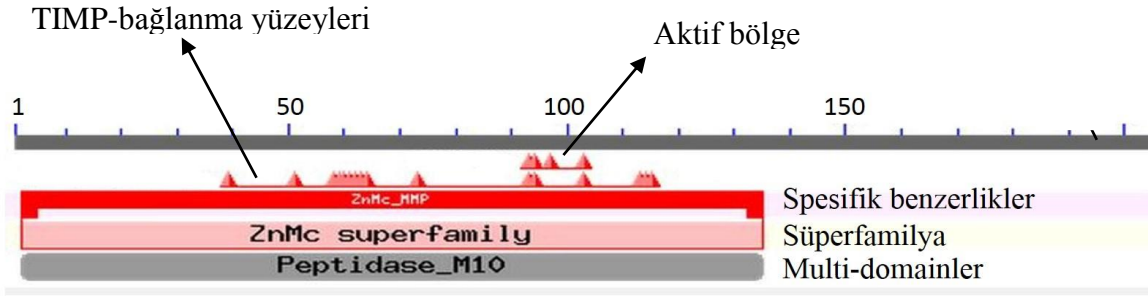
CIV ile enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvalarından DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı (Şekil 6).



Şekil 6. CIV genomik DNA'sının jel görüntüsü

3.3. 136R ve 165R Genlerinin Biyoinformatik Analizi

165R genine ait proteinin aminoasit sırasının domain bulma programı ile analizi sonucu 90. ve 104. aminoasitler arasında bir çinko matriks metalloproteinaz domainine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 7).



Şekil 7. CIV165R genine ait amino asit sırasının belirlenen korunmuş bölgeleri. TIMP (metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri)-bağlanma yüzeyleri; in vivo koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar.

CIV136R'ye ait proteinin amino asit sırasının biyoinformatik analizi sonucunda korunmuş domain yapısı veritabanı tarafından sağlanmamıştır.

Matriks metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriks ile bazal membran bileşenlerini parçalama özelliğinde olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Bir metalloproteinazın aktif bölgesi yapının içine gömülmüş HEXXH motifi içerir ve aktif hâldeyken bu bölgenin açık olması gerekir. CIV136R ve CIV165R amino asit dizilerinin içinde fonksiyonel kararlılıklarının korunması için gerekli olan çinko iyonunu bulduran ve histidin amino asitleri içeren katalitik bölgeye sahip oldukları gösterilmiştir. HEXXH katalitik domaini enzimlerin aktifliğini gösterir. Şekil 8'de çeşitli organizmalardaki korunmuş HEXXH motifinin CIV genomunda bulunan matriks metalloproteinazlara (136R, 165R) ait amino asit sıralarının karşılaştırması gösterilmiştir. CIV136R geni en yüksek benzerliği %58 oranında IIV-22 (139R, 127L) ve IIV-30 (140R) genomlarında bulunan metallopeptidazlarla göstermiştir. CIV165R geni ise %48'e varan benzerlikle *Drosophila* cinsine ait çinko bağlı matriks metalloproteinazlarla yüksek homoloji göstermiştir. Bunun dışında her iki açık okuma zincirinin de veritabanına kayıtlı çok sayıda sekanslanmış matriks metalloproteinazlarla %40'tan fazla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

```

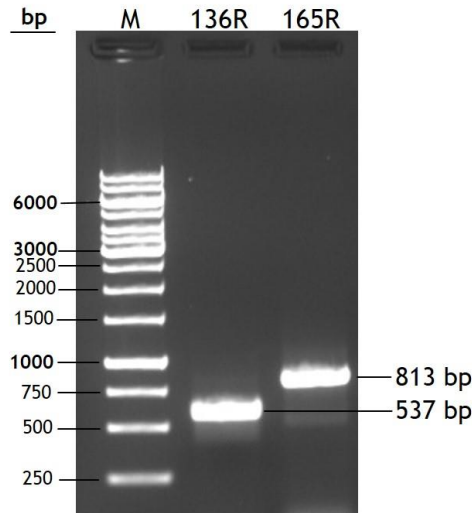
          *                *                *
CIV136R   : ----KQIFLCIKDKKSG---DANYDYNSLIFVTLHEIAFVICDELG-----
CIV165R   : ----GVVHLDYDEDWDF-----ASLKQ-VLLHELGHTFGLGHSSDNKSIM
AMV070    : -----YYNKHIKINYNNIKKHINNKFLTLMLIHEIGHFLGLTHI-----
FmMMP     : KGKGGDTHFDEAEHWTF---NSSETGVDLFM-VAAHEFGHALGL-----
CmStr3    : --REGDVHFDYDETWTI---GNN-LGTDLLQ-VAAHEFGHVLGLQHT-----
CcMMP16   : ----DAHFDADEKWHF-TDGERGDATNFLG-VAVHEFGHSLGIGHS-----
Drosophila : -----AHFDADENWDFDVNSSNSEGTNFLN-VALHELGHSLGIGHS-----
                                     v HE gH lgl

```

Şekil 8. Matriks metalloproteinazların aktif bölgelerinin homolojileri. CIV: *Chilo Iridescent Virus*, AMV: *Amsacta moorei* entomopoksvirüs accession no. NP_064852.1, PmMMP: *Pinctada martensi* MMP accession no. AGS32054.2, CmStr3: *Chelonia mydas* stromelysin-3 accession no. XP_007063827.1, CcMMP16: *Ceratitis capitata* MMP-16 accession no. XP_004520958.1, Drosophila: *Drosophila grimshawi* accession no. XP_001995042.1. MEGA5 ve GeneDoc programları kullanılmıştır.

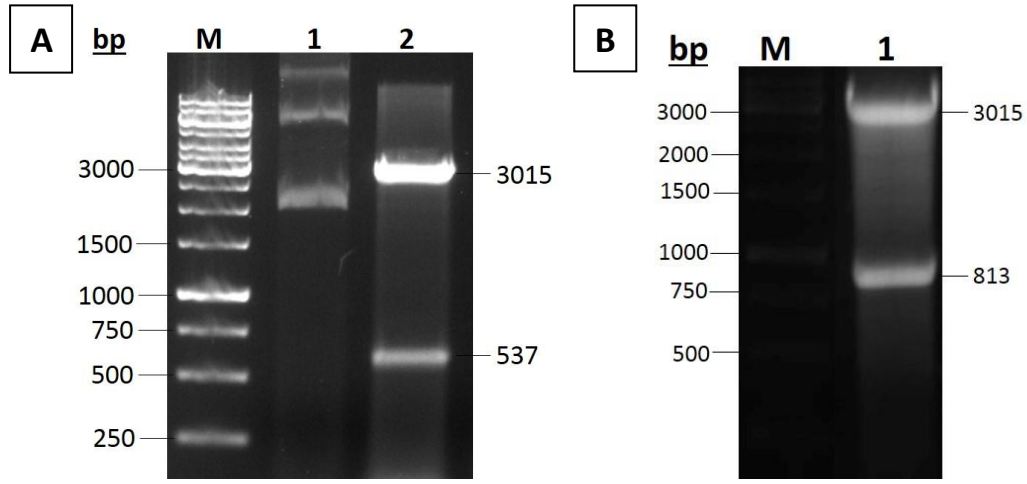
3.4. Genlerin pGEM®-T Easy Vektörüne Klonlanması

CIV'ye ait *136R* ve *165R* genleri, uçlarına uygun restriksiyon enzim (*Bam*HI, *Hind*III) bölgeleri eklenmiş primerler kullanılarak genomik DNA'dan PCR ile çoğaltıldı. Beklenen büyüklükteki (sırasıyla 537bp, 813bp) PCR ürünleri 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1' lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 9).



Şekil 9. *136R* ve *165R* genlerinin CIV genomundan PCR ile çoğaltılması. (M) Marker (1 kb)

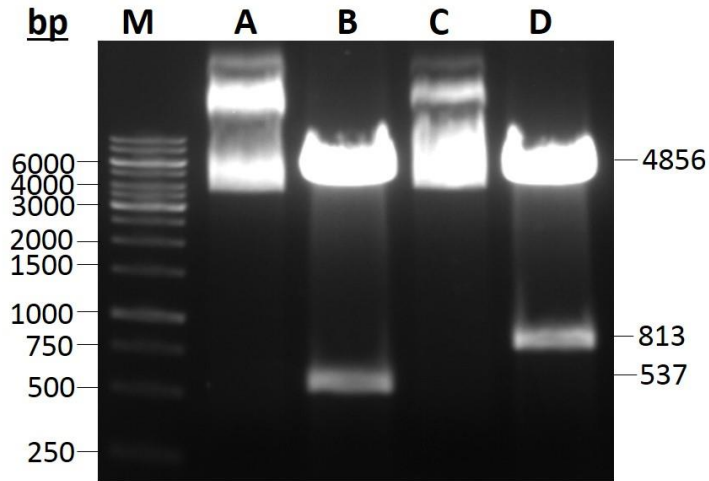
Küt uçlara sahip olarak elde edilen PCR ürünleri jelden temizlendikten sonra uçlarına sarkık olacak şekilde A nükleotidleri takıldı. Bu şekilde sarkık uçlara sahip PCR ürünleri pGEM-T Easy transfer vektörüne klonlandı ve ardından *E. coli* DH10 β hücrelerine transform edildi. Oluşan beyaz renkli kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve klonlanan genleri içerip içermediklerini görmek için restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Kesim sonuçları jel üzerinde görüntülendi (Şekil 10).



Şekil 10. *136R* ve *165R* genlerinin pGEM®-T Easy transfer vektöründe doğrulanması. M; marker (1 kb); A1, halkasal pGEMT136R plazmid; A2, pGEMT136R plazmid kesimi (*Bam*HI, *Hind*III); B1, pGEMT165R plazmid kesimi (*Bam*HI, *Hind*III).

3.5. Genlerin pFastBacHT Ara Transfer Vektörlerine Klonlanması

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan ve nükleotit diziliminin doğruluğuda dizin analizi ile teyit edilen *136R* ve *165R* fragmanları, bu plazmidten *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilerek alındı ve yine aynı enzimlerle kesilerek doğrusal hâle getirilmiş olan bakülovirüs ekspresyon vektör sistemine (Bac-to-Bac) ait ara transfer vektörü olan pFastBacHTb ve pFastBacHTc (Invitrogen)'ye klonlandılar. Elde edilen rekombinant plazmidler *E. coli* DH10 β hücrelerine transform edildi. Rekombinant plazmidlerin (ara transfer vektörünün) bu hücrelerdeki varlığı plazmid DNA izolasyonu ve ardından restriksiyon enzimleri ile kesilerek gösterildi. Kesim sonucunda jelde beklenildiği gibi ara transfer vektörlerinin ve gen bölgelerinin görüntülenmesi klonlama işlemi doğruladı (Şekil 11).



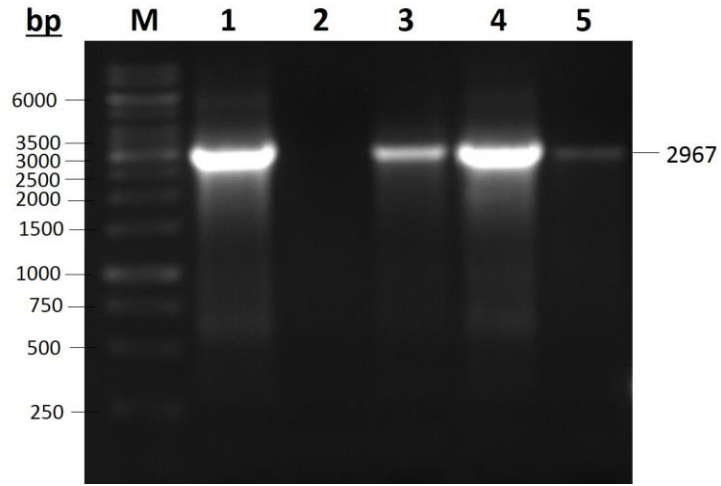
Şekil 11. Rekombinant pFastBacHT plazmidlerinin restriksiyon endonükleazlarla muamelesi. M; marker (1 kb), A ve C; sırasıyla *136R* ve *165R* genlerini içeren dairesel pFastBacHT vektörleri, B ve D; pHTb*136R* ve pHTc*165R* plazmidlerinin *Bam*HI ve *Hind*III ile kesilmiş görüntüsü.

3.6. Ara Transfer Vektörlerinin Bakteriyal Hücreye Aktarılması ve Transpozisyon

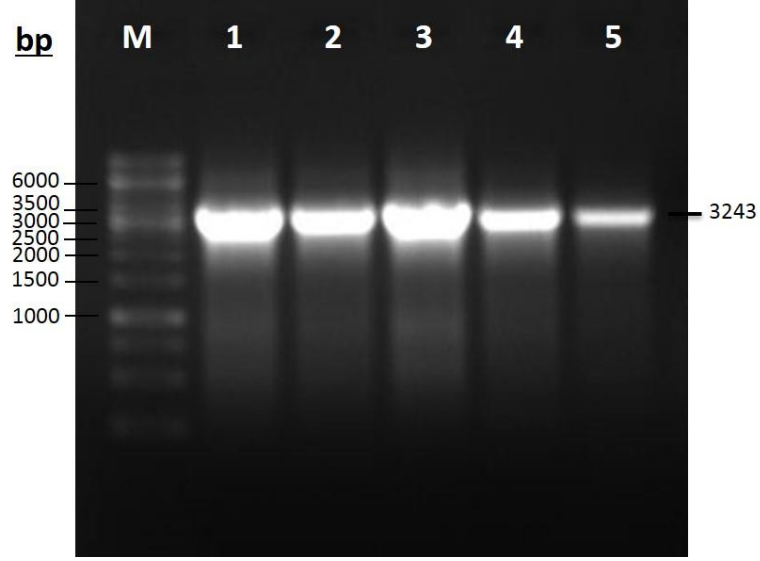
N-terminalinde 6Xhistidin kuyruğu ile birlikte CIV *136R* ve *165R* genlerini ihtiva eden sırasıyla pFastBacHTb ve pFastBacHTc (rekombinant transfer vektörleri) plazmidleri *E. coli* DH10 β hücrelerinden izole edildi. Elde edilen plazmid DNA'lar rekombinant bakülovirüs oluşturmak üzere, içerisinde bakteriyal replikasyon orijini klonlanmış bakülovirüs (AcNPV) DNA'sı (bakmid) ve transpozisyonun olmasına aracılık eden yardımcı plazmid bulunduran *E.coli* DH10Bac hücrelerine transform edildi. *E.coli* DH10Bac hücreleri içerisinde bulunan bakmid DNA'sı ile, CIV *metalloproteinaz* genlerini içeren transfer vektörleri arasında üzerlerinde ortak olarak bulunan Tn7R ve Tn7L rekombinasyon bölgeleri sayesinde transpozisyon gerçekleşti ve böylece ilgi duyulan genler, bakmid (bakülovirüs) DNA'sına dâhil edilmiş oldu. Transform olmuş *E.coli* DH10Bac hücreleri Kanamisin (bakmid DNA), Tetrasiklin (yardımcı plazmid), Gentamisin (pFastBacHTc vektörü), X-gal ve IPTG içeren LB besiyerilere ekildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından oluşan kolonilerden yukarıda özellikleri verilen yeni besiyerilerine tekrar çizgi ekim yapıldı. Bu işlemin amacı kolonilerde bir karışıklık varsa bunu önlemek içindi. Oluşan beyaz kolonilerden rekombinant bakmid DNA'ları izole

edildi ve *metalloproteinaz* genlerini içerip içermedikleri yapılan iki farklı PCR ile doğrulandı.

İlk PCR'da M13Fw ve M13Rv primer çifti kullanıldı. Bu PCR sonucunda şayet pFastBacHT vektörü ile Bakmid DNA'sı arasında transpozisyon gerçekleşmişse 2430bp DNA ile bakmid genomuna yerleştirilen DNA'nın büyüklüğü kadar bir ürün oluşması beklenmektedir. PCR sonuçları da bu beklenti doğrultusunda olmuş ve sırasıyla 2967bp (Şekil 12) ve 3243bp (Şekil 13) büyüklüğünde DNA fragmentleri çoğaltılmıştır. Bu sonuç bize CIV *metalloproteinaz* genlerinin bakmid genomuna aktarıldığını göstermiştir.

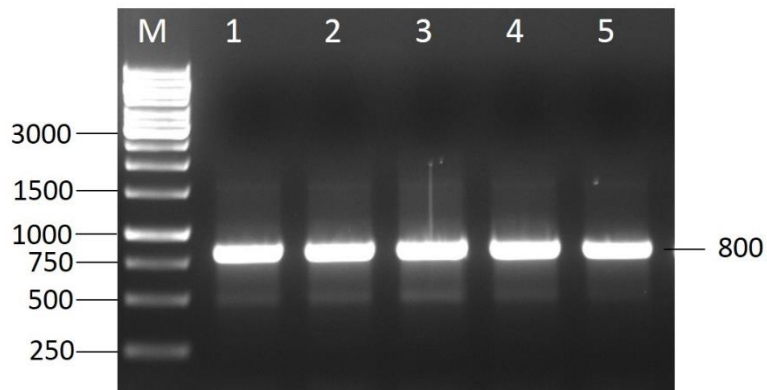


Şekil 12. *I36R* genini içeren Bakmid DNA'larının doğrulanması. *I36R* genini içeren Bakmid DNA'ları kullanılarak M13Fw & M13Rv primerleriyle PCR yapıldı. M- Marker; 1, 2, 3, 4, 5 koloni numaraları.



Şekil 13. *165R* genini içeren Bakmid DNA'larının doğrulanması. *165R* genini içeren Bakmid DNA'ları kullanılarak M13Fw & M13Rv primerleriyle PCR yapıldı. M- Marker; 1, 2, 3, 4, 5 koloni numaraları.

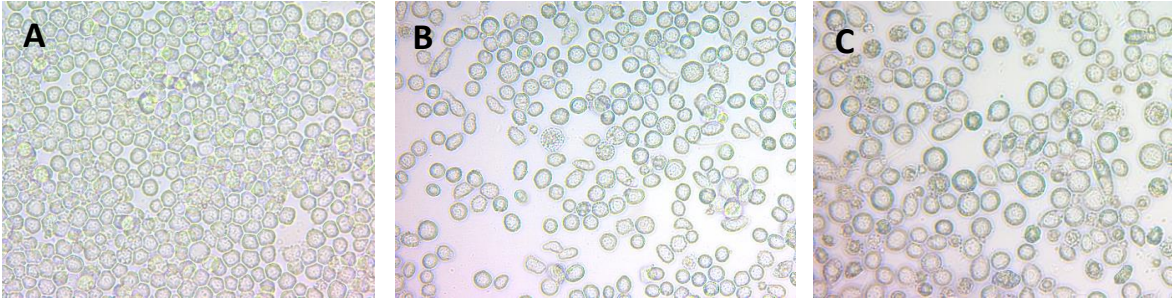
Teyit etmek amacı ile yapılan diğer PCR'da ise M13Fw ve GentaRv primer çifti kullanıldı. Bu PCR analizinde de eğer klonladığımız gen bakmid içinde bulunuyorsa 800bp 'lık bir ürün oluşturması gerekmektedir. Sonuç beklediğimiz gibi oldu ve 800 bp'lık bir fragman elde edildi (Şekil 14).



Şekil 14. Bakmid DNA'larının M13Fw & GentaRv primerleriyle PCR görüntüsü. M, Marker; 1, 2, 3, *136R* genini içeren bakmidlerin; 4, 5, *165R* genini içeren bakmidlerin koloni numaraları.

3.7. Rekombinant Bakmid DNA'larının Böcek Hücre Kültürüne Transfeksiyonu

Her iki gene ait doğruluğu tespit edilmiş olan bakmidlerden birer tanesi kullanılarak *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerine transfeksiyon yapıldı. Böylece CIV *136R* ve *165R* genlerini içeren rekombinant bakmid DNA'larını taşıyan rekombinant AcNPV virüsleri elde edildi. Elde edilen viral solüsyonlarla yeni enfeksiyonlar yapıldı ve bu enfeksiyonlarda, hücrelerde nükleusların genişlemesi, içlerinde granüllerin birikmesi ve virüslerin yatay yayılış göstergesi olan hücrelerin uzayıp şekline enfeksiyon belirtileri görüldü (Şekil 15).

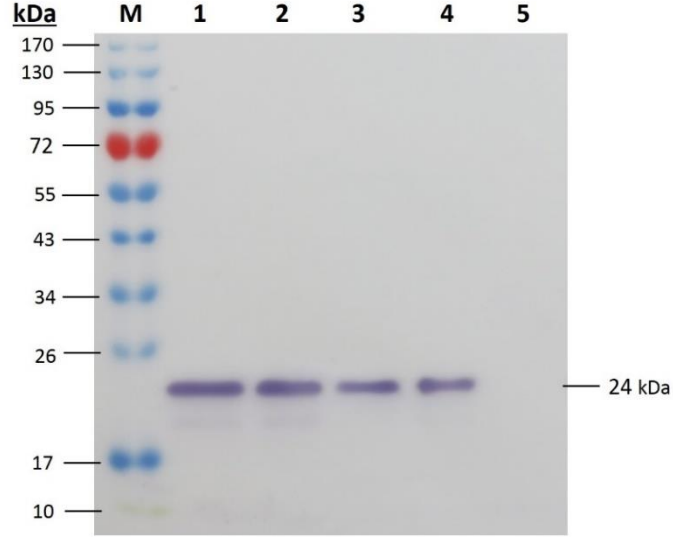


Şekil 15. Rekombinant virüslerle yapılan enfeksiyonlar. A: Enfekte olmamış kontrol Sf9 hücreleri, B: AcNPV136R ile enfekte Sf9 hücreleri. C: AcNPV165R ile enfekte Sf9 hücreleri.

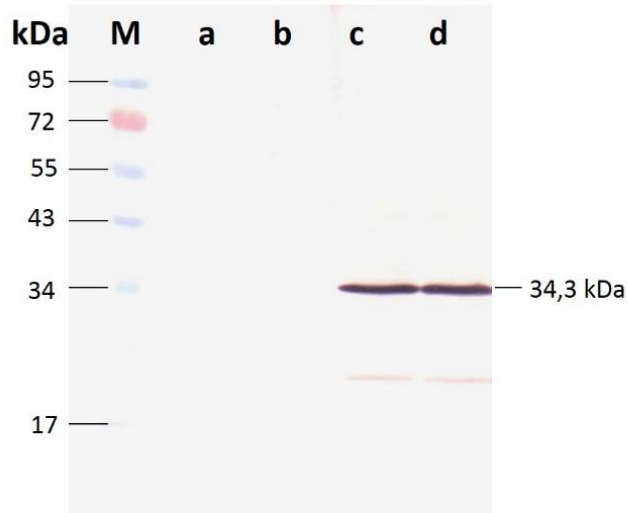
3.8. Protein Saflaştırılması ve Western-blot Analizi

Rekombinant virüsler kullanılarak T75 hücre kültürü flasklerinde bulunan Sf9 hücreleri enfekte edildi. Enfeksiyonun 4. gününde hücreler toplandı, santrifüjlendi ve oluşan hücre pelletlerinden “MagneHis™ Protein Purification System” protein saflaştırma kiti kullanılarak N-terminalinde His-taq uzantısına sahip proteinler saflaştırıldı. Elde edilen proteinlerin miktar tayinleri Bradford metodu temel alınarak hazırlanan BSA standardına göre yapıldı.

Bu proteinler kullanılarak Western analizi yapıldı. Kontrol olarak da hiçbir muamele görmemiş Sf9 hücreleri ve yabancı tip AcNPV virüsüyle yapılan enfeksiyonlar kullanıldı (Şekil 16 ve Şekil 17).



Şekil 16. CIV *136R* geninin kodladığı proteinin Western-Blot ile gösterilmesi. M; marker (prestained), 1, 2, 3, 4; AcNPV136R ile enfeksiyon, 5; wtAcNPV (yabancı tip) ile enfeksiyon.

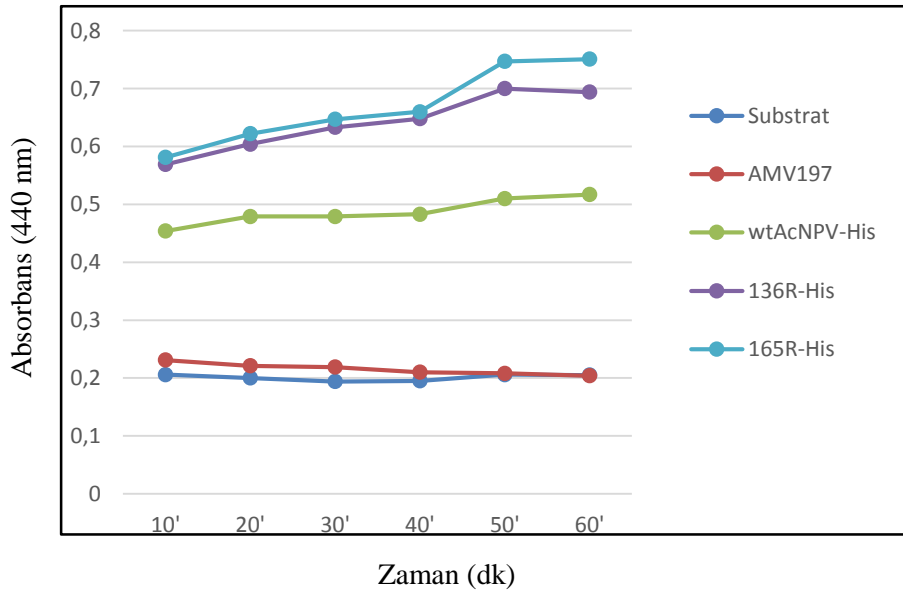


Şekil 17. CIV *165R* geninin kodladığı proteinin Western-Blot ile gösterilmesi. M; marker (prestained), a; enfekte edilmemiş Sf9, b; wtAcNPV (yabancı tip)'le enfeksiyon, c, d; AcNPV165R ile enfeksiyon.

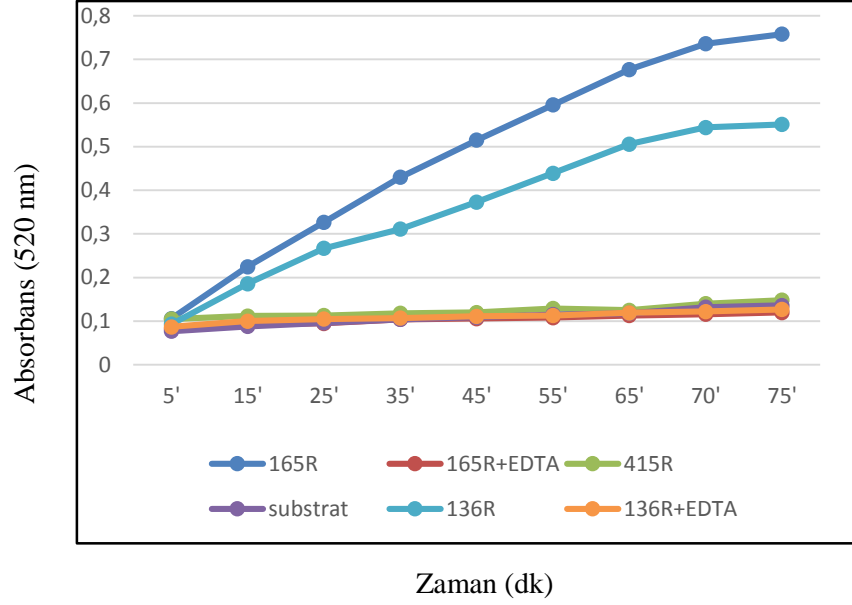
3.9. Proteaz Aktivite Analizi

Proteaz aktivitesi çalışmalarında birçok substrat kullanmak mümkündür. Ancak, çalışılan proteazın özelliklerine ve hedefine en uygun olan substratlarla çalışmak, araştırmanın sağlamlığı açısından daha kabul edilir sonuçlar verecektir. Bu çalışmada proteazlara özgü genel substratlardan Azo-casein ve Azocoll kullanılmıştır.

Yapılan aktivite çalışmaları neticesinde en uygun pH değeri Azo-casein için 7.6, Azocoll için ise 8.0 olarak belirlenmiştir. Denenen sıcaklıklardan en iyi sonuç her iki substrat ve enzim için 37 °C bulunmuştur.



Şekil 18. Azo-casein ile yapılan enzim-aktivite grafiği. AMV197; *Amsacta moorei* Protein Kinaz, wtAcNPV-His; yaban tip AcNPV'den anti-His-tag ile toplanan protein, 136R-His; AcNPV136R'den saflaştırılan protein, 165R-His; AcNPV165R'den saflaştırılan protein.



Şekil 19. Azocoll ile yapılan enzim-aktivite grafiği. 136R ve 165R, anti-His-tag ile saflaştırılan metallopeptidazlar; 136R+EDTA ve 165R+EDTA, metallopeptidazlara EDTA (10 mM) ilavesi; 415R, kontrol olarak kullanılan CIV'e ait yapısal bir protein.

4. TARTIŞMA

Tüm dünyada orman ve tarım zararlılarına karşı biyolojik mücadele ajanı geliştirme amaçlı bilimsel çalışmaların sayısı, potansiyel önemi nedeni ile her geçen gün hızla artmaktadır. Bu zararlıların çeşitliliğinin çok fazla olması ve bölgesel yaygınlık göstermeleri, her birine özgü biyolojik mücadele ajanı geliştirilmesini gerektirmektedir. Biyolojik mücadele amacıyla kullanılan ajanlardan bir grubu da böcek virüsleridir. Böcek virüslerinin kendileri hâlihazırda zararlı böceklere karşı doğal biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmakta (McIntosh ve Grasela, 1994; Hunter-Fujita vd., 1998; Demir vd., 2008), bunlardan elde edilen insektisidal ürünler de kullanılmaya aday potansiyel ürünler olarak görülmektedir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler); ekstrasellüler matriks (ECM) ile bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Bu enzimler dokuların yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli bir rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiyogenez ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar. Dokuların yenilenmesinden veya patolojik durumlarda doku invazyonundan sorumlu matriks metalloproteinazlar biyolojik kontrolden kanser araştırmalarına kadar geniş bir çalışma alanına sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı biyolojik kontrol amacıyla yapılmış çalışmalar mevcuttur (Lepore vd., 1996; Ko vd., 2000; Harrison ve Bonning, 2001).

CIV genomunun tüm dizisi analiz edildiğinde matriks metalloproteinazlarla yüksek oranda homoloji gösteren iki gen kodladığı anlaşılmıştır (Jakob vd., 2001). Bu iki genden biri olan *136R* açık okuma zincirinde katalitik bölgenin yer aldığı kısım en yüksek benzerliği %58 oranında IIV-22 ve IIV-30 genomlarında yer alan metalloproteinazlarla göstermiştir. *165R* açık okuma zinciri ise %48'e varan oranda *Drosophila* cinsine ait türlerin sahip olduğu çinko bağlı metalloproteinazlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

CIV *136R* ve *165R* genleri biyoinformatik olarak analiz edildiklerinde aktif metalloproteinazların taşıdığı **HEXXH** bölgesine sahip oldukları görülmektedir. Bu durum bu genlerin de aktif metalloproteinaz olabileceklerini göstermektedir. Dolayısı ile bu çalışmada ilgi duyulan genler ilk olarak ökaryotik bir sistem olan Bakülovirüs ekspresyon

vektör sisteminde ifade edilmiştir. Bu sistemde üretilen proteinlerin aktivitesi, proteazlara özgü substratlar kullanılarak *in vitro* sistemde araştırılmıştır.

Matriks metalloproteinazlar sinyal dizileri içermektedirler. Ancak CIV genomunda bulunan MMP'lerde sinyal dizileri bulunmamaktadır. Aynı özelliği *Xestia c-nigrum* granulovirus metalloproteinazı da (XcGV-MMP) paylaşmaktadır. Enzimlerin sinyal ihtiva etmemeleri hücre dışına çıkmadıklarını, hücre içinde fonksiyonel olabileceklerini göstermektedir. Ayrıca, metalloproteinazların N-terminal ucundaki propeptid bölgesinde bulunabilen sistein rezidüsü [P-R-C-G-(V/N)-P-D (switch)] bu enzim grubunun inaktif formda kalmasında rol oynar. Sistein rezidüsü içerdiği sülfidril grubuyla katalitik bölgedeki çinkoya bağlanarak proMMP'lerin inaktif formda kalmalarına neden olur. Dolayısı ile bu proteazların *in vitro* sistemde aktivitesi için bu grubun yapıdan çıkartılması gerekir. Ancak diğer MMP'lerin aksine CIV'e ait matriks metalloproteinazların böyle bir rezidüye sahip olmamaları iki anlama gelir; (I) bu konsensus dizisi [P-R-C-G-(V/N)-P-D] tüm matriks metalloproteinazlarda sistein switch mekanizmasının çalışması için elzem değildir ve (II) CIV-MMP'leri aktivasyon işlemine gerek duymazlar. Aktivite deneyleri sırasında uygun tampon kullanıldığında elde edilen sonuçlar, aktivitelerinin düzenlenmesi için sistein switch kullanan diğer MMP'lerin aksine CIV-MMP'lerinin farklı bir şekilde regüle edildiklerini ortaya koyar (Ko vd., 2000). Sistein rezidüsü çıkarılmış BmNPV ile enfekte edilen larvaların yağ cisimcikleri ekstraktlarıyla yapılan Azocoll aktivite deneylerinde, kontrole yakın sonuçlar alınarak önemli bir proteinaz aktivitesi kaydedilememiştir (Ko vd., 2000). Benzer sonuçlar yine sistein rezidüsü çıkarılmış BmNPV ile enfekte edilen BmN-4 hücrelerinden elde edilen ekstraktlarla yapılan deneylerde de gözlenmiştir (Ohkawa vd., 1994).

Bakülovirüslerde tanımlanan ilk metalloproteinaz enhansindir. Enhansin, diğer metalloproteinazlarla katalitik aktivite bakımından ortak özelliğe sahip olsa da daha çok peritrofik matriksin parçalanmasında görev alarak NPV enfeksiyonlarının kolaylaştırılmasında görev alır (Gijzen vd., 1995). Bu yüzden enhansin Lepore ve arkadaşları (1996) tarafından diğer proteazlardan arındırılmış olarak test edilmiş ve bu çalışmada elde edilen sonuçları desteklemiştir. Toprak ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, metalloproteinaz grubuna dâhil olan enhansin proteininin *Mamestra configurata* NPV virulansındaki rolü araştırılmıştır. Böcek bağırsağında bulunan membranlar üzerindeki yıkıcı etkisi SDS-PAGE analizleriyle tespit edilerek ortaya koyulmuştur.

Yapılan bir diğer çalışmada Ko ve arkadaşlarının (2000) XcGV'e ait olan ve insan stromelizin-1 proteazı (MMP-3) ve denizkestanesinin yumurtadan çıkmasını sağlayan proteaza %30'dan fazla dizi benzerliği gösteren metalloproteinazının yapısal ve fonksiyonel analizini araştırmışlar. Aktivite araştırmasında Azocoll kullanmışlar ve genin aktif bir metalloproteinaz kodladığını belirlemişlerdir. Ayrıca rekombinant virüsü kullanarak böcek üzerinde yaptıkları bioassay çalışmalarında rekombinant virüsün böcek ölüm oranını artırdığını belirlemişlerdir.

Bu çalışmada da Azocoll (Chavira vd., 1984) ve Azo-casein (Charney ve Tomarelli, 1947) substratları kullanılmıştır. Bu substratlar üretici firmaların önerilerine uyularak hazırlanmışlardır. Elde edilen sonuçlar kontroller ile karşılaştırıldığında CIV *136R* ve *165R* genlerine ait proteinlerin kullanılan substratlar üzerinde etkili olduğunu, dolayısı ile böcek bazal membran yapısı üzerinde de etkili olma potansiyeline sahip olacağını göstermektedir.

Azocoll kullanılarak yapılan proteinaz aktivite deneyleri sırasında şelatlayıcı ajanların (EDTA) kullanılması aktiviteyi önemli ölçüde düşürmüştür. Bu bize enzimlerin gerçekten metalloproteinaz enzim grubuna dâhil olduklarını ve CIV-MMP'nin enzimatik aktivitesinde kofaktör olarak görev alan metal (ler) iyonlarının (Ca^{+2} , Zn^{+2}) şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe edildiklerini gösterir.

Yapılan aktivite çalışmaları sırasında metalloproteinazların optimum katalitik aktiviteleri Azocoll ile yapılan testlerde pH 8.0'de ve 37 °C'de, Azo-casein'le yapılan testlerde ise pH 7.6 ve 37 °C'de olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar virüsler bu tip enzimleri *in vivo* olarak, bazik pH ve yaklaşık 28 °C olan böcek bağırsağındaki enfeksiyon sürecinde aktif olarak kullanıyor olsalar da *in vitro* ortamda en iyi etki gösterdikleri şartlar biraz farklılık göstermiş olabilir. Çünkü bu çalışmada varılmak istenen sonuç, bu proteazların bazal membranın da yapısında bulunan ve böcekleri dış etmenlerden koruyan çok sayıda yapısal proteinleri parçalayıcı özelliklerinin ortaya çıkarılmasıdır.

Çalışmanın ileriye götürülmesi durumunda bu proteinlerin böcek larvaları üzerindeki etkilerinin araştırılması uygun olacaktır. Böylece amacımıza uygun şekilde çalışmanın neticesini görmek mümkün olabilecektir.

Böcek uygulamalarındaki metalloproteinaz proteinlerinin oluşturacağı etkinliğe bağlı olarak bu genlerin böcekte böceğe geçebilme yetisindeki orijinal *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (*AcNPV*) genomuna yerleştirilmesi planlanabilir. Böylece biyolojik mücadelede kullanılacak bir virüs elde edilmiş olur.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Chilo* iridescent virüs (CIV)'e ait *136R* ve *165R* genlerinin klonlanması, ekspresyonu ve proteinlerinin enzim aktivitesi çalışmaları yapılmıştır. Sonuçları maddeler halinde sıralayacak olursak;

1- *136R* ve *165R* genleri, dizayn edilen primerler yardımıyla çoğaltıldı ve pGEMT Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlandıkları vektördeki baz dizilimleri doğrulandı.

2- Genler bakülovirüs ekspresyon vektör sistemine aktarılmak üzere ara transfer vektörleri olan pFastBacHT'ye klonlandılar ve transpozisyon ile bakmid genomuna dâhil edildiler.

3- Bakmid DNA'lar hücre kültürü ortamında, *Spodoptera frugiperda* 9 hücrelerine virüs oluşturulması amacı ile transfekte edildiler. Oluşan virüsler çoğaltıldı ve klonlanan genlere ait proteinlerin geniş çaplı üretimleri gerçekleştirildi.

4- Proteinlerin SDS-PAGE analizi sonucunda *136R* genine ait protein büyüklüğünün yaklaşık 24 kDa, *165R* genine ait protein büyüklüğünün de yaklaşık 34 kDa olduğu gözlemlendi. Bu ağırlıklar DNA dizisinden beklenen büyüklükle uyumludur.

5- Proteinlerin varlığı Western analizi ile doğrulandı.

6- Elde edilen bu proteinlerin enzim aktiviteleri araştırıldı. Enzim aktivitesini tespit etmek amacıyla Azo-casein ve Azocoll kullanıldı.

7- Azo-casein için optimum pH'nın 7.6, Azocoll için ise 8.0 olduğu bulundu. Çalışma sıcaklıkları ise 37 °C olarak belirlendi.

6. ÖNERİLER

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal insektisitlere en iyi alternatif biyoinsektisitlerdir. Bu anlamda biyolojik mücadele için en çok kullanılan mikroorganizma gruplarından biri de viral ajanlardır.

Yıllardan beri entomopatojenik mikroorganizmalar üzerinde çalışmalar yapılarak tarım alanlarında ve ormanlarda zarara yol açan böcekler etkisiz hâle getirilmeye çalışılmıştır. Bu anlamda viral ajanların böcekler üzerindeki etkisini artırmak için kullanılacak ajanların genlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada *Chilo* iridescent virüs (CIV) genomunda bulunan *matriks metalloproteinaz* genleri çalışılmış olup, protein ekspresyonları bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde gerçekleştirilmiştir. Gen bölgeleri ekspresyon vektörleri kullanılarak polihedrin promotörü kontrolü altında polihedrin geni yerine ekspres edildikleri için çoğalan virüsler PIB yapısı oluşturmamıştır. Dolayısıyla bu genler biyolojik mücadelede kullanılacak olan bakülovirüs genomuna polihedrin geniyle birlikte klonlanırsa viral ajanın doğal ortamda yatay yayılımı göstermesi sağlanarak etkinliği artırılabilir. Yine aynı şekilde kitinaz benzeri protein parçalayıcı özellikteki enzim gruplarıyla füzyon hâlinde sentezlenirlerse daha etkin biyolojik kontrol ajanları elde edilebilir veya CIV'ye polihedrin geni eklenerek doğal koşullara daha dayanıklı viral etmenler kazanılmış olur. Bunun dışında elde edilen bu ürünlerin aktivitelerinin yanında böcek larvaları üzerindeki etkinliğini de görmek üzere hem proteazlar hem de rekombinant bakülovirüsler böcek larvalarına enjekte edilerek biyoassay deneyleri kurulabilir.

7. KAYNAKLAR

- Bigot, Y., Pie'gu, B., Casteret, S., Gavory, F., Bideshi, D.K. ve Federici, B.A., 2013. Characteristics of inteins in invertebrate iridoviruses and factors controlling insertion in their viral hosts, Mol Phylogenet Evol, 67, 246–254.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X. ve Stocker, W., 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins, FEBS Lett., 331, 134-140.
- Bourboulia, D. ve Stetler-Stevenson, W.G., 2010. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion, Semin Cancer Biol., 20, 3, 161–168.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Braunwald, J., Nonnenmacher, H. ve Tripiet-Darcy, F., 1985. Ultrastructural and biochemical study of frog virus 3 uptake by BHK-21 cells, Journal of General Virology, 66, 283-293.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1980. Inhibition of Macromolecular Synthesis in Cells Infected with an Invertebrate Virus (Iridovirus Type 6 or CIV), Arch. Virol., 63, 297-303.
- Cerutti, M., Guerillon, J., Arella, M. ve Devauchelle, G., 1981. Replication of Type 6 Iridovirus in Various Cell Lines, C. R. Seances Acad. Sci., 292, 797-802.
- Charney, J. ve Tomarelli, R.M.A., 1947. Colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, J Biol Chem., 171, 501-505.
- Chavira, R., Burnett, Jr., T.J. ve Hageman, J.H., 1984. Assaying proteinases with azocoll, Anal. Biochem., 136, 446–450.
- Chinchar, V.G., Yu, K.H. ve Jancovich, J.K., 2011. The Molecular Biology of Frog Virus 3 and other Iridoviruses Infecting Cold-Blooded Vertebrates, Viruses, 3, 1959-1985.
- Chitnis, N.S., D'Costa, S.M., Paul, E.R. ve Bilimoria, S.L., 2008. Modulation of iridovirus-induced apoptosis by endocytosis, early expression, JNK, and apical caspase, Virology, 370, 333-342.

- Chitnis, N.S., Paul, E.R., Lawrence, P.K., Henderson, C.W., Ganapathy, S., Taylor, P.V., Viridi, K.S., D'Costa, S.M., May, A.R. ve Bilimoria, S.L., 2011. A virion-associated protein kinase induces apoptosis, J Virol., 85, 24, 13144-13152.
- D'Costa, S.M., Yao, H. ve Bilimoria, S.L., 2001. Transcription and temporal cascade in *Chilo* iridescent virus infected cells, Arch Virol., 146, 2165–2178.
- D'Costa, S.M., Yao, H.J. ve Bilimoria, S.L., 2004. Transcriptional mapping in *Chilo* iridescent virus infections, Arch Virol., 149, 723–742.
- D'Costa S.M., Vigerust, D.J., Perales-Hull, M.R., Lodhi, S.A., Viravathana, P. ve Bilimoria, S.L., 2012. First complete and productive cell culture model for members of the genus *Iridovirus*, Arch Virol., 157, 2171–2178.
- Darai, G., Anders, K., Koch, H.G., Delius, H., Gelderblom, H., Samalecos, C. ve Flügel, R.M., 1983. Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumors of pleuronectes, Virology, 126, 466-479.
- Darai, G., Delius, H., Clarke, J., Apfel, H., Schnitzler, P. ve Flügel, R.M., 1985. Molecular cloning and physical mapping of the genome of fish lymphocystis disease virus, Virology, 146, 292-301.
- Darai, G., 1990. Molecular biology of iridoviruses, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Delius, H., Darai, G. ve Flügel, 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. ve Demirbağ, Z., 2008. Böcek Virüslerinin Biyoteknolojik Önemi, Tarım Bilimleri Dergisi, 14, 193-201.
- Dizman, Y.A., Demirbağ, Z., İnce, I.A. ve Nalçacıoğlu, R., 2012. Transcriptomic analysis of *Chilo* iridescent virus immediate early promoter, Virus Res 167, 353–357.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H. ve Darai, G., 1988a. Identification and Characterization of the Repetitive DNA Element in the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6, Virology, 167, 485-496.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J., Rössen-Wolff, A., Delius, H. ve Darai, G., 1988b. DNA Nucleotide Sequence Analysis of the *PvuII* DNA Fragment L of the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6 Reveals a Complex Cluster of Multiple Tandem, Overlapping, and Interdigitated Repetitive DNA Elements, Virology, 167, 497–506.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H., Rösen-Wolff, A. ve Darai, G., 1990. Molecular biology of insect iridescent virus, In Molecular Biology of Iridoviruses, 10, 47-80.

- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A *Chilo* Iridescent Virus (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), Appl. Entomol. Zool., 1, 69–72.
- Gijzen, M., Roelvink, P. ve Granados, R.R., 1995. Characterization of viral enhancing activity from *Trichoplusia ni* granulosis virus, J. Invertebr. Pathol., 65, 289–294.
- Goorha, R. ve Murti, K.G., 1982. The Genome of Frog Virus 3, An Animal DNA Virus is Circularly Permuted and Terminally Redundant, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 248–252.
- Handermann, M., Schnitzler, P., Rosen-Wolff, A., Raab, K., Sonntag, K.C. ve Darai, G., 1992. Identification and Mapping of Origins of DNA Replication within the DNA Sequences of the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6, Virus Genes, 6, 19–32.
- Harrison, R.L. ve Bonning, B.C., 2001. Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses, Biol. Control, 20, 199–209.
- Harrison, R.L. ve Bonning, B.C., 2010. Proteases as insecticidal agents, Toxins, 2, 935–953.
- Hasemomn, C.A. ve Capra, J.D., 1990. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 3942–3946.
- Hernandez, O., Maldonado, G. ve Williams, T., 2000. An Epizootic of Patient Iridescent Virus Disease in Multiple Species of Blackflies in Chiapas, Mexico, Med. Vet. Entomol., 14, 458–462.
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F. Evans, H.F. ve Crook, N.E., 1998. *Insect Viruses and Pest Management*, John Wiley & Sons, Chichester.
- İnce, I.A., Westenberg, M., Vlak, J.M., Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R. ve van Oers, M.M., 2008. Open reading frame 193R of *Chilo* iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP), Virology, 376, 124–131.
- İnce, I.A., Boeren, S.A., van Oers, M.M., Vervoort, J.J.M. ve Vlak, J.M., 2010. Proteomic analysis of *Chilo* iridescent virus, Virology, 405, 253–258.
- İnce, I.A., Özcan, K., Vlak, J.M. ve van Oers, M.M., 2013. Temporal classification and mapping of non-polyadenylated transcripts of an invertebrate iridovirus, Journal of General Virology, 94, 187–192.
- Jakob, N.J., Muller K., Bahr, U. ve 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, 182–196.

- Jiang, W. ve Bond, J.S., 1992. Families of metalloendopeptidases and their relationships, FEBS Lett. 312, 110-114.
- Kleespies, R.G., Tidona, C.A. ve Darai, G., 1999. Characterization of a New Iridovirus Isolated from Crickets and Investigations on the Host Range, J. Invertebr. Pathol., 73, 84-90.
- Ko, R., Okano, K. ve Maeda, S., 2000. Structural and Functional Analysis of the *Xestia c-nigrum* Granulovirus Matrix Metalloproteinase, Journal of Virology, 74, 11240-11246.
- Laemmli, U.K. 1976. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lepore, L.S., Roelvink, P.R. ve Granados, R.R., 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease, J. Invertebr. Pathol. 68, 131-140.
- Liu, S., Li, H., Sivakumar, S. ve Bonning, B.C., 2006. Virus-derived genes for insect resistant transgenic plants, Advances in Virus Research, 68, 427-457.
- Luckow, V.A. ve Summers, M.D., 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors, Bio/Tech, 6, 47-55.
- Maeda, S., Dean, D.D., Sylvania, V.L., Boyan, B.D. ve Schwartz, Z., 2001. Metalloproteinase activity in growth plate chondrocyte cultures is regulated by 1,25 (OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ and mediated through protein kinase C, Matrix Biol. 20, 87-97.
- Marina, C.F., Arredondo-Jiménez, J.I., Castillo, A. ve Williams, T., 1999. Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito, Oecologia 119, 383-388.
- Martens, J.W.M., Honee, G., Zuidema, D., van Lent, J.W.M., Visser, B. ve Vlak, J.M., 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2764-2770.
- McIntosh, A.H. ve Grasela, J.J., 1994. Specificity of baculoviruses, Insect Cell Biotechnology, CRC Press, Boca Raton.
- Nalçacıoğlu, R., Marks, H., Vlak, J.M., Demirbağ, Z. ve van Oers, M.M., 2003. Promoter analysis of the *Chilo* iridescent virus DNA polymerase and major capsid protein genes, Virology, 317, 321-329.
- Nalçacıoğlu, R., İnce, I.A., Vlak, J.M., Demirbağ, Z. ve van Oers, M.M., 2007. The *Chilo* iridescent virus DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif, J Gen Virol, 88, 2488-2494.

- Ohkawa, T., Majima, K. ve Maeda, S., 1994. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, J. Virol. 68, 6619– 6625.
- Paul, E.R., Chitnis, N.S., Henderson, C.W., Kaul, R.J., D’Costa, S.M. ve Bilimoria, S. L., 2007. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract, Arch Virol, 152, 1353–1364.
- Pennock, G.D., Shoemaker, C. ve Miller, L.K., 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector, Mol. Cell. Biol., 4, 399-406.
- Pie’gu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D.K., Federici, B.A. ve Bigot, Y., 2013. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV-25 isolated from a blackfly larva, Arch Virol, DOI 10.1007/s00705-013-1918-x
- Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L. ve Edwards, D.R., 2005. The ADAMTS metalloproteinases, Biochem. J., 386, 15–27.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Mohini, S.G. ve Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 597.
- Reddy, J.T. ve Locke, M., 1990. The size limited penetration of gold particles through insect basal lamina, J. Insect Physiol. 36, 397-407.
- Schnitzler, P., Soltau, J.B., Fischer, M., Reisner, H., Scholz, J., Delius, H. ve Darai, G., 1987. Molecular Cloning and Physical Mapping of the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6: Further Evidence for Circular Permutation of the Viral Genome, Virology, 160, 66-74.
- Schnitzler, P., Rösen-Wolff, A. ve Darai, G., 1990. Molecular biology of fish lymphocystis disease virus, In Molecular Biology of Iridoviruses, 203-234.
- Schnitzler, P., Sonntag, K.C., Muller, M., Janssen, W., Bugert, J.J., Koonin, E.V. ve Darai, G., 1994. Insect Iridescent Virus Type 6 Encodes a Polypeptide Related to the Largest Subunit of Eukaryotic RNA Polymerase II, J. Gen. Virol., 75, 1557-1567.
- Smith, G.E., Summers, M.D. ve Fraser, M.J., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, Mol. Cell. Biol., 12, 2156-2165.
- Soltau, J.B., Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J. ve Darai, G., 1987. Characterization of the genome of insect iridescent virus type 6 by physical mapping, Journal of General Virology, 68, 2717-2722.
- Sonntag, K.C. ve Darai, G., 1992. Characterization of the third origin of DNA replication of the genome of insect iridescent virus type 6, Virus Genes, 6, 333-342.

- Stohwasser, R., Raab, K., Schnitzler, P., Janssen, W. ve Darai, G., 1993. Identification of the Gene Encoding the Major Capsid Protein of Insect Iridescent Virus Type 6 by Polymerase Chain Reaction, J. Gen. Virol., 74, 873-879.
- Summers, M.D., 2006. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector system and viral pesticides, Adv. Virus Res., 68, 3-73.
- Tidona, C.A. ve Darai, G., 1997. The Complete DNA Sequence of Lymphocystis Disease Virus, Virology, 230, 207–216.
- Timpl, R. ve Brown, J.C., 1996. Supramolecular assembly of basement membranes, Bioessays., 18, 2, 123-32.
- Toprak, U., Harris, S., Baldwin, D., Theilmann, D., Gillot, C., Hegedus, D.D. ve Erlandson M.A., 2012. Role of enhancin in *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus virulence: selective degradation of host peritrophic matrix proteins, J Gen Virol., 93, 744-53.
- Tripier-Darcy, F., Nermut, M.V., Braunwald, J. ve Williams, L.D., 1984. The organization of FV3 as revealed by freeze-etching, Virology, 138, 287-299.
- URL_1 <http://www.trevorwilliams.info/Iridovirus.htm>, 28 Nisan 2014
- URL_2 http://viralzone.expasy.org/all_by_species/19.html, 15 Nisan 2014
- Vlak, J.M. ve Keus, F.J.A., 1990. Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines. *Viral Vaccines, Advances in Biotechnological Processes*, Wiley-Liss, New York.
- Ward, V.K., ve Kalmakoff, J., 1987. Physical mapping of the DNA genome of insect iridescent virus type 9 from *Wiseana* spp. larvae, Virology, 160, 507.
- Williams, T., 1998. Invertebrate iridescent viruses. In: *The Insect Viruses* (Eds. Miller L. & Ball A.) Plenum Press, New York.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V.G., 2005. A decade of advances in iridovirus research, Adv. Virus Res., 65, 173–248.
- Williams, T., 2008. Iridoviruses of invertebrates. In: *Encyclopedia of Virology* (Third edition). B.W.J. Mahy & M.H.V. Van Regenmortel (Eds.), Elsevier, Oxford, UK.
- Williams, T. ve Ward, V.K., 2010. *Insect Virology*, Sassan Asgari ve Karyn Johnson Ed., Caister Academic Press, Australia.
- Willis, D.B., Foglesong, D. ve Granoff, A., 1984. Nucleotide sequence of an immediate-early frog virus 3 gene, J Virol, 52, 905–912.

- Yin, J., Li, G., Ren, X. ve Herler, G., 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, J. Biotech., 127, 335-347.
- Zhao, X.F., Wang, J.X. ve Wang, Y.C.,1998. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*, Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 259–264.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu 1995–2003 yılları arasında Oymalıtepe İlköğretim Okulu'nda, liseyi 2003–2006 yıllarında Özdil Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. 2006–2007 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve hâlen burada öğrencidir. Yabancı dili İngilizce'dir.