

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO IRIDESCENT* VİRÜS 458R AÇIK OKUMA ZİNCİRİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla AKSU

HAZİRAN 2017
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Chilo Iridescent* Virüs 458R Açık Okuma Zincirinin Moleküler Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “yüksek lisans” tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez süresince yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını, ilgisini ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin yönlendirilmesine değerli katkılar sağlayan ve yardımcı olan sayın hocalarım Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na ve Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, çalışmalarım süresince benden hoşgörülerini esirgemeyen hocalarım sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR ve Prof. Dr. Kazım SEZEN’e tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Hem lisansüstü eğitim sürecine alışmamda, hem de laboratuvar çalışmalarında sabır ve alakayla yanımda bulunan ve yardımlarını esirgemeyen Aydın YEŞİLYURT’a, Dr. Mehtap DANIŞMAZOĞLU’na, Dr. Cihan İNAN’a, mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma, tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince gerçekleştirdiğim çalışmalara FYL-2016-5708 numaralı proje kapsamındaki desteğinden dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (KTÜ BAP)’ne teşekkür ediyorum.

Hayatımın tüm alanlarında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de maddi ve manevi olarak yanımda olan en değerli varlıklarım babama ve anneme, diğer yarım ablama, muhterem dedeme, en güzel öğreticim babaanneme, hepsi ayrı ayrı önemli olan aile dostlarımıza ve hayatımın önemli dönemlerinde hep yanımda olan gerçek dostum Özgür KÜZ’e en derin duygularıyla saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Çağla AKSU

Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chilo* İridescent Virüs 458R Açık Okuma Zincirinin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 19/06/2017

Çağla AKSU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Iridoviridae</i> Familyasının Genel Özellikleri.....	1
1.2.1. İridoviridlerin Yapı ve Kompozisyonu	5
1.2.2. <i>Iridoviridae</i> Familyasının Genom Özellikleri, Virüsün Hücreye Girişi ve DNA Replikasyonu	7
1.3. <i>Iridovirus</i> Cinsi	10
1.3.1. <i>Chilo</i> Iridescent Virüs	11
1.3.2. <i>Chilo</i> Iridescent Virüs'te Transkripsiyonel Düzenlenme.....	13
1.4. Miristilasyon	15
1.5. Çalışmanın Amacı.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	17
2.1. Virüs ve Konak	17
2.2. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyonunun Tayini	17
2.3. 458R ORF'sinin Biyoinformatik Analizi.....	18
2.4. Çalışmalarda Kullanılan Primerler	18
2.5. CIV 458R Geninin Transkripsiyonel Analizi	19
2.5.1. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi	20
2.5.1.1. Hücrelerin Enfeksiyonu ve RNA İzolasyonu.....	20
2.5.1.2. 458R Geninin cDNA'sının Oluşturulması.....	22
2.5.2. Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi.....	23
2.5.2.1 Hücrelerin Enfeksiyonu ve RNA İzolasyonu.....	23

2.5.2.2	458R Genine Ait cDNA'nın Oluşturulması.....	23
2.6.	458R Geninin 3' Ucunun Belirlenmesi	25
2.6.1.	Genin 3' Ucunu İçeren cDNA'nın Oluşturulması.....	25
2.6.1.1.	Genin 3' Ucunu İçeren cDNA'nın pJET1.2 Vektörüne Klonlanması.....	26
2.6.1.1.1.	Kompetent E. coli DH10 β Hücrelerinin Oluşturulması.....	26
2.6.1.1.2.	Klonlama ve DNA Dizi Analizi.....	26
2.7.	458R Geninin 5' Ucunun Belirlenmesi	28
3.	BULGULAR	31
3.1.	Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyon Tayini	31
3.2.	458R Açık Okuma Zincirinin Biyoinformatik Analizi	32
3.3.	CIV 458R Geninin Transkripsiyonel Analizi	35
3.3.1.	Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi	35
3.3.1.1.	RNA İzolasyonu.....	35
3.3.1.2.	Genin Transkripsiyon Sınıfını Belirlemek İçin cDNA Oluşturulması.....	35
3.3.2.	Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi.....	36
3.3.2.1.	RNA İzolasyonu.....	36
3.3.2.2.	Genin Transkripsiyon Zamanını Belirlemek İçin cDNA Oluşturulması	37
3.4.	458R Geni mRNA'sının 3' Ucunun Belirlenmesi	38
3.5.	458R Geni mRNA'sının 5' Ucunun Belirlenmesi	39
4.	TARTIŞMA.....	42
5.	SONUÇLAR.....	48
6.	ÖNERİLER	50
7.	KAYNAKLAR.....	51

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VİRÜS 458R AÇIK OKUMA ZİNCİRİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Çağla AKSU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2017, 58 sayfa

Chilo iridescent virüs (CIV), *Iridoviridae* familyasının *Iridovirus* cinsine ait biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyeline sahip bir böcek virüsüdür. Ayrıca, aşı geliştirme ve teröpatik ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir.. Virüsün bu alanlarda verimli şekilde kullanımını ise moleküler olarak aydınlatılması ile gerçekleştirilebilir. Bu tez kapsamında yapılan biyoinformatik analizler ve literatür araştırması sonucunda, CIV 458R geninin virüsün hücreye tutunma, hücreye giriş, viral replikasyon ve/veya viriyon inşası süreçlerinden biri ya da birkaçında görev yapıyor olabileceği düşünülmüştür. Genin fonksiyonel analizine yönelik planlanan çalışmalara temel oluşturması bakımından bu tezde ilk adım olarak 458R'nin transkripsiyonel analizi yapıldı, genin transkripsiyonu sonucu oluşan mRNA'nın translasyon olmayan uç bölgeleri belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda, 458R'nin *geç gen* olduğu ve enfeksiyonu takiben 12 ila 24. saatler arasında transkripsiyonun başladığı belirlendi. mRNA'nın başlangıç kodonunun hemen yukarısındaki 53 nükleotidlik kısmın 5', stop kodonunun hemen aşağısındaki 40 nükleotidlik kısmın ise 3' translasyon olmayan bölgeleri oluşturduğu tespit edildi. Bu çalışmada, CIV enfeksiyonunda ve/veya yeni viriyon oluşumunda görevli olması muhtemel bir açık okuma zincirinin transkripsiyonel analizi yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Chilo* iridescent virüs, CIV, 5' UTR, 3' UTR, Transkripsiyonel analiz

Master Thesis

SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CHILO* IRIDESCENT VIRUS 458R OPEN
READING FRAME

Çağla AKSU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2017, 58 pages

Chilo iridescent virus (CIV), belongs to genus *Iridovirus* of family *Iridoviridae*, is an insect virus possessing potential use as biocontrol agent. Also, this virus has potential to be utilized for vaccine development and therapeutic purposes. Efficient utilization of the virus for these purposes can be possible by analyzing the virus at molecular level. As a result of the bioinformatics analysis and literature research performed within the scope of this thesis, it is thought that 458R gene encoded by CIV may be playing role in one or more steps such as attachment, entering to the cell, viral replication and/or virion assemble process. For functional analysis of the gene, the transcriptional analysis of 458R and determination of the untranslated regions of synthesized mRNA were determined in this thesis. In a consequence of these study, it was determined that 458R is a *late gene* and transcription of the gene is started between 12 and 24. hours post infection. It was determined that 5' untranslated region is located at the 53 nucleotides upstream of start codon of mRNA and 3' untranslated region is located at the 40 nucleotides downstream of stop codon of mRNA. In this study, transcriptional analysis of an open reading frame, playing a role in CIV infection and/or new virion formation, was carried out.

Key Words: *Chilo* iridescent virus, CIV, 5' UTR, 3' UTR, Transcriptional analysis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	<i>Iridoviridae</i> familyası üyelerinin filogenetik analizi.....	3
Şekil 2.	İridovirüslerin kapsid simetrisinin ve içyapısının şematik gösterimi.....	6
Şekil 3.	<i>Chilo</i> iridescent virüs (CIV) ile enfekte olmuş hücrelerin ve meyve sineklerinin görünümü.....	7
Şekil 4.	İridoviridlerde hacim bağımlı (headful) DNA paketlenme mekanizması, halkasal permütasyon ve dizi tekrarlarının (terminal redundancy) şematik gösterimi.....	8
Şekil 5.	<i>Frog virus-3</i> (FV-3)'ün hayat döngüsünün şematik gösterimi.....	9
Şekil 6.	İridovirüs ile enfekte olmuş <i>Galleria mellonella</i> larvaları.....	11
Şekil 7.	458R geninin transkripsiyon sınıfının belirlenmesi.....	21
Şekil 8.	LACE yönteminin şematik görünümü.....	25
Şekil 9.	RACE yönteminin şematik gösterimi.....	28
Şekil 10.	<i>Anthonomus grandis</i> hücrelerinin (BRL-AG-3A) <i>Chilo</i> iridescent virüs (CIV) ile enfeksiyonu.....	31
Şekil 11.	EPDA yöntemiyle virüs konsantrasyonunun belirlenmesi.....	32
Şekil 12.	458R açık okuma zincirinin pBLAST analizi.....	33
Şekil 13.	458R'nin transmembran domein içeriği.....	34
Şekil 14.	458R amino asit dizisinin içerdiği özel bölgeler ve domeinler.....	34
Şekil 15.	CIV 458R geninin transkripsiyon sınıfı.....	36
Şekil 16.	CIV 458R geninin transkripsiyon zamanı.....	38
Şekil 17.	CIV 458R geninin 3' ucunu belirlemek için 36. saate ait mRNA'dan oluşturulan cDNA.....	38
Şekil 18.	pJET1.2 ara vektöre klonlanan CIV 458R cDNA 3' uç örneklerinin <i>Bgl</i> II restriksiyon enzimi ile kesimi.....	39
Şekil 19.	458R mRNA 3' bölgesinin dizisi.....	39
Şekil 20.	CIV 458R geninin 5' ucuna ait oluşturulan cDNA'lar.....	40
Şekil 21.	pJET1.2 ara vektöre klonlanan CIV 458R cDNA 5' uç örneklerinin <i>Bgl</i> II restriksiyon enzimi ile kesimi.....	40
Şekil 22.	458R mRNA 5' bölgesinin dizisi.....	41
Şekil 23.	458R geninin anatomik yapısı.....	49

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Iridoviridae</i> familyasına mensup cinsler, konakları ve tip türleri.....	2
Tablo 2. Genom analizi yapılmış olan <i>Iridoviridae</i> familyası üyeleri	4
Tablo 3. <i>Iridovirus</i> cinsine ait türler	10
Tablo 4. DNA ve protein sentezi inhibitörleri varlığında genlerin ifade edilme durumları	14
Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan primerler	19
Tablo 6. Gen ifade sınıfını belirlemek için izole edilen toplam RNA örnekleri	35
Tablo 7. Gen ifade zamanını belirlemek için izole edilen RNA örnekleri	37

SEMBOLLER DİZİNİ

Ara-C	: Sitozin arabinosid
APH	: Afidikolin
ASFV	: <i>African swine fever virus</i>
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATV	: <i>Ambystoma tigrinum virus</i>
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albümin
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
CHX	: Siklohegzimid
CIV	: <i>Chilo iridescent virus</i>
CPV	: Sitoplazmik polihedrovirüsler
DE	: Gecikmiş erken (gen)
dH ₂ O	: Damıtılmış su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
DTT	: Ditiyotretol
EHNV	: <i>Epizootic haematopoietic necrosis virüs</i>
EPDA	: Son nokta seyreltme metodu
EPV	: Entomopoxvirüsler
ESV	: <i>European sheatfish ranavirus</i>
FBS	: Fetal bovin serum
FSB	: Dondurarak saklama tamponu
FV-3	: <i>Frog virus 3</i>
FW	: İleri (primer)
GIV	: <i>Grouper iridovirus</i>
HIV-1	: İnsan bağışıklık yetersizliği virüsü 1
IBS	: Biyolojik dizilerin tanımlayıcısı (yazılım)
ICTV	: Virüs taksonomisi uluslararası komitesi
IE	: En erken (gen)

IFN- β	: İnterferon- β
IIV	: <i>Invertebrate iridescent virus</i>
ISKNV	: <i>Infectious spleen ve kidney necrosis virus</i>
kDa	: Kilodalton
KUNV	: Kunjin virüs
L	: Geç (gen)
LACE	: cDNA uçlarının ligasyon temelli çoğaltılması
LB	: Luria Bertani
LCDV-1	: <i>Lymphocystis disease virus 1</i>
LCDV-C	: <i>Lymphocystis disease virus</i> -Çin izolatu
M	: Molar
MCP	: Major kapsit protein
MEF	: Fare embriyonik fibroblastları
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
μ g	: Mikrogram
μ M	: Mikromolar
μ l	: Mikrolitre
MOI	: Hücre başına düşen virüs miktarı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NCBI	: Uluslararası biyoteknoloji bilgi merkezi
NCLDV	: Nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri
nm	: Nanometre
NMT	: N-miristoltransferaz
NPV	: Nükleopolihedrovirüsler
OD	: Optik yoğunluk
ORF	: Açık okuma zinciri
OSGIV	: <i>Orange spotted grouper iridovirus</i>
PAA	: Fosfonoasetik asit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pfu	: Plak oluşturucu birim
pH	: H iyon konsantrasyonu

qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RACE	: cDNA uçlarının rastgele çoğaltılması
RBIV	: <i>Rock bream iridovirus</i>
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Devir sayısı
RV	: Geri (primer)
SGIV	: <i>Singapore grouper iridovirus</i>
STIV	: <i>Soft-shelled turtle iridovirus</i>
TFV	: <i>Tiger frog virus</i>
TM	: Transmembran
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör- α
TRBIV	: <i>Turbot reddish body iridovirus</i>
U	: Ünite
UTR	: Translasyona uğramayan bölge
UV	: Ultraviyole
VSV	: Vesiküler stomatitis virüs
vd.	: ve diğerleri

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İridovirid, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından herhangi bir Ordo'ya yerleştirilmemiş olan *Iridoviridae* familyası virüslerine verilen genel addır (Chinchar vd., 2017). Bu familya, böcekler ve ekonomik öneme sahip sucul kültürü yapılan hayvanlar üzerinde hastalık oluşturan türler içermektedir. Dünyanın farklı yerlerinde çalışılan *Iridovirus* bu familyanın önemli bir cinsidir. *Chilo iridescent* virüs (CIV) ise ICTV'nin kabul ettiği bu cinse ait iki türden biridir. *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6) olarak da bilinen CIV aynı zamanda bu cinsin tip türüdür (Jancovich vd., 2012).

Chilo iridescent virüs zirai açıdan birçok böcekte ölümcül veya ölümcül olmayan enfeksiyonlara sebep olması bakımından biyokontrol materyali olma potansiyeline sahiptir (Jakob vd., 2001). Ayrıca fare embriyonik hücrelerinin CIV ile enfekte edilmesi sonucunda oluşan immün yanıt sayesinde bazı virüslerin replikasyonunda azalma gözlenmiş ve bu bakımdan çalışma neticesinde CIV temelli aşı ve terapötik çalışmaların önü açılmıştır (Ahler vd., 2016). Bunun yanı sıra böcek virüslerinin gen terapi (Merrihew vd., 2001; Stanbridge vd., 2003) veya gen ifade vektörü (Anderson vd., 1996; Ciccarone vd., 1997) olarak kullanılabilmesi hususunda önemli çalışmalar yürütülmektedir.

Virüsün biyokontrol materyali veya vektör olarak kullanımı konusunda sahip olduğu potansiyelin biyoteknolojik ürünlere dönüşümü, moleküler yapı ve mekanizmalarının bilinmesiyle mümkündür. Bu çalışmada CIV genomunda bulunan ve kodladığı ürünün virüs replikasyonunda önemli rol oynadığı düşünülen 458R açık okuma zincirinin moleküler yapısı ve transkripsiyon özellikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

1.2. *Iridoviridae* Familyasının Genel Özellikleri

Iridoviridae soğukkanlı omurgalıları, kabuklular (Crustacea alt familyası üyeleri) ve yumuşakçalar (Mollusca familyası üyeleri) (Gregory vd., 2006) dahil çeşitli omurgasızları enfekte eden türlere sahip bir virüs familyasıdır (Williams vd., 2005). Bu familya; omurgalıları enfekte eden *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* ve *Ranavirus* cinslerinin

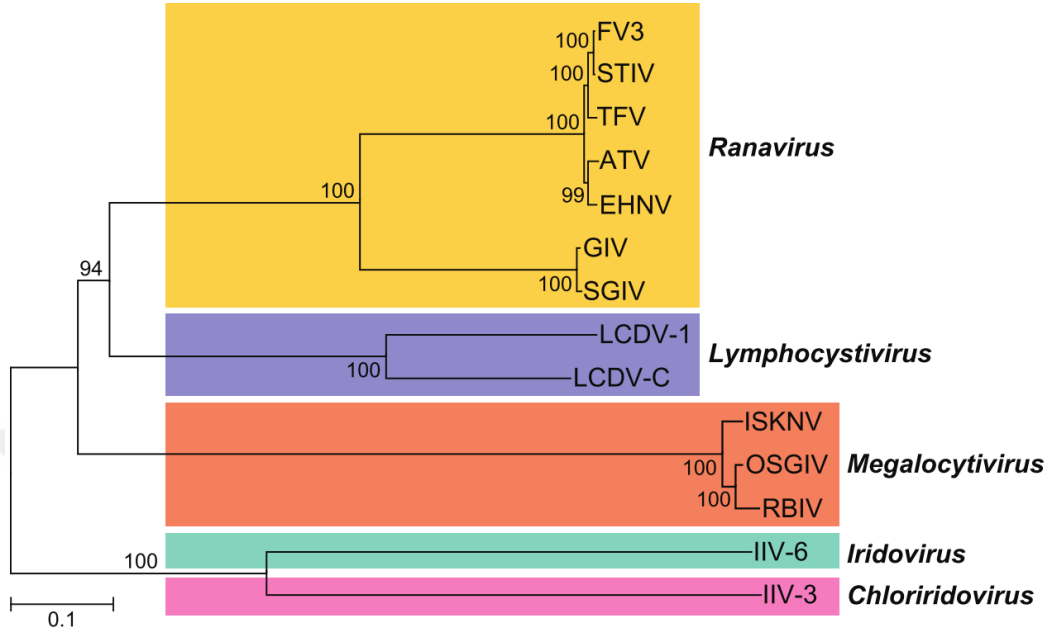
bulunduğu *Alphairidovirinae*, omurgasızları enfekte eden *Chloriridovirus* ve *Iridovirus* cinslerinin bulunduğu *Betairidovirinae*, olmak üzere iki alt familyadan oluşmaktadır (Chinchar vd., 2017) (Şekil 1) (Williams vd., 2000). Tablo 1’de her bir familyanın tip türü ve enfeksiyon yaptığı konaklar gösterilmiştir (Williams ve Ward, 2010). Böylece beş iridovirid cinsi, iki grup altında toplanmıştır. Gruplandırma, cinslere mensup türlerin enfekte ettikleri konaklara ve genetik materyalinin metilleniyor olup olmamasına göre yapılmıştır (Chinchar vd., 2009). İlk gruba dahil olan üyelerin (*Chloriridovirus* ve *Iridovirus*) genomları metillenmezken ikinci grupta (*Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* ve *Ranavirus*) DNA metiltransferaz, genomdaki sitozin nükleotidlerinin neredeyse %25’ini metiller (Chinchar vd., 2009).

Tablo 1. *Iridoviridae* familyasına mensup cinsler, konakları ve tip türleri

Cins	Hastalık yaptığı konak/lar	Tip tür (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 balıklar (dünya genelinde)	<i>Lymphocystis disease virus 1</i> (LCDV-1)
<i>Megalocytivirus</i>	Balıklar (Güneydoğu Asya)	<i>Infectious spleen ve kidney necrosis virus</i> (ISKNV)
<i>Ranavirus</i>	Soğukkanlı omurgalılar (çoğunlukla amfibiler, balıklar, sürüngenler)	<i>Frog virus 3</i> (FV 3)

DNA metilasyonunun rolünün ne olduğu açık olmasa da virüsün replikasyonda metilasyona ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir (Williams vd., 2005). Metilasyon inhibe edici ilaçlardan biri olan azasitidin (azacytidin) kullanarak yapılan bir çalışmada virüs miktarında 100 kat azalma ve viral DNA sentezinde bozulma kaydedilmiştir (Goorha vd., 1984). Virüslerin konak dağılımları ve DNA metillenmesi dışında genomun GC içeriği, viriyon morfolojisi, partikül büyüklüğü, hastalığın konaktaki belirtileri de cinslerin ayırımında kullanılmaktadır. Ayrıca majör kapsit proteini (Major Capsid Protein, MCP) ve diğer proteinlerin amino asit dizi analizleri sınıflandırmada göz önünde bulundurulmaktadır. Çünkü aynı cinse mensup üyelerin majör kapsit proteinleri birbirleri

ile %70'in üzerinde benzerlik göstermekteyken farklı cins üyelerinin bu proteindeki benzerliği %50'lerin altına düşmektedir.



Şekil 1. *Iridoviridae* familyası üyelerinin filogenetik analizi. Cinsler arasındaki ilişki tespitinde, tüm genom analizi yapılmış 14 iridoviride mevcut olan 26 korunmuş gen kullanılmıştır (Jancovich vd., 2012). FV3, *Frog virus 3*; STIV, *Soft-shelled turtle iridovirus*; TFV, *Tiger frog virus*; ATV, *Ambystoma tigrinum virus*; EHNV, *Epizootic haematopoietic necrosis virus*; GIV, *Grouper iridovirus*; SGIV, *Singapore grouper iridovirus*; LCDV-1, *Lymphocystis disease virus 1*; LCDV-C, *Lymphocystis disease virus – Çin izolatu*; ISKNV, *Infectious spleen and kidney necrosis virus*; OSGIV, *Orange spotted grouper iridovirus*; RBIV, *Rock bream iridovirus*; IIV-6, *Invertebrate iridescent virus type 6 (Chilo iridescent virus)*; IIV-3, *Invertebrate iridescent virus type 3*.

Familya üyelerini tür bazında ayırmak oldukça zordur. Bunun sebebi cinslerin kendi içlerinde majör kapsid proteinlerinin oldukça korunmuş olmasıdır. Örneğin Ranavirüs üyelerinin birkaçı (*Frog virus 3*, FV-3), *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV), *Bohle iridovirus* (BIV), *Ambystoma tigrinum virus* (ATV) ve *European catfish virus* (ECV) konak dağılımları, DNA dizileri, protein ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) profilleri bakımından karşılaştırılmıştır. Beş tür, MCP ve diğer genler içerisinde %90'nın üzerinde dizi benzerliği göstermekteyken RFLP profilleri ve konak dağılımları bakımından bu türlerin birbirlerinden açık bir şekilde farklı oldukları tespit edilmiştir (Mao vd., 1997; Hyatt vd., 2000).

1997 yılında Tiona ve Darai tarafından *Lymphocystis disease virus* 1'in DNA dizi analizi gerçekleştirmişlerdir. *Iridoviridae* üyeleri arasında ilk genom dizi analizi olarak kaydedilen bu çalışma sonrasında birçok iridoviridin genom analizi yapılmıştır. DNA dizi analizlerinin yapılması sayesinde izolatların sınıflandırılması kolaylaşmış, bu familya ile ilgili moleküler araştırmalar hız kazanmıştır. Tüm genom analizi yapılmış olan iridoviridler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Genom analizi yapılmış olan *Iridoviridae* familyası üyeleri

Cins	Tür ^a	Genom Büyüklüğü (bç)	%G+C oranı	GenBank Erişim Numarası	Yayınlanma Tarihi
<i>Iridovirus</i>	IIV-6	212,482	28,63	AF303741	2001
	IIV-9	205,791	30,9	GQ918152	2011
	IIV-22	197,700	28	NC_023615	2013
	IIV-25	204,815	30,3	NC_023613	2014b
	IIV-30	198,533	28,1	HF920636	2014a
	IIV-31	220,222	35,09	HF920637	2014c
<i>Chloriridovirus</i>	IIV-3	191,132	47,9	DQ643392	2006
<i>Lymphocystivirus</i>	LCDV-1	102,653	29,1	L63545	1997
	LCDV-C	186,250	27,2	AY380826	2004
<i>Ranavirus</i>	ESV	127,732	54,2	JQ724856	2012
	RGV	105,791	55	JQ654586	2012
	TFV	105,057	55,01	AF389451	2002
	ATV	106,332	54	AY150217	2003
	FV3	105,903	55,01	AY548484	2004
	STIV	105,890	55,01	EU627010	2009
	EHNV	127,011	54	FJ433873	2010
	SGIV	140,131	48,6	AY521625	2004
GIV	139,793	49	AY666015	2005	
<i>Megalocytivirus</i>	LYCIV	111,767	54	AY779031	Yayınlanmamış
	ISKNV	111,362	54,8	AF371960	2001
	RBIV	112,080	53	AY532606	2004

Tablo 2'nin devamı

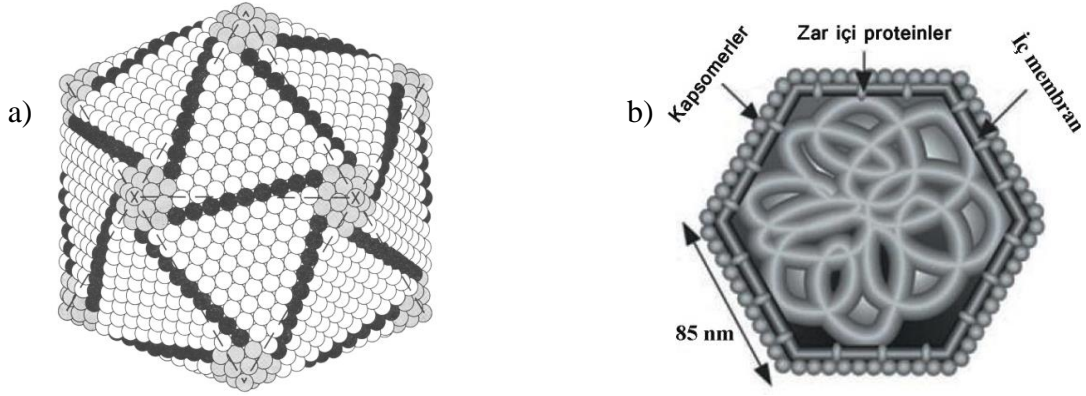
RSIV	112,414	53	AB104413	2005
OSGIV	112,636	54	AY894343	2005
TRBIV	110,104	55	GQ273492	2010

^aIIV-6, *Invertebrate iridescent virus type 6* (*Chilo iridescent virus*); IIV-9, *Invertebrate iridescent virus type 9*; IIV-22, *Invertebrate iridescent virus type 22*; IIV-25, *Invertebrate iridescent virus type 25*; IIV-30, *Invertebrate iridescent virus type 30*; IIV-31, *Invertebrate iridescent virus type 31*; IIV-3, *Invertebrate iridescent virus type 3*; LCDV-1, *Lymphocystis disease virus 1*; LCDV-C, *Lymphocystis disease virus – Çin izolatu*; ESV, *European sheatfish ranavirus*; RGV, *Rana grylio virus*; TFV, *Tiger frog virus*; ATV, *Ambystoma tigrinum virus*; FV3, *Frog virus 3*; STIV, *Soft-shelled turtle iridovirus*; EHNV, *Epizootic haematopoietic necrosis virus*; SGIV, *Singapore grouper iridovirus*; GIV, *Grouper iridovirus*; LYCIV, *Large yellow croaker iridovirus*; ISKNV, *Infectious spleen and kidney necrosis virus*; RBIV, *Rock bream iridovirus*; RSIV, *Red seabream iridovirus*; OSGIV, *Orange spotted grouper iridovirus*; TRBIV, *Turbot reddish body iridovirus*.

1.2.1. İridoviridlerin Yapı ve Kompozisyonu

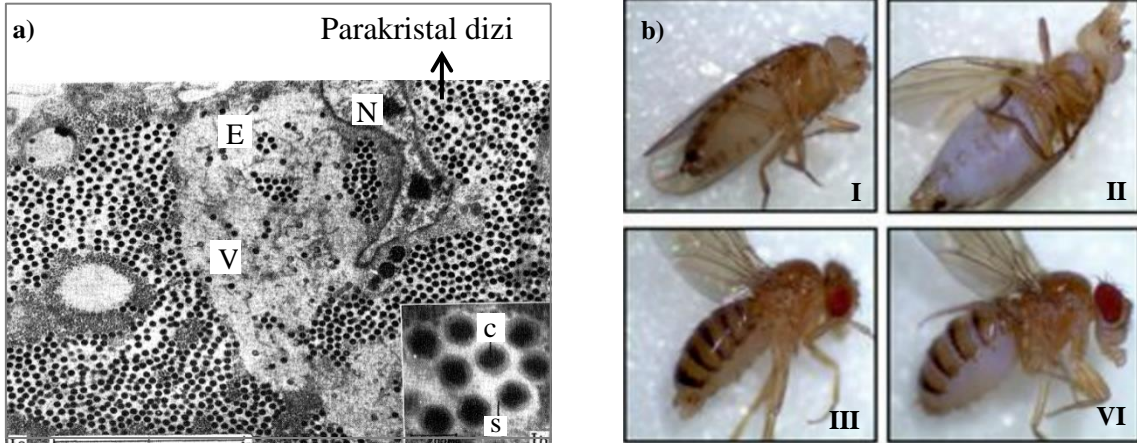
İridoviridler lineer çift zincirli DNA genomuna sahip, ikozahedral simetri gösteren (Chinchar vd., 2017) ve DNA replikasyonu nükleusta başlayıp sitoplazmada tamamlanan (Goorha vd., 1977) virüslerdir. Bu nedenle nükleositolazmik büyük DNA virüsleri (nucleocytoplasmic large DNA viruses, NCLDVs) olarak adlandırılmaktadırlar. İridoviridler diğer büyük DNA virüslerinden olan nükleopolihedrovirüsler (NPV'ler), granulo virüsler (GV'ler), sitoplazmik polihedrovirüsler (CPV'ler) ve entomopoksvirüsler (EPV'ler) gibi koruyucu bir protein matriks içine gömülü değildir (Williams, 1998). Viriyonlar hücreden çıkış şekillerine göre zarflı veya zarfsız olabilmekteyken, bu zarf enfektivite için zorunlu olmayıp (Williams ve Ward, 2010) zarfsız viriyonların da enfeksiyon oluşturma özelliğinde oldukları belirlenmiştir. İridoviridlerin DNA virüslerinden farklarından biri de dış zarftan hariç olarak kapsid ile DNA arasında yaklaşık 4 nm kalınlığında lipid membran bulunmasıdır. Yaklaşık olarak 48 ila 55 kDa büyüklüğünde olan kapsid proteini (MPC), virüsün tüm proteinlerinin yaklaşık %45'ini oluşturmaktadır. Zarflı olmayan viriyonlar %5-17 oranında lipid içerirler. İç lipid tabakanın orijini bilinmemekle beraber konak membran kökenli olmadığı belirtilmektedir.

Genellikle viriyon çapları 120-350 nm arasında değişmektedir. Viriyon, en dışta protein yapılı bir kapsid tabaka, iç lipid membran ve en iç kısımda DNA'nın bulunduğu öz bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2). Eğer hücreden tomurcuklanarak salınmış ise virüs, kapsidi çevreleyen bir zarfa da sahip olabilmektedir.



Şekil 2. İridovirüslerin kapsid simetrisinin ve iç yapısının şematik gösterimi. a) *Invertebrate iridescent virus 2* (IIV-2) dış kabuğunun diyagramı (Wrigley, 1969), b) İridovirüs parçacığının iç yapısı (Tripier-Darcy vd., 1984).

İridoviridlerin neden olduğu enfeksiyonlarda sitoplazmada virojenik stroma oluşumu gözlenir (Şekil 3a). Viral proteinlerin, DNA'ların ve virüs parçacıklarının yoğun olduğu bu sitoplazma kısmı, virüs inşasının gerçekleştiği bölgedir. Olgun viriyonların sitoplazmada sıralanarak oluşturduğu parakristal dizi Şekil 3a'da görülmektedir. Omurgasızların iridovirid enfeksiyonlarında vücutlarında belirgin renk değişimlerinin olmasının sebebi, sitoplazmada oluşan bu parakristal dizilerdir (Şekil 3b). Omurgalı iridovirüslerin enfeksiyonlarında ise böyle bir renk değişimi gözlenmez (Williams, 1996). Virojenik stromada inşası gerçekleşen virüsler hücreden salınacaksa hücre membranından zarf kazanarak tomurcuklanırlar. Fakat eğer yeni virüsler hücreden salınmayacaksa parakristal dizinin oluşacağı bölgelerde birikerek hücreden çıkmak için hücrenin parçalanmasını (lizisini) beklerler.

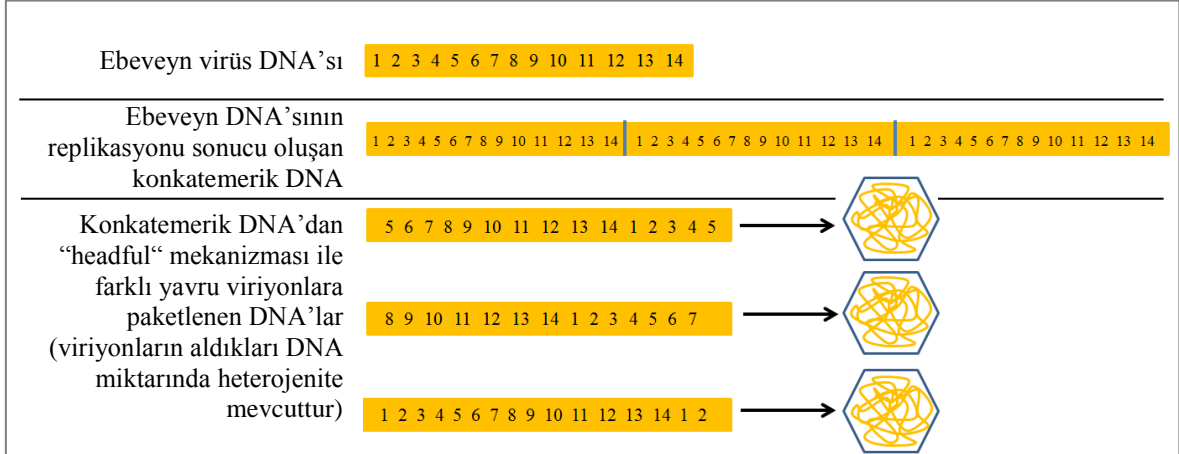


Şekil 3. *Chilo iridescent* virüs (CIV) ile enfekte olmuş hücrelerin ve meyve sineklerinin görünümü. a) CIV ile enfekte olmuş *Chilo suppressalis* yağ hücresinde virüslerin görünümü. E: Boş parçacıklar N: Nükleus V: Virojenik stroma (Fukaya ve Nasu, 1966); b) *Chilo iridescent* virüs enfeksiyonu sonucu *Drosophila melanogaster* bireyinde oluşan renk değişimi. I-III) Sağlıklı *D. melanogaster* bireyinin sırasıyla alttan ve yandan görünümü, II-IV) CIV ile enfekte olmuş *D. melanogaster* bireyinin sırasıyla alttan ve yandan görünümü (Bronkhorst vd., 2012).

1.2.2. Iridoviridae Familyasının Genom Özellikleri, Virüsün Hücreye Girişi ve DNA Replikasyonu

Familiya, genom büyüklüğü 102 ile 212 kbç arasında değişen üyelere sahiptir. Çift zincirli olan DNA genomu lineer yapıdadır (Jancovich vd., 2012). Omurgalı iridoviridlerin genom büyüklükleri omurgasız iridoviridlerinkine nazaran daha büyüktür (Kelly, 1985; Williams, 1998). Bu familiya üyelerini diğer ökaryotik DNA virüslerinden ayıran özelliklerden bir tanesi genom organizasyonlarıdır. Virüs genomu, DNA replikasyonunun “dönen çember” (rolling circle) replikasyon mekanizması sonucu konkatemerler şeklinde üretilir. Konkatemerler, replikasyon esnasında viral DNA kopyalarının ebeveyn DNA’dan ard arda bitişik olarak sentezlenmesi sonucu oluşur. Konkatamer şeklinde sentezlenen bu DNA’dan yavru kapsidler içerisine paketlenme, kapsid hacmine bağlı olarak (headful) gerçekleşir. Bu mekanizmada, her kapsid içerisine paketlenen DNA miktarı özel diziyeye bağlı olarak gerçekleşmediğinden yavru virüslerin sahip oldukları genetik materyal miktarlarında heterojenite söz konusu olabilmektedir (Goshorn ve Schlievert, 1989). Özel bir DNA paketlenmesi olmamasından dolayı viral genom, halkasal permütasyon (circularly permuted) ve uç dizi tekrarları (terminal redundansi, terminal redundancy) içermektedir (Şekil 4). Genomda bazı genlerin çift olarak bulunması, kopyalardan birinde meydana

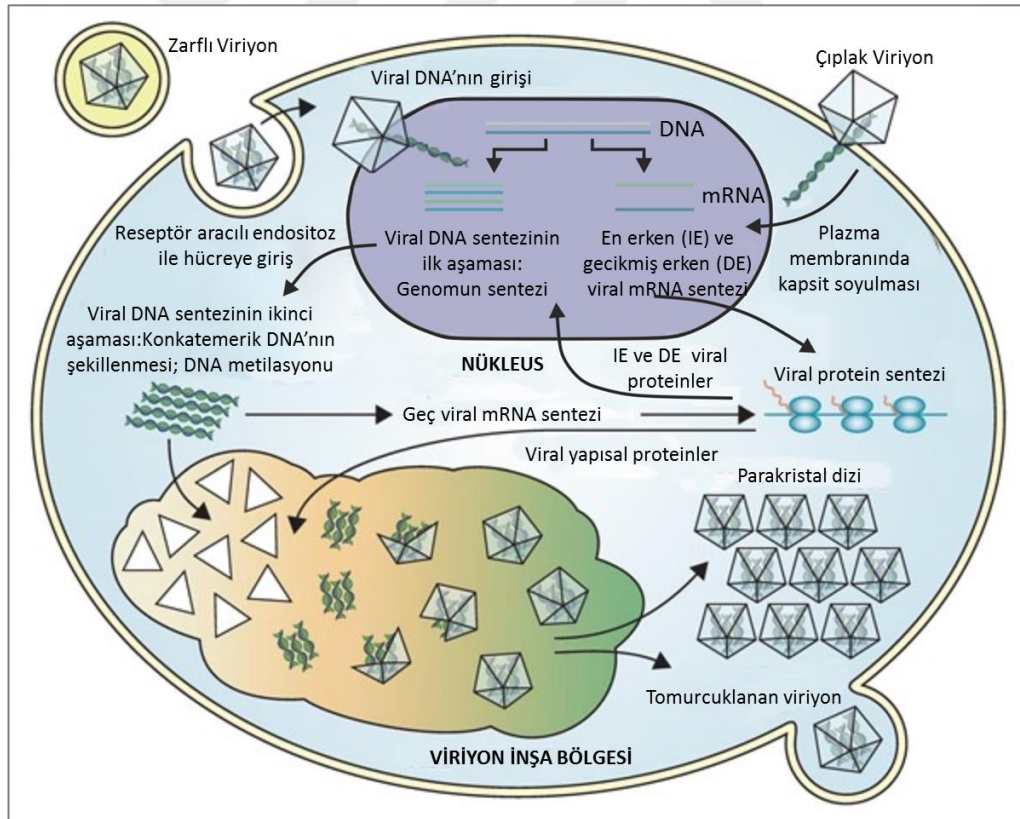
gelebilecek mutasyonun olası etkilerini elimine etmek açısından virüse avantaj sağlayabilmektedir. Tüm bunlara ek olarak CIV ve FV-3 ile yapılan çalışmalarda saflaştırılmış virüs DNA'sı hücreye transfekte edilmiş ancak çıplak DNA'nın enfeksiyona neden olmadığı görülmüştür.



Şekil 4. İridoviridlerde hacim bağımlı (headful) DNA paketlenme mekanizması, halkasal permütasyon ve dizi tekrarlarının şematik gösterimi.

Ranavirus cinsinin tip türü olarak kabul edilen *Frog virus 3* (FV 3) ile yapılan çalışmalar sonucunda virüsün replikasyon modeli aydınlatılmıştır. Bu model tüm familyanın genel anlamda replikasyonu hakkında çoğu bilgiyi sağlamakta ve replikasyon mekanizmasına örnek teşkil etmektedir (Williams, 2005). 30°C üzerindeki sıcaklıklar iridovirid replikasyonuna engel olmaktadır (Williams, 2008). Daha önce da bahsedildiği üzere iridoviridlerin hem zarflı hem de zarfsız olmaları ve her iki şekilde de enfeksiyon yapabilmeleri, en az iki farklı konak reseptör proteini bulunması gerektiğini göstermektedir. Konağa tutunduktan sonra zarfsız virionlar plazma membranından füzyon ile, zarflı viriyonlar ise reseptör bağımlı endositoz ile hücreye girmektedir (Williams, 2005). Kapsidin soyulmasını takiben virüs DNA'sı nükleusa taşınır. Nükleus, DNA replikasyonunun birinci aşamasında (nükleusta gerçekleşen kısım) görev alacak olan erken (IE, Immediate Early) ve gecikmiş erken (DE, Delayed Early) genlerin, viral DNA'yı kalıp olarak kullanarak transkriplendiği (mRNA'nın sentezlendiği) yerdir (Jancovich vd., 2012). Bu aşamada, en erken ve gecikmiş erken genlerin transaktivatör proteini olarak rol alan virüs yapısal proteinlerinden biri veya daha fazlası hücresel RNA polimeraz II'nin aktif olmasını sağlar. Bu süreç hakkında mevcut bilgi oldukça azdır. Virüs DNA miktarı iki katına çıktığında, yeni sentezlenmiş DNA sitoplazmaya geçer ve

böylelikle replikasyonun birinci aşaması tamamlanmış, ikinci aşaması başlamış olur (Goorha ve Dixit, 1984). İkinci aşama, viral DNA'nın konkatemerik organizasyonu oluşturacak şekilde sitoplazmada replike olduğu safhadır (Willis vd., 1984). Bahsi geçen familya üyelerinin “büyük nükleositoplazmik DNA virüsleri” olarak adlandırılmasının nedeni, replikasyonun bu iki safhasıdır. Konkatemerik şekildeki DNA sitoplazmada virojenik stroma içerisinde bulunur. Geç genlerin (L, Late) transkripsiyonunun gerçekleştiği yer yine virojenik stromadır. Geç genlerin transkripsiyonu, replikasyondan sonra, virüs tarafından modifiye edilen hücresel RNA polimeraz ya da viral RNA polimeraz II ile gerçekleşir. Geç viral genler viriyon oluşumu için gerekli yapısal proteinleri kodlar ve yavru virion DNA'sı kapsid içerisine paketlenir. Sonrasında virion tomurcuklanarak veya hücrenin lizizi ile salınır. Omurgalı iridovirüslerinin viriyon inşa ve hücreden tomurcuklanma aşaması detaylı olarak çalışılmıştır (Liu vd., 2016). *Frog virus 3*'ün hücreye girişi, DNA replikasyonu ve hücreden salınımı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. *Frog virus-3* (FV-3)'ün hayat döngüsünün şematik gösterimi (Chinchar vd., 2017'den düzenlenmiştir).

1.3. *Iridovirus* Cinsi

Iridovirus cinsinde bulunan 13 türün iki tanesi ICTV tarafından kabul görmüştür. Geri kalan 11 tanesi ise yeterli çalışma yapılmadığından ötürü birbirlerinden ayırt edilememiş, ICTV nezdinde kabul görmemiş, ancak söz konusu cins ile ilişkili olabilecekleri düşünülmüştür (Tablo 3) (Williams ve Ward, 2010; Pie'gu vd., 2013). IIV-1 ve IIV-6 (ya da CIV) cinsin kabul görmüş iki türüdür. CIV cinsin tip türüdür.

Tablo 3. *Iridovirus* cinsine ait türler

Virüs Adı/Kısaltması	Enfekte Ettiği Konak/Konak Ordosu	GenBank Erişim Numarası
<i>Invertebrate iridescent virus 1</i> / IIV-1 (<i>Tipula iridescent virus</i> / TIV)	<i>Tipula paludosa</i> / Diptera	M33542
<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> IIV-6 (<i>Chilo iridescent virus</i> / CIV)	<i>Chilo suppressalis</i> / Lepidoptera	AF003534*
<i>Invertebrate iridescent virus 2</i> / IIV-2	<i>Sericesthis pruinosa</i> / Coleoptera	AF042335
<i>Invertebrate iridescent virus 9</i> / IIV-9	<i>Wiseana cervitana</i> / Lepidoptera	AF025774
<i>Invertebrate iridescent virus 16</i> / IIV-16	<i>Costelytra zealandica</i> / Coleoptera	AF025775
<i>Invertebrate iridescent virus 21</i> / IIV-21	<i>Helicoverpa armigera</i> / Lepidoptera	
<i>Invertebrate iridescent virus 22</i> / IIV-22	<i>Simulium variegatum</i> / Diptera	AF042341
<i>Invertebrate iridescent virus 23</i> / IIV-23	<i>Heteronychus arator</i> / Coleoptera	AF042342
<i>Invertebrate iridescent virus 24</i> / IIV-24	<i>Apis cerena</i> / Hymenoptera	AF042340
<i>Invertebrate iridescent virus 29</i> / IIV-29	<i>Tenebrio molitor</i> / Coleoptera	AF042339
<i>Invertebrate iridescent virus 30</i> / IIV-30	<i>Helicoverpa zea</i> / Lepidoptera	AF042336
<i>Invertebrate iridescent virus 31</i> / IIV-31	<i>Armadillidium vulgare</i> / Isopoda	AF042337
<i>Anticarsia gemmatalis iridescent virus</i> / AGIV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> / Lepidoptera	AF042343

*Bu tez çalışmasında kullanılan iridovirüs türü.

1.3.1. *Chilo Iridescent Virüs*

Virüs, sistematik açıdan *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6) olarak adlandırılırken, izole edildiği pirinç sap kurdu olan *Chilo suppressalis* türünün cins ismi ile oluşturulan *Chilo iridescent virüs* (CIV) ismiyle de anılmaktadır. Hem CIV'nin hem de cins içerisinde bulunan diğer türlerin "iridescent" kelimesi içeren bir isimle anılmasının nedeni, virüslerin sebep olduğu ağır enfeksiyonlar sonucunda böcekte gözlenen turkuaza benzer yanardöner renktir (Şekil 6) (Nalçacıoğlu vd., 2009). CIV, 1966 yılında, Japonya'da, Fukaya ve Nasu tarafından ez izole edilmiş olup zarar derecesi hayli yüksek olan böceklerde ölümcül veya ölümcül olmayan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle potansiyel biyolojik kontrol materyali olarak değerlendirilmektedir (Henderson vd., 2001).

CIV'nin kapsid çapı 162-185 nm arasında değişmektedir (Yan vd., 2000). Kapsidin çevrelediği viriyonun merkezinde 212,482 nükleotid çiftinden (Jakob vd., 2001; Williams, 1996; Williams vd., 2005) oluşan ve biyoinformatik analizlere göre 211 adet açık okuma zinciri (Open Reading Frame, ORF) (Eaton vd., 2007) kodladığı belirlenen DNA bulunmaktadır. Kapsid esnek fibrillerle kaplıdır ve fibriller parakristal dizi oluşumunda viriyonlar arasındaki uzaklığı belirler (Williams ve Ward, 2010). CIV'nin yapısında en az 54 adet viriyon ilişkili protein (yapısal protein) bulunmakta ve bunların 36 tanesi diğer iridovirüs ve askovirüsler ile benzerlik göstermektedir (Ince vd., 2010).



Şekil 6. İridovirüs ile enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvası (URL-1). Sağlıklı larva turuncumsu sarı renkte, enfekte larva turkuaz renkte görülmektedir.

Bu cinsin üyelerinin biyolojik kontrol materyali olarak kullanımları, ağızdan enfeksiyonlarının yavaş olması, salgın enfeksiyonlara neden olmamaları, hafif

enfeksiyonların ölümcül olmayıp larvaların ergin döneme kadar gelişerek çoğalabilmelerini engelleyememesi gibi faktörler nedeniyle kısıtlanmaktadır. Ancak virologlar ve böcek patoloğlarının dikkatini, diğer omurgalı ve omurgasız virüs cinsleri ile *Iridovirus* cinsi arasındaki ilginç ilişki cezbetmektedir (Williams ve Ward, 2010). İridovirüslerin oluşturdukları “iridescent” renk oluşumu ve kapsid yapısı, biyoteknolojik açıdan model olabilecek potansiyeldedir (Radloff vd., 2005; Hartschuh vd., 2008).

Yapılan bir çalışmada fare embriyonik fibroblastları (MEFs, Mouse embryonic fibroblasts) CIV ile enfekte edilmiş ve doğal immün yanıt oluştuğu tespit edilmiştir (Ahler vd., 2016). Virüs ile karşılaşma sonucu immün sistemin aktifleştiğinin belirtisi, tip I interferon (IFN) salgılanmasıdır. Ayrıca erken doğal bağışıklığın antiviral cevabının oluşup oluşmadığının işareti ise tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)’dır. Çalışmada CIV ile enfekte edilen MEF’lerde IFN- β mRNA’larında 15 kat ve TNF- α mRNA’larında 23 kat artış gözlenmiştir. Isı ve UV ile inaktif edilmiş virüsler ile yapılan enfeksiyonların sonucunda ise IFN- β salgılanmasında dikkate değer bir azalma tespit edilmiştir. Aynı çalışma içerisinde MEF hücreleri ile eş zamanlı olarak *Drosophila melanogaster* S2 hücreleri (CIV’nin replike olabildiği hücre suşlarından bir tanesi) CIV ile enfekte edilmiştir. Elektron mikroskobu (Transmission electron microscopy, TEM) ile yapılan gözlemler neticesinde fare hücrelerinde düşük miktarda, S2 hücresinde doğal seyrine uygun miktarda viriyonlar gözlenmiştir. Mikroskopik olarak gözlemlenen bu durum, MEF’lerde bulunan CIV genomu seviyesinde kantitatif PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) ile tasdik edilmiştir. qPCR uygulaması neticesinde enfeksiyonun altı günlük periyodunda dahi CIV genomunda bir artış gözlenmemiştir. Dahası araştırmacılar, bahsi geçen çalışmalarını CIV ile enfekte olan hücrelerin oluşturduğu antiviral immün yanıtın, Vesicular Stomatitis virüs (VSV) ve Kunjin virüs (KUNV)’ün replikasyonunu azalttığını tespit ederek zenginleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda CIV, memeli hücresinde replikatif olmayan ancak VSV ve KUNV gibi virüslerin enfeksiyonunu kısıtlayacak derecede immün yanıtı tetikleyen bir virüs olarak kayda geçmiştir. VSV ve KUNV virüslerinin CIV varlığında replikasyonlarının azalması, koruyucu memeli immün yanıtı aktive eden bir genin tanımlanmasının mümkün hale getireceği aşı ya da terapötik gelişmeler hakkında gelecek araştırmalara bir yol açmaktadır (Ahlers vd., 2016).

CIV hücre kültüründe çoğaltılma avantajına sahip bir virüsdür. *Choristoneura fumiferana* (IPRI-CF-124T) (D’Costa vd., 2001), *Drosophila melanogaster* (*Drosophila* S2) (Bronkhorst vd., 2012), *Bombyx mori* (SPC-BM-36) (Nalçacıoğlu vd., 2003) ve

Anthonomus grandis (boll weevil) (BRL-AG-3A) (D'Costa vd., 2012) hücre soyları CIV üretimi için kullanılan suşlardır. Bunların yanında *Pierris rapae*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella* ve *Aedes albopictus* hücre kültürlerinde de virüsün replike olabildiği gösterilmiştir (Constantino vd., 2001).

Virüsün ağız yolu enfeksiyonu ile dar bir konak dağılımına sahip olmasının aksine enjeksiyon yöntemi ile yapılan inokülasyonlarda Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera ordoları içinde bulunan 100'den fazla böcekte enfeksiyona neden olduğu gözlenmiştir (Williams ve Ward, 2010). Sivrisineklerde ağız yolu ile CIV enfeksiyonunun ölümcül olmadığı tespit edilmiştir. CIV'nin böcek olmayan eklem bacaklıları enfekte ettiği bilgisi de literatürde mevcuttur (Ohba ve Aizawa, 1979).

1.3.2. *Chilo* Iridescent Virüs'te Transkripsiyonel Düzenlenme

Chilo iridescent virüs'ün gen ifadesi basamaklı bir şekilde düzenlenmektedir. Virüsün genlerinin ifade sınıfları, en erken (Immediate early, IE ya da α), gecikmiş erken (Delayed Early, DE ya da β) ve geç (Late, L ya da γ) olarak gruplandırılmıştır (Barray ve Devauchelle, 1987; D'Costa vd., 2001). Bu gen ifade sınıflarını tanımlamak gerekirse; α genleri DNA replikasyonu ve protein sentezine ihtiyaç duymazken, β genleri protein sentezine, γ genleri de hem protein sentezi hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duymaktadır (Tablo 4) (D'Costa vd., 2001).

Tipula iridescent virus (TIV)'ın iki adet mRNA'sı, LCDV-1'nin mRNA'ları istisna olarak kabul edildiğinde, *Iridoviridae* familyası üyelerinin mRNA'ları 3' kodlama yapmayan uçlarında (3' untranslated region, 3'-UTR) poliadenilasyon kuyruk bulunmamaktadır (İnce vd., 2013). Bu nedenle mRNA'lar oligo d(T) primer ile cDNA'ya çevrilememektedir. Ancak İnce ve arkadaşları (2013) tarafından CIV'nin 54 adet viriyon proteininin hangi gen sınıfına dahil olduğunu tespit etmek amacıyla 3' ucu kullanılarak cDNA sentezini gerçekleştirecek bir yöntem denenmiş ve başarılı olunmuştur. LACE (Ligation-based amplification of cDNA ends) olarak adlandırılan bu yöntem sayesinde ortamda bulunan tüm mRNA'lardan cDNA kütüphanesi oluşturulabilmektedir. Familya üyelerinin mRNA'ları 5' uca şapka içermektedir (Chinchar vd., 2017).

Tablo 4. DNA ve protein sentezi inhibitörleri varlığında genlerin ifade edilme durumları

Gen sınıfı	Ara-C/APH/PAA*	CHX**
En erken	+	+
Gecikmiş erken	+	-
Geç	-	-

*Ara-C (cytosine arabinoside) /APH (Aphidicolin) /PAA (phosphonoacetic acid): Dna sentez inhibitörü, **CHX: protein sentez inhibitörü

Yapılan bir çalışmada Northern blot hibridizasyon analizi ile tespit edilen 137 transkriptin 37 tanesi en erken, 34 tanesi gecikmiş erken ve 65 tanesi geç gen olarak tanımlanmıştır (D'Costa vd., 2004). İnce ve arkadaşları (2015) ise kütle spektrofotometrisi ile yaptıkları proteomik analizde, CIV'nin 95 proteininin ifade edildiğini ve bunların 37 adedinin viriyon proteini (yapısal protein) olduğunu tespit etmişlerdir. Bu 37 proteinin 22 adedi en erken, 8 adedi gecikmiş erken, 7 adedi geç genlerdir.

CIV yapısal proteinlerinin fonksiyonları hakkında bilgi elde edilebilmesi amacıyla bu proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimleri araştırılmıştır (Özşahin, 2015). Maya iki hibrit sisteminin kullanıldığı çalışma neticesinde 47 yapısal protein arasında bir bütün oluşturacak şekilde 163 muhtemel etkileşim olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca CIV'nin apoptozis proteini kodlayan 193R (İnce vd., 2008), ekzonükleaz ve endonükleaz kodlayan 012L (Dizman vd., 2012), transkripsiyonel ve fonksiyonel analizleri detaylıca araştırılmıştır. DNA polimeraz kodladığı tahmin edilen 037L (Nalçacıoğlu vd., 2003), major kapsid proteini kodlayan 274L (Nalçacıoğlu vd., 2007) genlerinin hem transkripsiyonel hem de promotor analizi gerçekleştirilmiştir. 2014 yılında ilk rekombinant CIV oluşturulmuştur (Özgen vd., 2014).

Geç gen sınıfına dahil olan genlerin yapısal genler olduğu düşünülmüş olsa da, CIV ile yapılan çalışmalar üç gen sınıfının bünyesinde yapısal genler bulunabileceğini göstermiştir (İnce vd., 2013; İnce vd., 2015). CIV yapısal genlerinden olan 118L, 337L sırasıyla IE ve DE gen sınıflarına (İnce vd., 2013) ait genler olmakla birlikte iki gen de integral membran proteini ve miristilasyonlu membran proteini olarak tanımlanmıştır (İnce vd., 2015). Bunun yanısıra, tez konusu olan 458R geninin (NP_149921) transkripsiyonel olarak aktif bir gen olduğu tespit edilmiş (D'Costa vd., 2004), bu genin muhtemel

miristilasyonlu membran proteini kodladığı ve tarafımızca yapılan biyoinformatik analizler sonucunda 118L geni ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

1.4. Miristilasyon

Virüsler, genellikle konaklarının N-miristiltransferaz (NMT) enzimini kullanarak proteinlerinin N-terminallerinin miristillenmesini sağlarlar. 14 karbonlu yağ asidi olan miristat, proteinin N-teminalinde bulunan glisinlerin ucuna NMT sayesinde takılır (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). Miristilasyon esasen geri dönüşümsüz bir posttranslasyonel (translasyon sonrası) modifikasyondur. Miristil kısımlar, proteinlerin görevlerini yapmaları için gerekli olan protein-protein ve protein-membran ilişkilerine aracılık eder (Martin vd., 2011).

Virüs proteinlerinin miristil kısımlarının rolü, sadece farklı membran ve membran alt yapılarını hedef almayı değil, aynı zamanda diğer proteinler ile veya üçüncü ve dördüncü yapıyı etkileyen konformasyonel şalter ile etkileşimi kapsar (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). Birçok viral protein miristillenir ve miristilasyon, proteinlerin membran ile bağlanması ve uygun lokalizasyonları için önemlidir (Bastidas vd., 2012). Miristilli viral proteinler, virüs olgunlaşma sürecinde, çoğunlukla konakçı hücrenin plazma membranıyla kaynaştırma yoluyla virüs inşasında farklı roller oynamaktadır (Harper ve Gilbert, 1995). Miristilli viral proteinlerin virüs inşası, yapısı, tomurcuklanma ve konak etkileşimlerindeki rolünün yanı sıra virüsün hücreye girişinde de görev yaptıkları belirtilmektedir (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). Miristilli viral proteinlerin, insan bağışıklık yetersizliği virüsü 1 (HIV-1), arenavirüsler, ASFV, vaccinia virüsü dahil birçok virüsün inşası için gerekli olduğu bilinmektedir (Göttlinger vd., 1989; Bryant ve Ratner, 1990; Martin vd., 1997, 1999; Capul vd., 2007; Andrés vd., 2002a).

Sadece ökaryot hücreler ve bu hücreleri enfekte eden virüslerin proteinlerinde glisin miristilasyonunun olduğu düşünülmekteydi (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). Ancak yapılan araştırmalar neticesinde bakterilerin de miristilli protein içerdikleri tespit edilmiştir (Nimchuk vd., 2000).

1.5. Çalışmanın Amacı

CIV öz genlerinden olan 118L ile yüksek oranda benzerlik gösteren, transkripsiyonel olarak aktif olduğu tespit edilmiş olan ve muhtemel bir miristilasyonlu membran proteini kodladığı bilinen 458R açık okuma zincirinin virüs replikasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Miristilasyonlanan viral proteinlerin virüs inşasında, virüsün hücreye girişinde, konak etkileşimlerinde, tomurcuklanmada görev aldıkları bilinmektedir (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). Tarafımızca yapılan ve yukarıda özetlenen bu ön araştırmaların sonucunda 458R'nin virüsün hücreye tutunma, virüs inşasında ve/veya virüs enfektivitesinde görev yapıyor olabileceği düşünülmektedir. İlgili genin virüs enfeksiyonunun önemli aşama veya aşamalarında rol oynuyor olabileceği ihtimali, çalışmalarımızda 458R açık okuma zincirine odaklanmamıza neden olmuştur. Daha sonra yapılacak fonksiyonel çalışmalara alt yapı oluşturması açısından önem arz eden “458R geninin transkripsiyon özelliklerinin ve anatomisinin açığa kavuşturulması” bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır. Böylece, belirtilen amaca ulaşmak için bu tez çalışmasında 458R geninin hangi zaman dilimleri içerisinde transkript olduğunun ve hangi gen ifade sınıfına dahil olduğunun belirlenmesi ve genin 3' ve 5' uçlarında ne kadar uzunlukta translasyona uğramayan bölgeler olduğunun tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Virüs ve Konak

Tez çalışmasında kullanılan *Chilo* iridescent virüs (CIV) Yeni Zellanda izolatu olup Dr. C. Joel Funk (USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona)'tan temin edilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan *Anthonomus grandis*'ten geliştirilen BRL-AG-3A hücre soyu Prof. Dr. Guy Smagghe (Laboratory of Agrozoology, Ghent University, Belgium)'den temin edilmiştir.

2.2. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyon Tayini

Virüsün çoğaltılmasında, CIV'nin verimli ve sürekli olarak yüksek titreli üretimini sağlayan pamuk kurdu *Anthonomus grandis*'ten geliştirilmiş BRL-AG-3A hücre soyu kullanıldı. Hücreler, 28°C'de, %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma) katkılı Hink's TNM-FH besiyerinde (Hink, 1970) özel hücre kültürü kapları (Corning) içerisinde büyütüldü.

BRL-AG-3A hücrelerinin CIV ile enfeksiyonu, altı gözlü kültür kaplarında gerçekleştirildi. Bir gece önceden kuyulara, her kuyuda $9,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde bırakılan BRL-AG-3A hücreleri, 100 µl CIV ile enfekte edildi. Son hacim %10 FBS katkılı TNM-FH besiyeri ile 2 ml'ye tamamlandı. Hücreler beş gün boyunca 28°C etüvde inkübe edildi. Enfeksiyon belirtilerinin gözlemlendiği bu süre sonunda, hücreler 600 xg'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülüp enfeksiyon sıvısı alındı. Bu sıvı kullanılmak üzere karanlıkta ve 4°C'de muhafaza edildi.

Çoğaltılan virüsün titresini belirlemek üzere son nokta seyreltme metodu (EPDA, Endpoint Dilution Assay; Reed ve Muench, 1938) uygulandı. Bir gün önceden BRL-AG-3A hücreleri altı gözlü kabın üç gözüne, her kuyuda $9,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde bırakılarak son hacimler %10 FBS katkılı TNM-FH besiyeri ile 2 ml'ye tamamlandı ve 28°C etüvde inkübe edildi. Ertesi gün 10'arlı grup halinde üç seri mikrosantrifüj tüpünün her birine %10 FBS katkılı TNM-FH besiyerinden 90 µl bırakıldı. Tek seri için bir kontrol grubu olacak şekilde toplam üç kontrol grubu oluşturuldu. Virüs süspansiyonu, her bir grup için seri seyreltme (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) ile mikrosantrifüj

tüplerine dağıtıldı. Bir gün önceden altı gözlü kabın kuyularına bırakılan hücreler, 1 ml yeni besiyeri ile tabandan koparıldıktan sonra 30 adet mikrosantrifüj tüpüne 100'er µl olacak şekilde dağıtıldı. Bu karışımlar 60 kuyulu kapların baş sütunundaki kuyulara kontrol grubu bırakılacak şekilde seyreltme sırasına uygun biçimde 10'ar µl dağıtıldı. Beş gün sonunda inverted floresan ışık mikroskobu (Zeiss Axiovert 200M) ile hücrelerde meydana gelen sitopatik etkiler gözlemlenerek, aşağıda belirtilen Reed-Muench metodu formülüne göre virüsün konsantrasyonu hesaplandı (Reed ve Muench, 1938).

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

n=enfeksiyon değerinin %50 veya üstündeki en yüksek seyreltme;

a=log n;

b=n. seyreltiğin % değeri,

c=n. değer altındaki % değeri;

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

2.3. 458R ORF'sinin Biyoinformatik Analizi

Bu tez kapsamında çalışılan CIV 458R açık okuma zincirinin nükleik asit dizisine ve amino asit sırasına NCBI (URL-2) sitesinden ulaşıldı. 458R'nin amino asit dizisi, NCBI sitesinin veri tabanına kayıtlı diziler ile pBLAST aracı (URL-3) kullanılarak karşılaştırıldı. Benzerlik gösteren diziler tespit edildi ve benzerlikler BioEdit programı ile hizalanarak GENEDOC programı ile görüntülendi. ScanProsite programı (URL-4) kullanılarak 458R'nin içerdiği domeinler, profiller analiz edilerek IBS (Illustrator of Biological Sequences) yazılımı (URL-5) ile şematize edildi. Ayrıca 458R'nin transmembran domaini içerip içermediğini tespit etmek amacıyla gen, TMHMM (URL-6) sunucusu ile analiz edildi.

2.4. Çalışmalarda Kullanılan Primerler

Çalışmalarda 11 adet farklı primer kullanıldı (Tablo 5). 458R geninin transkripsiyon saatinin ve 3' bölgesinin (3' UTR) belirlendiği LACE (Ligation-based amplification of cNDA ends) yönteminde (İnce vd., 2013) dört adet primer kullanıldı. Bunların iki tanesi gene özgü (458R Fw2 ve 458R Rv2), diğer ikisi (LACE P1 ve LACE

P2) ise kullanılan metotta standart olan primerlerdir. Genin hangi gen ifade sınıfına dahil olduğunu belirleyebilmek için gene özgü 458R Fw1 ve 458R Rv1 primerleri oluşturuldu. SP1, SP2 ve SP3 primerleri gene özgü olup genin 5' bölgesinin (5' UTR, 5' translasyona uğramayan bölge) belirlendiği RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) yönteminde (Frohman vd., 1988) kullanıldı. Gene ait sentezlenen mRNA'nın 5' uçun tespitinde ise iki ayrı primer (RACE oligo d(c) ve RACE ankor) daha kullanıldı.

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan primerler

Primer İsmi	Genomdaki pozisyonu	Primer Sırası (5' → 3')
458R FW1	207044-207065	GAAGGCCTGGAATTCGGTGCCAGTGTAAGTTCAG
458R FW2 ^a	207589-207610 ile 207737-207756	TACAGAAAGTAAAGTTGAAGGTTACTTTAACTGGACC GATCG
458R RV1 ^b	207589-207610 ile 207737-207756	CGATCGGTCCAGTTAAAGTAACCTTCAACTTTACTTTC TGTA
458R RV2	208434- 208456	GCTCTAGACGGGATCCAAGCCATAATTTGTTTTGTTC AA
LACE P1		PO ₄ -GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) ₁₅ VN
LACE P2		ATCGATACGCGTGGTC
SP1	207365- 207384	ATTGATGTGTTTACAATATC
SP2	207308- 207327	TTAACTCCTTTAATAGCAGC
SP3	207218- 207237	GCATTTATATCAATACTTGC
RACE oligo d(C)		GACCACGCGTATCGATGTCGACCCCCCCCCCCCCCCCC CV
RACE ankor		GACCACGCGTATCGATGTCGAC

a ve b: Transmembran domeinlerinin genden çıkarılması için füzyon PCR kullanımına uygun primerler

2.5. CIV 458R Geninin Transkripsiyonel Analizi

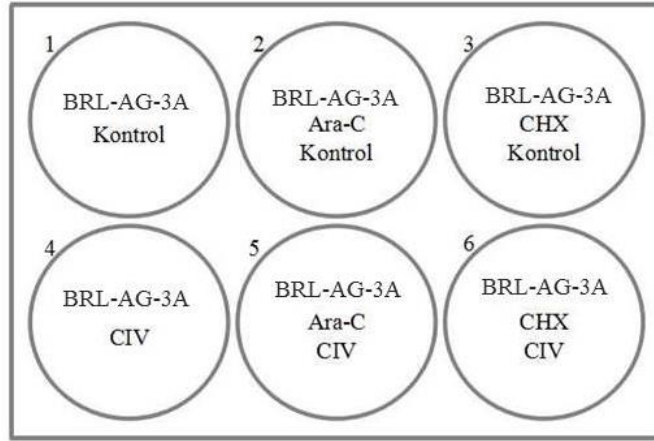
458R geninin, transkripsiyonunun hangi zaman dilimleri arasında gerçekleştiğini ve hangi gen ifade sınıfına dahil olduğunu belirlemek için CIV ile enfekte olan BRL-AG-3A hücrelerinden toplam RNA izolasyonu yapıldı. Farklı yöntemler kullanılarak mRNA'dan oluşturulan cDNA'lar incelenerek araştırmalar sürdürüldü. BRL-AG-3A hücrelerinin CIV

ile enfeksiyonu, örneklerden toplam RNA izolasyonu ve bunları takiben gerçekleştirilen tüm deneyler aşağıda detaylıca açıklanmıştır.

2.5.1. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi

2.5.1.1. Hücrelerin Enfeksiyonu ve RNA İzolasyonu

458R geninin transkripsiyon sınıfını belirlemek için, altı gözlü kabın her kuyusuna 1×10^6 hücre bırakıldı. Hücreler, kültür kabının tabanına tutunmaları için iki saat 28°C 'ye ayarlı etüvde bekletildi ve daha sonra besiyerileri alındı. Şekil 8'de görüldüğü gibi 1-4 numaralı kuyulara %10 FBS katkılı TNM-FH besiyeri, 2-5 numaralı kuyulara Ara-C (DNA sentezi inhibitörü, $100 \mu\text{g/ml}$) içeren %10 FBS katkılı olan TNM-FH ve 3-6 numaralı kuyulara ise CHX (Protein sentez inhibitörü, $200 \mu\text{g/ml}$) içeren %10 FBS katkılı olan TNM-FH'ten 2'şer ml bırakıldı. Bir saat etüvde bekletildikten sonra besiyeriler alındı. MOI (hücre başına düşen virüs sayısı) 2 olacak şekilde 4, 5 ve 6 numaralı kuyulara virüs süspansiyonu bırakıldı ve üzerleri kuyulara uygun inhibitör içerikli besiyeriler ile 2 ml'ye tamamlandı (Şekil 7). Virüs eklenmeyen kuyulara, uygun içerikli taze besiyeriler bırakıldı. Virüslerin hücrelere tutunmasını sağlamak için, kültürler oda sıcaklığında iki saat boyunca yavaş hızda ($2,5 \text{ rpm}$) çalkalayıcı üzerinde bekletildi ve daha sonra kuyulardan besiyeriler uzaklaştırıldı. Hücrelerden, tutunmayan virüslerin uzaklaştırılması amacıyla 1'er ml katkısız besiyeri ile kuyular yıkandı. Uygun inhibitör içeren taze besiyeriler tekrar hücrelerin üzerine eklenerek 28°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyonun 24. saatinde besiyeriler uzaklaştırıldı. Hücreler her kuyunun tabanından, 1'er ml Trizol (Invitrogen) kimyasalı ile koparılarak mikrosatirifüj tüplerine alındı.



Şekil 7. 458R geninin transkripsiyon sınıfının belirlenmesi

Toplanan hücrelerden toplam RNA izolasyonu Trizol kimyasalı ile tedarikçi firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için takip edilen işlemlerin akışı şu şekildedir:

Mikrosantrifüj tüplerinde bulunan Trizol ile tabandan koparılmış ve parçalanmış hücreler üzerine 200 µl kloroform eklenerek yavaşça alt üst edildi. 12000 xg hızda, 4°C’de, 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra tüp içerisinde üç faz gözlemlendi. En üstte bulunan saydam faz başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu fazın üzerine 500 µl izopropanol eklendikten sonra tüpler yavaşça alt üst edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 12000 xg hızda, 4°C’de, 10 dakika santrifüj edildi. RNA’ların çökmesi sağlandıktan sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. 1 ml %75’lik etanol eklenen RNA’lar vorteksenerek 7500 xg hızda, 4°C’de, 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve çökelti 10-15 dakika havada kurutuldu. 30 µl RNaz’sız su ile çözülen çökelti 15 dakika 60°C’de bekletildi. RNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak (Nanodrop-Thermo Fisher Scientific) ile belirlendi. Örnekler kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

RNA izolasyonu sonunda örneklerde bulunabilecek muhtemel DNA kalıntıları, DNase I (Sigma) ile elimine edildi. İşlem için yaklaşık 8 µl kadar toplam RNA üzerine 1 µl 10X reaksiyon tamponu ve 1 µl DNase I (1U/ µl) eklendi. Nazikçe karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. DNase I enzimini inaktif hale getirmek için stop solüsyonu eklenerek 70°C’de 10 dakika bekletildikten sonra buzda soğutuldu. Örnekler -20°C’de muhafaza edildi.

2.5.1.2. 458R Geninin cDNA'sının Oluşturulması

Transkripsiyon sınıfını belirlemek amacıyla izole edilen RNA'lardan gene özgü 458R Rv2 primeri kullanılarak RT-PCR (Reverse Transkriptaz PCR) yöntemiyle (M-MuLV Reverse Transcriptase) cDNA sentezi gerçekleştirildi. DNaz I uygulanmış RNA'lar kalıp olarak kullanıldı. Örneklerin hepsinin RNA miktarları 1 µg'a ayarlandı. Bu işlem için reaksiyonun gerçekleşeceği tüpe;

RNA	: 1 µg
10X M-MuLV tamponu	: 2 µl
dNTP (10 mM)	: 1 µl
458R Rv2 (10 mM)	: 2 µl
M-MuLV RT (200 U/µl)	: 1 µl
RNasin (40U/µl)	: 0,2 µl bırakıldıktan sonra reaksiyon hacmi

dH₂O ile 20 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım 1 saat 42°C'de inkübe edildi. Ardından enzimi inaktif etmek üzere karışım, 65°C'de 20 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar PCR ile çoğaltıldı. PCR, "Taq DNA Polymerase High Purity" (BioBasic) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. PCR karışımına;

Kalıp cDNA	: 1 µl
10X Reaksiyon tamponu	: 2,5 µl
MgSO ₄ (20 mM)	: 2,5 µl
dNTP (10 mM)	: 0,5 µl
458R Fw1 (10 mM)	: 0,5 µl
458R Rv1 (10 mM)	: 0,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	: 0,1 µl bırakıldıktan sonra son hacim dH ₂ O ile

25 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon, 95°C'de 1 dakikalık ilk denatürasyonun ardından 35 döngü halinde;

95°C'de 20 saniye

58°C'de 20 saniye

72°C'de 45 saniye

72°C'de 10 dakika işleme tabi tutuldu. Reaksiyon sonunda, PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforez işlemini takiben ultraviyole ışık altında görüntülendi.

2.5.2. Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi

2.5.2.1. Hücrelerin Enfeksiyonu ve RNA İzolasyonu

458R geninin hangi zaman aralıklarında transkriplendiğini tespit etmek amacıyla toplam RNA izolasyonu yapılacak saatler 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 olarak belirlendi. Altı gözlü kültür kabının her kuyusuna 1×10^6 hücre bırakıldı. Hücrelerin tabana tutunmaları için iki saat 28°C 'deki etüvde bekletildi. Akabinde, MOI:2 olacak şekilde hücreler CIV ile enfekte edildi. Yavaş hızdaki ($2,5 \text{ rpm}$) sallayıcıda iki saat boyunca virüslerin hücrelere tutunmaları sağlandı. İki saat sonunda besiyeri ile hücreler yıkandı ve üzerlerine 2'şer ml yeni besiyeri bırakıldı. Besiyerinin bırakıldığı bu zaman 0. saat olarak kabul edildi ve bu saate ait kuyudan hücreler, Trizol kimyasalı ile tabandan koparılarak mikrosanrifüj tüpüne alınıp -80°C 'de muhafaza edildi. Tüm saatlere ait kuyulardaki hücrelerin uygun saatlerde toplanma işlemi bitene kadar, her saat için aynı işlem uygulandı. Deneyde kullanılan kontrol kuyularındaki enfekte olmamış hücreler, enfeksiyonu takiben 24. saatte toplandı. 48. saatte hücreler toplandıktan sonra Trizol ile RNA izolasyonu aşamasına geçildi. RNA izolasyonu Bölüm 2.5.1.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Belirtilen işlemlerden farklı olarak sadece izolasyona başlamadan önce örnekler -80°C 'den alınıp çözünene kadar, yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

2.5.2.2. 458R Genine Ait cDNA'nın Oluşturulması

458R geninin transkripsiyon zamanını belirlemek amacıyla izole edilen toplam RNA'lardan LACE P1 primeri kullanılarak LACE yöntemiyle (Şekil 8) (İnce vd., 2013) cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA'nın varlığının belirlenmesiyle, test zamanında 458R geninin transkriplendiği belirlendi. Metot, Şekil 8'de şematik olarak gösterilmiştir. 0., 2., 4., 8., 12., 24., 36. ve 48. saatlere ait toplam RNA'lardan 2'şer μg alındı. Daha sonra her saate ait RNA'ların 3' uçlarına RNA ligaz enzimi (T4 RNA Ligaz 1, NEB) ile P1 primeri eklendi. Reaksiyon tüplerine,

Toplam RNA	: 2 μg
10X Ligaz tamponu	: 3 μl
ATP (1 mM)	: 5 μl

P1 (100 μ M)	: 5 μ l
BSA (1 mg/ml)	: 5 μ l
T4 RNA ligaz (10U/ μ l)	: 2 μ l bırakıldıktan sonra son hacim dH ₂ O ile

30 μ l'ye tamamlandı. Tüpler 16 saat 4-8°C'de bekletildikten sonra üzerlerine 60 μ l (iki hacim izopropanol ve 3 μ l (0,1 hacim) 3M sodyum asetat (pH 5,2) eklendi. 15 dakika -20°C'de inkübe edilen örnekler 16000 xg hızda 7 dakika santrifüj edildi. Çökelti %75'lik etanol ile yıkandı ve havada kurutularak nükleaz içermeyen dH₂O ile çözüldü. 3' ucuna LACE P1 primeri yapışmış olan RNA'ları içeren bu süspansiyon üzerine LACE P2 (10 μ M) primerinden 5 μ l ve dNTP (10mM)'den 4 μ l eklenerek 65°C'de 5 dakika bekletildi. Buzda soğutulan örneklerin üzerine 10 μ l 10X M-MuLV tamponu, 5 μ l 5mM DTT (Dithiothreitol), 1 μ l Rnasin (2U/ μ l) ve 1 μ l M-MuLV reverse transkriptaz eklenerek 2.5.1.2. bölümde açıklanan reverse transkripsiyon işlemine tabi tutuldu. Sentezlenen cDNA'lar PCR ile çoğaltıldı. PCR, "Taq DNA Polymerase High Purity" (BioBasic) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. PCR karışımına;

Kalıp cDNA	: 1 μ l
10X Reaksiyon tamponu	: 2,5 μ l
MgSO ₄ (20 mM)	: 2,5 μ l
dNTP (10 mM)	: 0,5 μ l
458R Fw2 (10 mM)	: 0,5 μ l
458R Rv2 (10 mM)	: 0,5 μ l
Taq DNA Polimeraz (5U/ μ l)	: 0,1 μ l bırakıldıktan sonra son hacim dH ₂ O ile

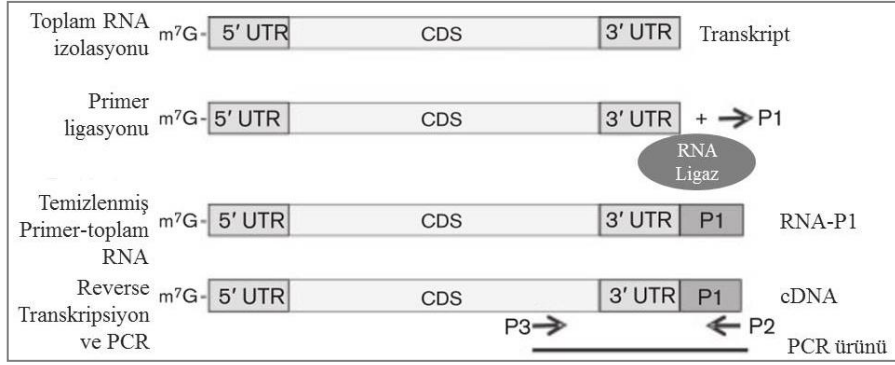
25 μ l'ye tamamlandı. Reaksiyon, 95°C'de 1 dakikalık ilk denatürasyonun ardından 35 döngü halinde;

95°C'de 20 saniye

58°C'de 20 saniye

72°C'de 45 saniye

72°C'de 10 dakika işlem uygulandıktan sonra PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforez işlemini takiben ultraviyole ışık altında görüntülendi.



Şekil 8. LACE yönteminin şematik görünümü

2.6. 458R Geninin 3' Ucunun Belirlenmesi

2.6.1. Genin 3' Ucunu İçeren cDNA'nın Oluşturulması

CIV genomu üzerinde, 458R geninin 3' ucunu belirlemek için Bölüm 2.5.2.2'de açıklanan LACE yöntemle elde edilen cDNA örneği kullanıldı. Bu cDNA örneklerinden 36. saatte oluşturulan en iyi sonuç verdiği için tercih edildi. cDNA'nın çoğaltılması için oluşturulan PCR karışımı;

Kalıp cDNA	: 1 µl
10X Reaksiyon tamponu	: 2,5 µl
MgSO ₄ (20 mM)	: 2,5 µl
dNTP (10 mM)	: 0,5 µl
458R Fw2 (10 mM)	: 0,5 µl
Lace P2 (10 mM)	: 0,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	: 0,1 µl şeklinde hazırlandıktan sonra dH ₂ O ile

25 µl'ye tamamlandı. 95°C'de 1 dakikalık ilk denatürasyonun ardından PCR reaksiyonu 30 döngü halinde;

95°C'de 20 saniye

58°C'de 30 saniye

72°C'de 90 saniye

72°C'de 10 dakika programıyla gerçekleştirildi. Daha sonra, PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi ve ultraviyole ışık altında görüntülendi. Beklenen

büyükteki DNA bantları jelden kesildikten sonra, DNA temizleme kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak temizlendi.

2.6.1.1. Genin 3' Ucunu İçeren cDNA'nın pJET1.2 Vektörüne Klonlanması

2.6.1.1.1. Kompetent *E. coli* DH10 β Hücrelerinin Oluşturulması

Klonlanma amacıyla ilk önce *E. coli* DH10 β hücreleri kompetent hale getirildi. Öncelikle petride bulunan DH10 β hücrelerinden kürdan yardımı ile tek bir koloni alınarak 5 ml Luria Bertani (LB) besiyerine inokülasyonu gerçekleştirildi. 37°C'de gece boyu büyütüldü. Ertesi gün bu kültürden 1:100 oranında LB besiyerine aşılama yapıldı. Hücreler 37°C'de 2 saat ve ardından 30°C'de 30 dakika, 200 rpm hızda sallanarak inkübe edildi. Hücre yoğunluğu 600 nm dalga boyunda OD 0,4 olana kadar büyütüldükten sonra, 10 dakika buzda bekletildi. Daha sonra, 6000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı uzaklaştırdıktan sonra pellet, 10 ml önceden hazırlanan soğuk "Frozen storage buffer" (FSB) ile çözüldü. 15 dakika buzda bekletilip tekrar 6000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Çökelti tekrar 10 ml FSB ile çözülüp 15 dakika buzda bekletildikten sonra 6000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Çökelti yaklaşık 4 ml FSB ile çözülerek mikrosantrifüj tüplerine 100'er μ l dağıtıldı. Hücreler kullanılmaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

2.6.1.1.2. Klonlama ve DNA Dizi Analizi

Jelden temizlenen DNA parçası pJET1.2 (CloneJet PCR Cloning Kit – Thermo Fisher Scientific) ara vektöre, tedarikçi firma talimatlarına göre, 3:1 oranında klonlandı. PCR'da kullanılan polimeraz sarkık uçlu ürünler oluşturduğu için hedef DNA parçasının uçları önce küt hale getirildi.

2X Reaksiyon tamponu : 10 μ l

PCR ürünü : 7 μ l

Blunting enzim : 1 μ l ile hazırlanan karışım 3-5 saniye hafifçe

vorteksledikten sonra 70°C'de 5 dakika inkübe edildi. Buza alınan örnek üzerine;

pJET1.2 vektör (50ng/ μ l) : 1 μ l

T4 DNA Ligaz (5U/ μ l) : 1 μ l eklendi. 3-5 saniye hafifçe vortekslenen örnek, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

Hedef DNA parçasını içeren vektör plazmitleri hücre içinde çoğaltmak için ligasyon ürünü, kompetent hale getirilmiş bakteri hücrelerine aktarıldı. Ligasyon ürününün DH10 β hücrelerine akarımı (transformasyonu) ısı şok yöntemi ile gerçekleştirildi. -80°C'de bulunan kompetent DH10 β hücresi buz üzerinde çözüldükten sonra üzerine 3-5 μ l ligasyon ürünü bırakıldı. 30 dakika buzda bekletilen hücreler 2 dakika 42°C'de ısı şoka maruz bırakıldı. Daha sonra bu hücreler 1 ml LB besiyerine aşılansarak 37°C'de, 200 rpm hızda bir saat büyütüldü. Bir saat sonunda mikrosantrifüj tüpüne alınan kültür 6000 xg'de 3 dakika santrifüj edildi.

Çökelti halindeki hücreler bir miktar besiyeri ile çözüldü. Kullanılan pJET1.2 vektörde bulunan amfisilin antibiyotik direnç geni nedeniyle hücreler, amfisilin antibiyotiği içeren LB agar petriye yayma ekim yapıldı. 37°C sıcaklıktaki etüvde bir gece inkübe edildi. Petride büyüyen kolonilerin, aktarılmak istenen plazmiti içerip içermediğini belirlemek amacıyla koloni PCR yapıldı. Bunun için reaksiyon,

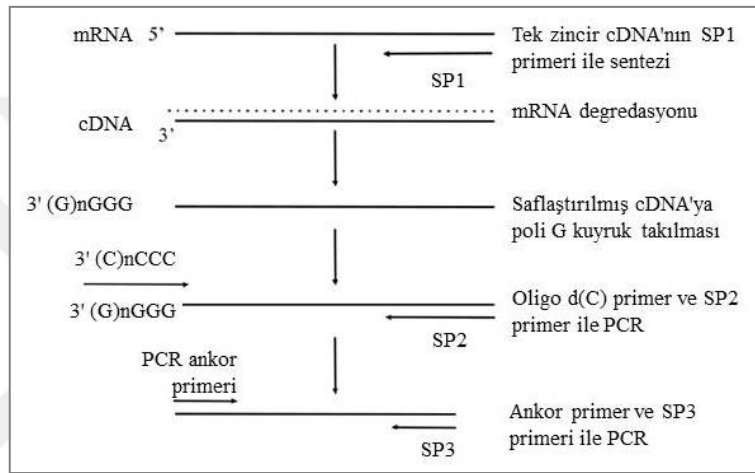
5X green Go-Taq tamponu	: 4 μ l
dNTP (10 mM)	: 0,4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	: 1,2 μ l
pJET1.2' ye özgü ileri ve geri primerler	: 0,8'er μ l
dH ₂ O	: 12,6 μ l
Taq-DNA polimeraz (5U/ μ l)	: 0,1 μ l toplamda son hacim 20 μ l

olacak şekilde oluşturuldu.

Koloni PCR ile klonlanan geni içerdiği belirlenen plazmitler *Bg/III* enzimi ile kesilerek doğrulukları teyit edildi. Doğrulan kolonilerden beş tanesinden dizi analizine gönderilmek üzere plazmit izolasyon kiti ile (Macherey-Nagel) tedarikçi firma talimatlarına göre plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmit DNA'larının konsantrasyonları spektrofotometrik olarak (Nanodrop-Thermo Fisher Scientific) ile ölçüldü. Örnekler 20 μ l hacimde 100 ng/ μ l'lik yoğunluklarda hazırlanarak MacroGen Firmasına (Hollanda) dizi analizi yapılması için gönderildi. DNA dizi analizi sonuçları Clustal Omega programı (URL-7) ile değerlendirilerek BioEdit programı ile hizalandı ve GENEDOC programı ile görüntülendi.

2.7. 458R Geninin 5' Ucunun Belirlenmesi

Genin 5' ucunda transkript olmayan bölgeyi tespit etmede RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) metodu tercih edildi. Deney, 5' uca T kuyruk yerine G kuyruk takılması dışında, kullanılan kitin (Roche) talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. G kuyruk tercihinin sebebi, CIV genomunun fazla miktarda A ve T bazları içermesidir. İzlenen deney süreci Şekil 9'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 9. RACE yönteminin şematik gösterimi

36. saatte toplanan toplam RNA'lerden 458R genine özgü SP1 primeri ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu işlem için reaksiyonun gerçekleştiği tüpe;

RNA	: 1 µg
10X M-MuLV tamponu	: 2 µl
dNTP (10 mM)	: 1 µl
458R SP1 (10mM)	: 2 µl
M-MuLV RT (200 U/µl)	: 1 µl
RNasin (40U/µl)	: 0,2 µl bırakıldıktan sonra reaksiyon hacmi

dH₂O ile 20 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım 1 saat süresince 42°C'de inkübe edildi. Ardından enzimi inaktif etmek için karışım, 65°C'de 20 dakika bekletildi. Bu karışımdan cDNA'lar, "PCR ürünü temizleme kiti" (Macherey-Nagel) kullanılarak temizledi. cDNA'ların 3' ucuna, kit içerisinde bulunan terminal transferaz enzimi ile G kuyruk takıldı. Reaksiyon;

Temizlenmiş cDNA : 19 µl
 10X Reaksiyon Tamponu : 2,5 µl
 dGTP (2mM) : 2,5 µl şeklinde hazırlandıktan sonra 94°C'de

3 dakika bekletilerek buz üzerine alındı. Üzerine 1 µl terminal transferaz eklendi ve 37°C'de yarım saat inkübe edildi. Daha sonra enzim inaktivasyonu için reaksiyon, 10 dakika 70°C'de bekletildi. Poli G kuyruk takılmış olan cDNA'lar, "Phusion Taq DNA Polimeraz" (NEB) enzimi kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Bu PCR için tüpe;

G kuyruğa sahip cDNA : 0,5 µl
 5X Reaksiyon tamponu : 10 µl
 dNTP (10mM) : 1 µl
 RACE Oligo d(C) primer : 2,5 µl
 SP2 primeri (10mM) : 2,5 µl
 Taq DNA Polimeraz : 0,5 µl bırakıldıktan sonra reaksiyon, 33 µl

dH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. 98°C'de 30 saniyelik ilk denatürasyonun ardından 30 döngü halinde;

98°C'de 10 saniye

56°C'de 20 saniye

72°C'de 12 saniye

72°C'de 10 dakika işlem uygulandıktan sonra ikinci PCR işlemine geçildi.

Reaksiyon;

Birinci PCR ürünü : 1 µl
 5X Reaksiyon tamponu : 10 µl
 dNTP (10mM) : 1 µl
 RACE Ankor primer : 2,5 µl
 SP3 primeri (10mM) : 2,5 µl
 Taq DNA Polimeraz : 0,5 µl
 dH₂O : 32,5 µl şeklinde hazırlanarak bir önceki PCR

şartlarında gerçekleştirildi. Bahsedilen koşullardan farklı olarak uzama süresi 72°C'de 12 saniye olarak ayarlandı. %1'lik agaroz jel elektroforez işlemi takiben ultraviyole ışık altında görüntülenen PCR ürünleri jelden temizlenerek pJET1.2 ara vektöre 3:1 oranında "küt uç ligasyonu" ile klonlandı.

dH ₂ O	: 6,1 µl
2X Reaksiyon tamponu	: 9 µl
PCR ürünü	: 0,9 µl
pJET1.2 vektör (50ng/ µl)	: 1 µl
T4 DNA Ligaz (5U/ µl)	: 1 µl eklendi. 3-5 saniye hafifçe vortekslenen

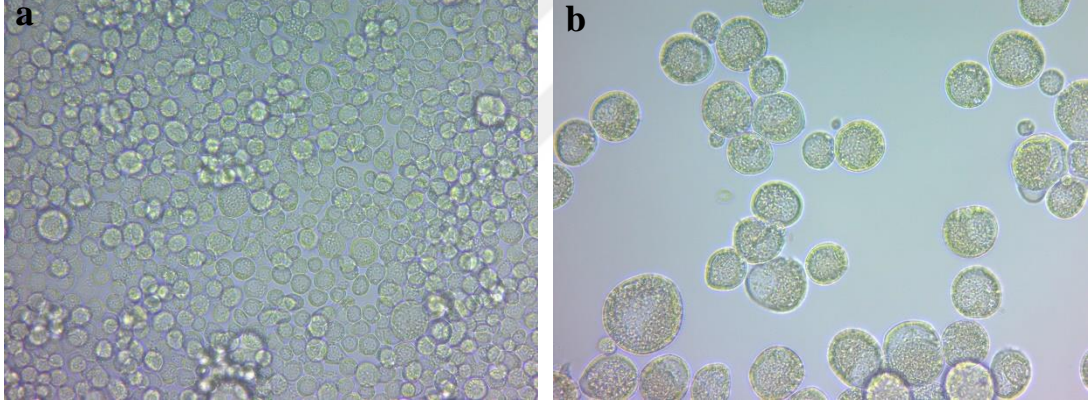
örnek, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

Transformasyon ve doğrulama analizleri, bölüm 2.6'da bahsedildiği şekilde gerçekleştirildi. İstenilen bölgeyi içerdiği belirlenen örnekler, 20 µl hacimde 100 ng/µl'lik yoğunluklarda hazırlanarak MacroGen Firmasına (Hollanda) dizi analizi için gönderildi. DNA dizi analizi sonuçları Clustal Omega programı (URL-7) ile değerlendirilerek BioEdit programı ile hizalandı ve GENEDOC programı ile görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyon Tayini

Tez çalışmaları süresince kullanılacak *Chilo* iridescent virüs (CIV)'ün üretimi *Anthonomus grandis* hücre kültüründe (BRL-AG-3A) gerçekleştirildi. Altı gözlü kültür kaplarında bulunan hücreler, CIV ile enfekte edildikten sonra etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi, hücrelerde meydana gelen değişiklikler göz önünde bulundurularak belirlendi. Enfeksiyonu takip eden beşinci günde hücrelerin boyutlarında bariz şekilde büyüme, tabandan fazlaca kopma, sitoplazmada yoğun granülleşme ve hücrelerin renklerinde koyulaşma gözlemlendi (Şekil 10). Gözlenen sitopatik etkiler neticesinde hücreler çöktürülerek enfeksiyon sıvısı alındı.



Şekil 10. *Anthonomus grandis* hücrelerinin (BRL-AG-3A) *Chilo* iridescent virüs (CIV) ile enfeksiyonu. a) Enfekte olmamış BRL-AG-3A hücreleri (20X büyütme), b) CIV ile enfekte olmuş BRL-AG-3A hücreleri (20X büyütme).

Enfeksiyon sıvısında bulunan virüslerin konsantrasyonunu belirlemek için EPDA metodu kullanıldı. Üç tekrarlı olarak 60 gözlü kültür kaplarında gerçekleştirilen deneyin sonuçları beş günlük inkübasyon süresi sonunda elde edildi. Beşinci günde kültür kabının tüm kuyularındaki hücrelerin gösterdiği enfeksiyon belirtileri inverted mikroskop altında, kontrol grubu ile karşılaştırma yapılarak tespit edildi. Enfeksiyon olan ve olmayan kuyulardaki hücreler not edilerek Reed-Muench metoduna göre virüsün konsantrasyonu hesaplandı (Reed ve Muench, 1938) (Şekil 12).

		Tekerrür					
Kontrol		-	-	-	-	-	-
Seyreltikler	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁶	+	+	+	-	+	-
	10 ⁻⁷	-	-	+	-	-	+
	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁹	-	-	-	-	-	-
			A	B	C	D	E

← %66
 ← %50
 ← %33,3

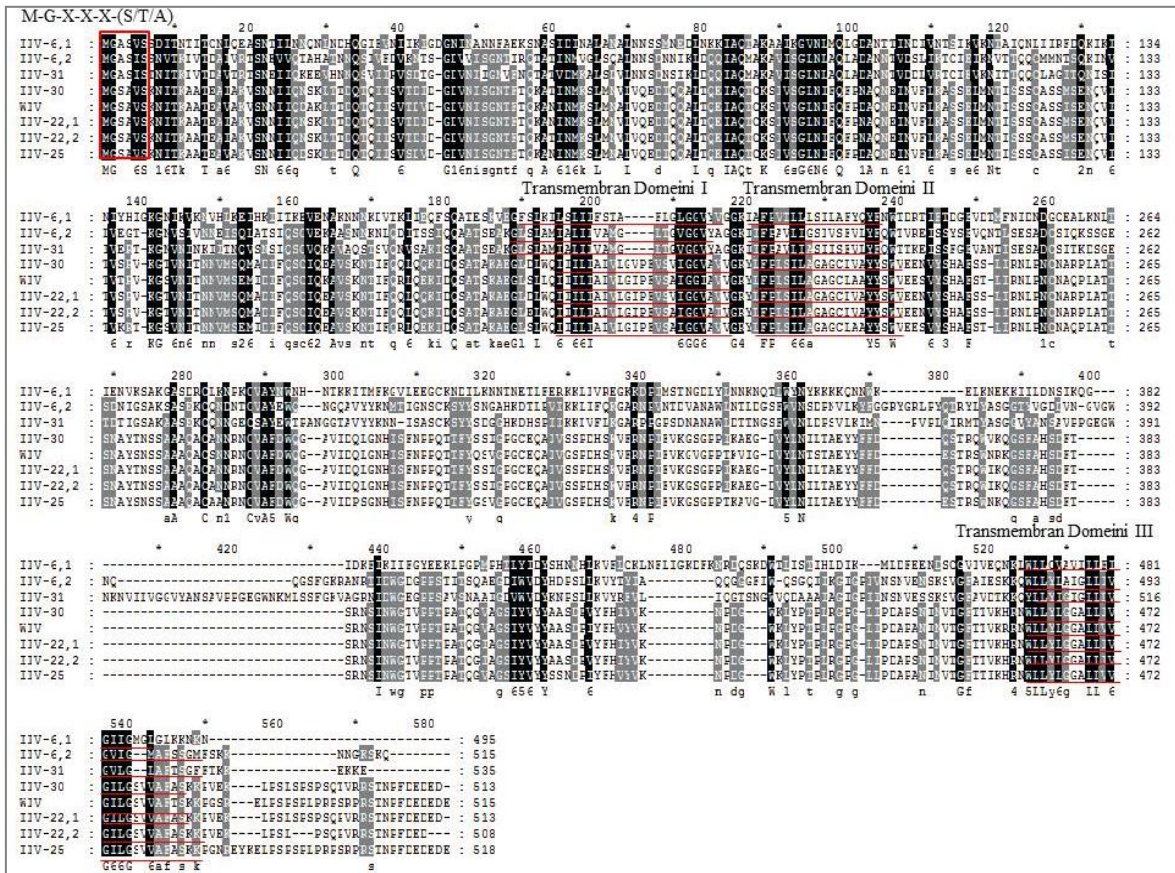
Şekil 11. EPDA yöntemiyle virüs konsantrasyonunun belirlenmesi. EPDA metodunda enfeksiyon belirtileri gözlenen hücrelerin bulunduğu kuyular artı, gözlenmeyen kuyular ise eksi ile ifade edilmiştir. Tabloda gösterilen oranlar toplam inokülasyondaki enfeksiyon oranlarını göstermektedir.

Enfeksiyon belirtileri göz önünde bulundurularak oluşturulan analiz tablosu için EPDA formülü uygulandı. Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneyin her tekrarı için aynı formül kullanıldı. Şekil 11’de, tek tekrar için hazırlanan tablo gösterilmektedir. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak tezde kullanılan ana virüs stoğunun konsantrasyonu $2,4 \times 10^8$ pfu/ml olarak belirlendi.

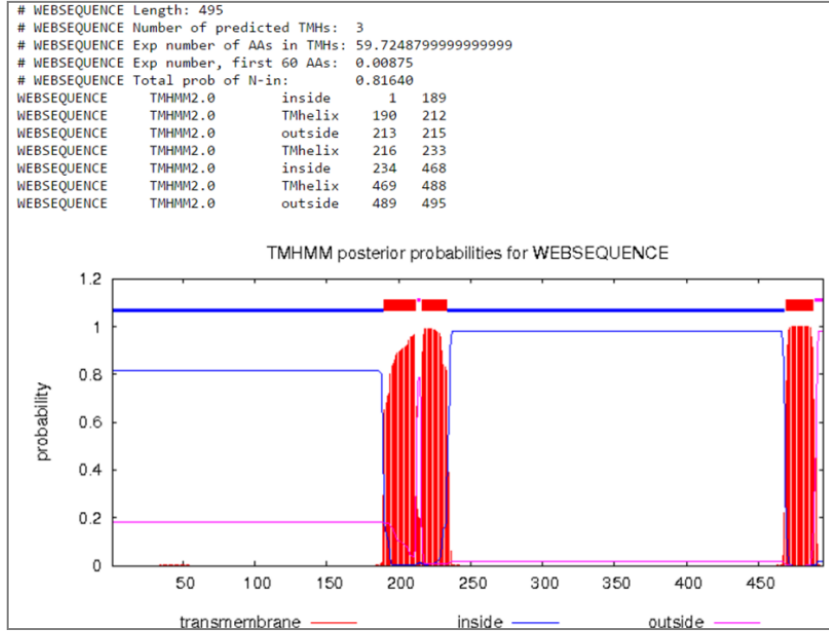
3.2. 458R Açık Okuma Zincirinin Biyoinformatik Analizi

“Muhtemel miristilasyonlu membran proteini” kodladığı ileri sürülen (Eaton vd., 2007; URL-8) CIV 458R açık okuma zinciri (ORF), 1488 baz çiftinden oluşmakta ve 495 amino asit kodlamaktadır (URL-8). Biyoinformatik analizler kapsamında, 458R geninin amino asit sırasına NCBI veri tabanından ulaşıldı. 458R’nin NCBI veri tabanında bulunan başka diziler ile benzerliği pBLAST analizi ile tespit edildi. Analiz sonucunda ilgili genin proteini ile en yüksek oranda benzerlik gösteren proteinin CIV’ye ait 118L olduğu belirlendi (Şekil 12). %30 benzerlik gösteren 118L’nin haricinde, başka 6 proteinin de 458R proteinine benzerlik gösterdiği belirlendi. Benzerlik gösteren proteinlerin dizileri, BioEdit programı ile hizalanarak GENEDOC programıyla görüntülendi. Tüm bu proteinlerin amino asit sıralarının N-terminalinde miristilasyon motifi [M-G-X-X-X-(S/T/A)] taşımakta olduğu görüldü.

Hizalanan dizilerin hepsinin üçer adet transmembran domeini içerdiği belirlendi. Transmembran domein bölgeleri TMHMM sunucu ile tespit edilmiş olup tüm dizileri temsilen sadece 458R'nin sonucu gösterilmiştir (Şekil 13). Elde edilen sonuçlar ışığında 458R proteininin tamamına yakınının membranın iç bölgesinde ve çok az kısmının membranın dışında konumlanmakta olduğu, üç adet transmembran heliksi içerdiği belirlenmiş oldu.

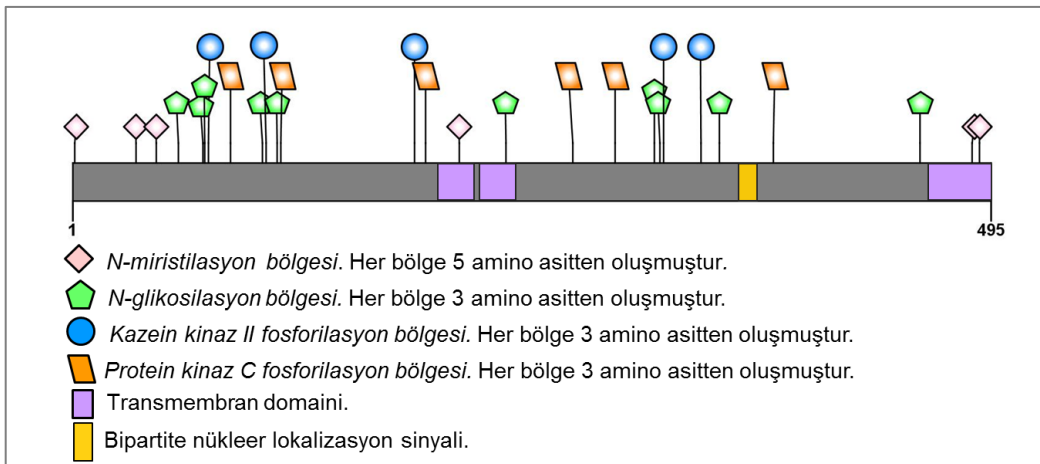


Şekil 12. 458R açık okuma zincirinin pBLAST analizi. IIV-6,1: *Invertebrate iridescent virus 6* 458R (NP_149921.1), IIV-6,2: *Invertebrate iridescent virus 6* 118L (NP_149581.1), IIV-31: *Invertebrate iridescent virus 31* 054R (YP_009046668.1), IIV-30: *Invertebrate iridescent virus 30* 072R (YP_009010366.1), WIV: *Wiseana iridescent virus* hipotetik protein (YP_004732788.1), IIV-22,1: *Invertebrate iridovirus 22* 067R (YP_008357365.1), IIV-22,2: *Invertebrate iridovirus 22* 071R (YP_009010832.1), IIV-25: *Invertebrate iridovirus 25* 074R (YP_009010607.1). Miristilasyon motifi kırmızı kutu içerisinde, transmembran domeinleri altı kırmızı ile çizili şekilde gösterilmiştir.



Şekil 13. 458R'nin transmembran domain içeriği. Kırmızı dalgalanmalar potansiyel transmembran domainlerini göstermektedir.

Tüm bu çalışmalara ilave olarak 458R geni ScanProsite programı ile de analiz edildi. Genin N-miristilasyon, N-glikolizasyon, kazein kinaz II fosforilasyon, protein kinaz C fosforilasyon, cAMP- ve cGMP- bağımlı protein kinaz fosforilasyon bölgeleri (Şekil 14); asparajin-zengin bölge profili ve bipartite nükleer lokalizasyon sinyal profili içerdiği belirlendi.



Şekil 14. 458R amino asit dizisinin içerdiği özel bölgeler ve domainler. IBS yazılımı (Liu vd., 2015) ile şematik olarak gösterilmiştir.

3.3. CIV 458R Geninin Transkripsiyonel Analizi

3.3.1. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi

3.3.1.1. RNA İzolasyonu

458R'nin hangi gen ifade sınıfına dahil olduğunu tespit etmek amacıyla DNA ve protein sentezi inhibitörleri varlığında CIV ile enfekte edilen BRL-AG-3A hücrelerinden toplam RNA izole edildi. DNA kalıntısı olma ihtimalini elimine etmek için RNA'lar DNaz I uygulamasına tabi tutuldu. Akabinde RNA'ların konsantrasyonları 260 dalga boyunda nanodrop ile ölçülerek belirlendi (Tablo 6). RNA miktarının ölçümünde 260/280 absorbans değerlerinin 2.00 olması, RNA'nın çalışmada kullanılabilecek yeterli saflıkta olduğunu göstermektedir.

Tablo 6. Gen ifade sınıfını belirlemek için izole edilen toplam RNA örnekleri

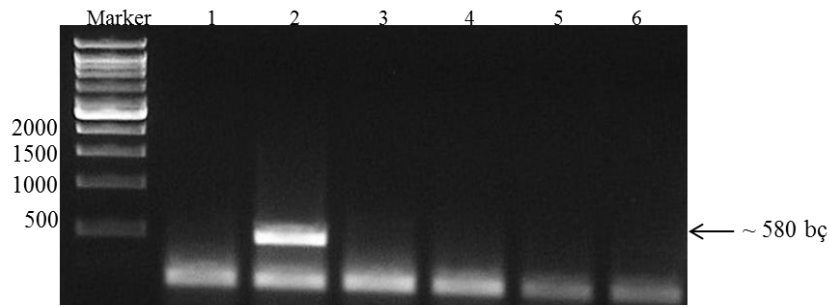
Örnek No	Örnek İsmi	RNA miktarı	260/280 Absorbans
		$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Değeri
1	BRL-AG-3A Kontrol	1217	2.05
2	BRL-AG-3A CIV	832	2.09
3	BRL-AG-3A Ara-C Kontrol	1266	2.06
4	BRL-AG-3A Ara-C CIV	1290	2.06
5	BRL-AG-3A CHX Kontrol	213	2.00
6	BRL-AG-3A CHX CIV	112	2.00

1) CIV ile enfekte olmamış ve inhibitörle muamele edilmemiş hücreler; 2) CIV ile enfekte olmuş ancak inhibitörle muamele edilmemiş hücreler; 3) CIV ile enfekte olmamış ancak DNA sentez inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler; 4) CIV ile enfekte olmuş ve DNA sentez inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler; 5) CIV ile enfekte olmamış ancak protein sentez inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler; 6) CIV ile enfekte olmuş ve protein sentez inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler.

3.3.1.2. Genin Transkripsiyon Sınıfını Belirlemek İçin cDNA Oluşturulması

İzole edilen toplam RNA örnekleri içerisinde 458R genine ait mRNA'nın ortamda olup olmadığını belirlemek için reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-

PCR) oluşturuldu. Bu kapsamda, 458R Rv2 primeri kullanılarak gene ait cDNA sentezi gerçekleştirildi. Daha sonra cDNA'lardan 458R Fw1 ve 458R Rv1 primerleri kullanılarak normal PCR yapıldı. Genin başlangıcından itibaren yaklaşık 580 bazlık bir bölge çoğaltacak şekilde tasarlanan bu primerlerle elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Ultraviyole ışık altında görüntülenen jelde; sadece CIV ile enfekte edilen ve hiçbir inhibitörle muamele edilmeyen grupta bant gözlemlendi (Şekil 15). Böylece, genin, DNA ve protein sentezi inhibitörleri varlığında ifade edilmediği, transkripsiyonu için DNA sentezine ihtiyaç duyduğu belirlendi.



Şekil 15. CIV 458R geninin transkripsiyon sınıfı. Marker: 1 kb DNA ladder (Vivantis); 1: Enfekte olmamış, inhibitörle muamele edilmemiş; 2: CIV ile enfekte olmuş, inhibitörle muamele edilmemiş; 3: CIV ile enfekte olmamış, DNA sentez inhibitörü ile muamele edilmiş; 4: CIV ile enfekte olmuş ve DNA sentez inhibitörü ile muamele edilmiş; 5: CIV ile enfekte olmamış, protein sentez inhibitörü ile muamele edilmiş; 6: CIV ile enfekte olmuş ve protein sentez inhibitörü ile muamele edilmiş hücrelerin cDNA'larından yapılan PCR'ın ürünleri.

3.3.2. Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi

3.3.2.1. RNA İzolasyonu

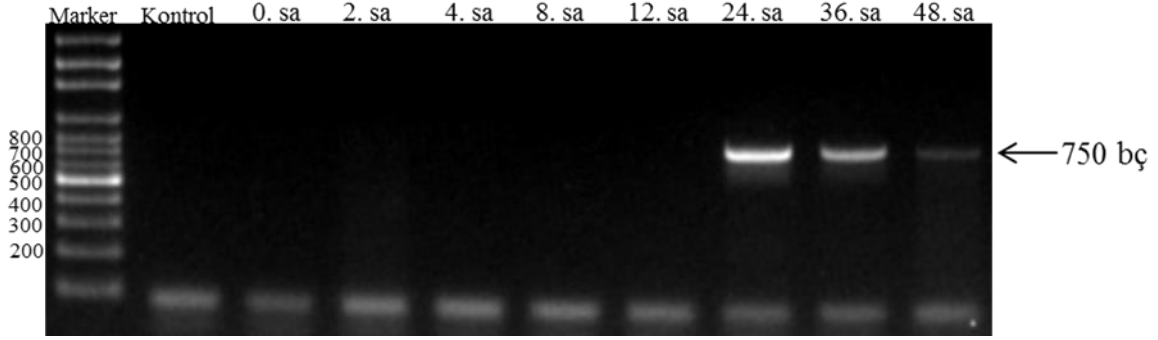
CIV 458R genin enfeksiyondan sonra hangi saatler arasında ifade edildiğini belirlemek için, enfeksiyondan sonra sekiz farklı zamanda (0., 2., 4., 8., 12., 24., 36., 48. saatlerde) toplanan hücrelerden toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların DNaz I ile muamelesinden sonra 260 nm dalga boyunda nanodrop ile konsantrasyonları ölçüldü (Tablo 7). RNA'nın saflığını gösteren 260/280 absorbans değeri dikkate alınarak RNA'ların çalışmada kullanılabilecek miktar ve saflıkta olduğu belirlendi.

Tablo 7. Gen ifade zamanını belirlemek için izole edilen RNA örnekleri

Örnek	RNA miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280 Absorbans Değeri
Kontrol	1440	2.07
0.saat	1247	2.06
2.saat	1847	2.07
4.saat	1224	2.09
8.saat	1438	2.09
12.saat	1045	2.07
24.saat	1124	2.09
36.saat	460	2.01
48.saat	357	2.02

3.3.2.2. Genin Transkripsiyon Zamanını Belirlemek İçin cDNA Oluşturulması

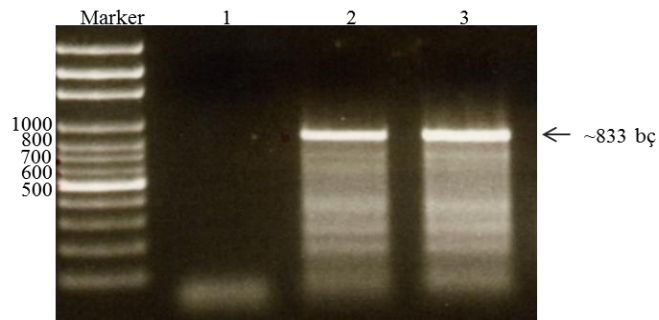
Enfeksiyondan sonra belirtilen saatlerde hücrelerden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezini gerçekleştirmek üzere LACE tekniği kullanıldı. İzole edilen RNA'ların 3' ucuna takılan LACE P1 primeri ve bu primere komplementer olan LACE P2 primeri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Gene özgü 458R Fw2 ve 458R Rv2 primerleri kullanılarak sentezlenen cDNA'lardan PCR yapıldı. %1'lik agaroz jelde elektroforez edilen PCR ürünleri, ultraviyole ışık altında görüntülendi. PCR reaksiyonu sonucunda seçilen primerler ile elde edilmesi beklenen yaklaşık 750 bazlık bant, 24., 36., 48. saatlerde gözlemlendi (Şekil 16). Bu bağlamda, 458R geninin transkripsiyonunun, enfeksiyon başlangıcını takip eden 12 ila 24. saatler arasında başladığı, 24. saatte transkripsiyonun en yüksek seviyede gerçekleştiği ve 48. saate kadar azalarak devam ettiği belirlendi.



Şekil 16. CIV 458R geninin transkripsiyon zamanı. Marker: 100 bp DNA ladder (Solid Biodyne); Kontrol: Enfekte edilmemiş hücre örneğini; 0-48: enfeksiyonun başlangıcından sonra toplanan örneklerin saatlerini temsil etmektedir.

3.4. 458R Geni mRNA'sının 3' Ucunun Belirlenmesi

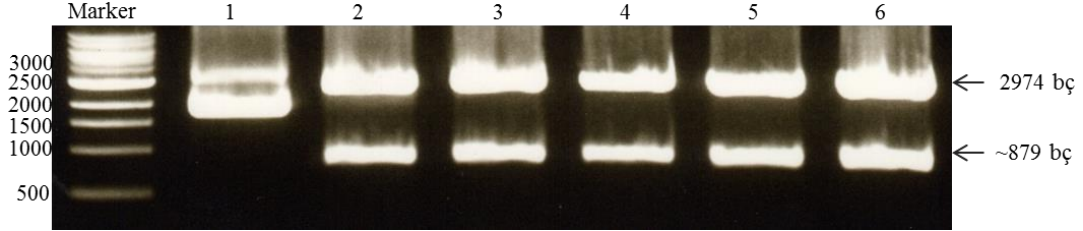
458R'nin 3' ucunu belirlemek için LACE yönteminden yararlanıldı. Genin transkripsiyon zamanını tespit etmek için 36. saatte toplanan toplam RNA'lerden 458R genine ait sentezlenen cDNA (Bölüm 3.3.2.1), genin 3' analizinde de kullanıldı. 36. saate ait cDNA örnekleri, 458R Fw2 ve LACE P2 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Bu iki primer yaklaşık olarak 833 bazlık bir bölgeyi çoğaltacak özelliكتedir. PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmasının neticesinde, beklenen bölgede bant gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17. CIV 458R geninin 3' ucunu belirlemek için 36. saate ait mRNA'dan oluşturulan cDNA. Marker: 100 bp DNA ladder (Solid Biodyne); 1: Negatif kontrol; 2 ve 3: 36. saate ait cDNA'lar ile yapılan PCR ürünleri.

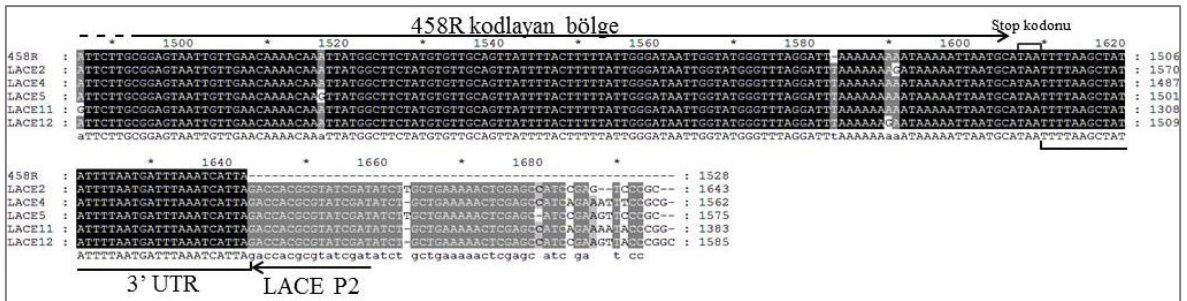
CIV 458R genine ait yaklaşık 833 bp büyüklüğünde gözlenen bant jelden temizlenerek pJET1.2 (2974 bp) ara vektöre klonlandı. Klonlama sonucunda plazmitin

hedef DNA'yı içerdiği, koloni PCR ile belirlendikten sonra restriksiyon endonükleaz kesimleri ile doğrulandı (Şekil 18).



Şekil 18. pJET1.2 ara vektöre klonlanan CIV 458R cDNA 3' uç örneklerinin *Bgl* II restriksiyon enzimi ile kesimi. Marker: 1 kb DNA ladder (Vivantis); 1: İnsert içeren kesilmemiş pJET1.2 plazmit; 2, 3, 4, 5, 6: Klonlanmak istenen inserti içerdiği düşünülen farklı 5 plazmit.

Doğrulan plazmitlerin DNA dizi analizleri sonucunda; genin 3' translasyona uğramayan bölgesinin stop kodundan (TAA) itibaren 40 nükleotid uzunluğunda bir bölge olduğu belirlendi (Şekil 19). Bu bölgedeki nükleotidlerin ve bölgenin uzunluğunun, dizisi belirlenen tüm plazmitlerde ortak olduğu görüldü.

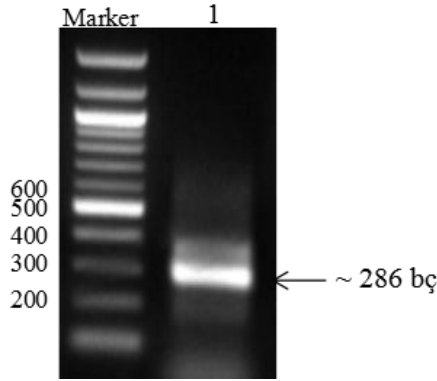


Şekil 19. 458R mRNA 3' bölgesinin dizisi. 458R: 458R geninin dizisi; LACE2, LACE4, LACE5, LACE11, LACE12: Hedef gen parçaları içeren farklı pJET1.2 vektörlerin dizisi.

3.5. 458R Geni mRNA'sının 5' Ucunun Belirlenmesi

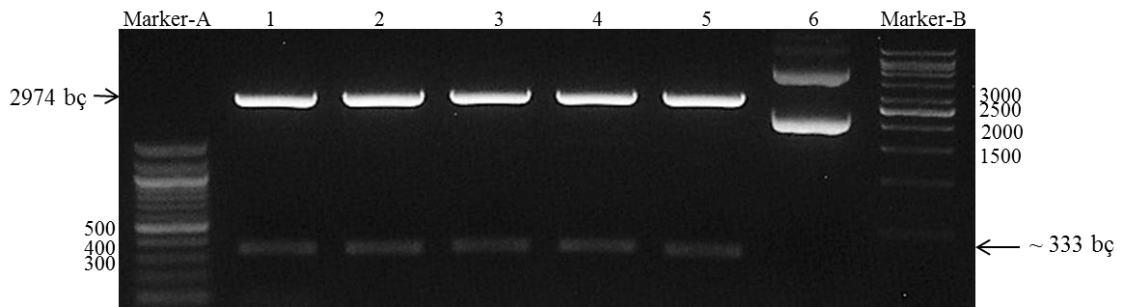
CIV 458R geninin 5' ucunun tespitinde RACE yöntemi kullanıldı. 36. saatte toplanan toplam RNA örneği, 458R genine özgü SP1 primeri kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Elde edilen cDNA'lara terminal transferaz enzimi ile "poli G kuyruk" takıldı. Poli G kuyruk takılı cDNA'lar, RACE oligo d(C) primeri ve 458R genine özgü SP2

primeri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Bir miktar PCR ürünü agaroz jelde görüntülendi. Bu PCR ürünlerinin geri kalanları tüpten temizlenerek yeni PCR için kalıp olarak kullanıldı. RACE ankor primer ve 458R genine özgü SP3 primeri kullanılarak oluşturulan yaklaşık 286 bç büyüklükteki PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde elektroforez edilerek incelendi (Şekil 20).



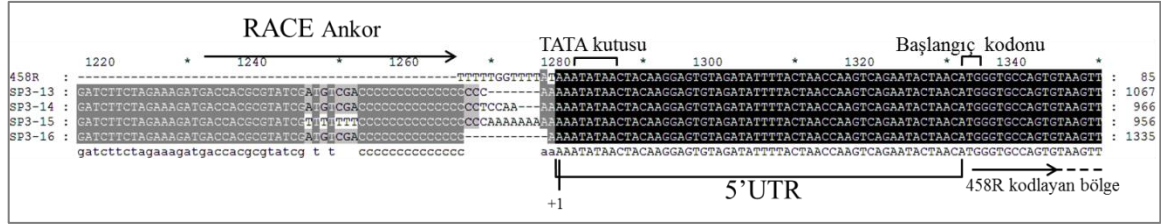
Şekil 20. CIV 458R geninin 5' ucuna ait oluşturulan cDNA'lar. Marker: 100 bp DNA ladder (NEB); 1: RACE Ankor ve SP3 primeri ile çoğaltılan DNA parçası.

RACE Ankor ve SP3 primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucunda beklenen bölgede gözlenen bant jelden temizlenerek pJET1.2 ara vektöre klonlandı. Vektörün hedef DNA'yı içerdiği, koloni PCR ve restriksiyon endonükleaz kesimler ile doğrulandı (Şekil 21).



Şekil 21. pJET1.2 ara vektöre klonlanan CIV 458R cDNA 5' uç örneklerinin *Bgl* II restriksiyon enzimi ile kesimi. Marker-A: 100 bp DNA ladder (NEB); 1,2,3,4,5: Klonlanmak istenen inserti içerdiği düşünülen farklı 5 plazmit; 6: İntert içeren kesilmemiş pJET1.2 plazmit; Marker-B: 1 kb DNA ladder (Vivantis).

CIV 458R cDNA'sının 5' ucunu içerdiği tespit edilen plazmitlerin DNA dizi analizleri neticesinde; genin 5' translyasyona uğramayan bölgesinin, başlangıç kodonunun (ATG) yukarısında 53 nükleotid uzunluğunda bir bölge olduğu tespit edildi (Şekil 22). Ayrıca +1 ila +4 nükleotidleri arasında "AAAT" motifinin bulunduğu ve transkripsiyon başlangıç noktasından 2 baz aşağıda TATA kutusunun konumlandığı gözlemlendi (Şekil 22).



Şekil 22. 458R mRNA 5' bölgesinin dizisi. 458R: 458R geninin dizisi; SP3-13, SP3-14, SP3-15, SP3-16: Hedef gen parçaları içeren farklı pJET1.2 vektörlerin dizisi.

4. TARTIŞMA

Chilo iridescent virüs (CIV) pirinç kök delici kurdu olan *Chilo suppressalis*'den izole edilmiş olup (Fukaya ve Nasu, 1966); Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera ordolarına ait toplam 100'den fazla böcek türü üzerinde enfeksiyon yapabilme özelliğine sahiptir (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; Fukuda, 1971). Zararlı böcekler üzerinde oluşturduğu patojenite ve yapısal proteinlerinin insektisidal aktiviteye sahip olması nedeniyle biyopestisit olarak kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır (Bilimoria, 2001; Bilimoria, 2009; D'Costa vd., 2012). CIV'nin memeli hücrelerine girebilmesine rağmen hücre içerisinde çoğalmadığı, ancak sebep olduğu immün yanıt sayesinde bazı virüslerin replikasyonunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Ahlers vd., 2016). Bu sayede CIV temelli aşı ve teröpatik çalışmaların önü açılmıştır. CIV'nin kullanım potansiyeli olan alanlar göz önünde bulundurulduğunda, virüsün moleküler özelliklerinin ve replikasyon mekanizmasının detaylı incelenmesi gerekmektedir. Bu çerçevede, virüs genomunda bulunan genlerin yapısal ve transkripsiyonel özelliklerinin aydınlatılması yapılacak fonksiyonel çalışmalar için önemli bir temel oluşturmaktadır. Bu bilgiler kapsamında 458R açık okuma zincirinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin aydınlatılmasının virüs replikasyonu ve genomik yapısının anlaşılmasına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tez kapsamında yapılan biyoinformatik analizler neticesinde, CIV 458R'nin en yüksek benzerliği yine aynı virüse ait 118L kodlu ORF ile gösterdiği ve bu benzerlik oranının %30 olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, 458R kodlu ORF FV-3 53R, SGIV 088L (Song vd., 2004; Eaton vd., 2010) ile benzerlik göstermektedir. 118L geni ayrıca RGV 53R ORF'si ile de (İnce vd., 2010) benzerlik göstermektedir. 458R, 118L, FV-3 53R'nin kodladıkları proteinler, muhtemel miristilasyonlu membran proteini olarak adlandırılmakta ve 088L dahil dördü de öz gen olarak tanımlanmaktadır (Eaton vd., 2007). FV-3 53R'nin viriyon inşası için gerekli bir gen olduğu ve ifadesinin engellenmesi ile olgun viriyon oluşumunda azalma gözlemlendiği bilinmektedir (Whitley vd., 2010). FV-3'ün muhtemelen bir suşu olan RGV'ün 53R geni (%99 oranında FV-3 53R geni ile benzerdir), tüm dizin analizi yapılmış iridovirüslerde homologları bulunan bir genidir (Kim vd., 2010) ve bir zarf proteini kodlamaktadır (Zhao vd., 2008). Bu geninin, virüs replikasyonu ve inşasının yanında ayrıca virüs enfeksiyonu ve oluşumuna da katkısı vardır (He vd., 2013). SGIV

088L geç geni bir zarf proteini kodlamaktadır ve bu gen familyanın öz genlerindedir (Zhou vd., 2011). Aynı zamanda 088L geni tarafından kodlanan protein, SGIV enfeksiyonu için önemli bir role sahiptir ve virüsün neden olduğu hastalıkların kontrolü için potansiyel bir hedeftir (Yuan vd., 2016).

Virüsler bir hücreyi enfekte etmek için birçok durumun üstesinden gelmek zorundadır. Bunlar hücreye giriş, genom replikasyonu ve proteinlerin ifade edilerek yeni virüsler oluşturma süreçleridir. Viral proteinlerin ifade edildikten sonra yeni viriyon oluşturmak üzere gerekli bölgelere ulaşmaları gerekmektedir. Akabinde bu viriyonlar olgunlaşmalı ve hücreden salınmalıdır. Miristilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar sayesinde, virüsün enfeksiyon döngüsünün başarılı bir şekilde tamamlanması sağlanmaktadır (Martin vd., 1997). Miristilasyonun, ökaryotlar ve ökaryotik virüslerde translasyonla eş zamanlı olarak gerçekleşen bir modifikasyon olduğu bilgisi de literatürde mevcuttur (Farazi vd., 2001). Birçok viral protein miristillenir ve miristilasyon, proteinlerin membran ile bağlanması ve uygun lokalizasyonları için önemlidir (Bastidas vd., 2012). Miristilli viral proteinler (MVP) virüs olgunlaşma sürecinde, çoğunlukla konakçı hücrenin plazma membranlarıyla kaynaştırma yoluyla virüs inşasında farklı roller oynamaktadır (Harper ve Gilbert, 1995). MVP'lerin virüs inşası, yapısı, tomurcuklanma ve konak etkileşimlerindeki rolünün yanı sıra virüsün hücreye girişinde de görev yaptıkları belirtilmektedir (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). MVP'lerin, insan bağışıklık yetmezliği virüsü 1 (HIV-1), arenavirüsler, ASFV, vaccinia virüsü dahil birçok virüsün inşası için gerekli olduğu bilinmektedir (Göttlinger vd., 1989; Bryant ve Ratner, 1990; Martin vd., 1997, 1999; Capul vd., 2007; Andrés vd., 2002a). Miristilasyonun engellenmesi yavru viriyonların oluşumunu veya salınımını etkilemektedir (Martin vd., 1997). Büyük DNA virüslerinden vaksiniya virüsün (VV) miristilli transmembran proteini olan ve birinci zarf içine konumlanan L1R'in, poxvirüsler dışında homologlarının bulunduğu bilinmektedir (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). L1R geni membran-ilişkili bir genidir (Whitley vd., 2010) ve 458R geni ile arasında korunmuş bir yapı benzerliği vardır (Maurer-Stroh ve Eisenhaber, 2004). Geç bir miristilli protein olan L1R'nin ifade edilemediğinde oluşan viriyonların olgunlaşmamış olması ve enfeksiyon yapabilme yeteneklerinin olmaması, bu proteinin morfogenezde önemli rol oynadığını göstermektedir (Martin vd., 1997). Miristilli proteinler hem membran-ilişkili hemde sitoplazmik bölgelerde gözlenmektedir (Harper ve Gilbert, 1995). Bahsi geçen 53R (RGV ve FV-3), 088L (SGIV), L1R (VV), 118L (CIV) genlerinin *N*-terminalinde bulunan miristilasyon

motifinin [M-G-X-X-X-(S/T/A)] (Duronio vd., 1991; Martin, 1998; Farazi vd., 2001; Zhao vd., 2008) 458R geninde de mevcut olduğu (Şekil 12) tez kapsamında yapılan analizlerle belirlenmiştir. Böylelikle 458R tarafından kodlanan ve muhtemel mirisitlasyonlu olduğu belirtilen protein, virüs replikasyonu ve/veya virüsün hücreye girişte membrana tutunması için gerekli olabilir. Ayrıca 458R'nin, virüs inşası ve/veya olgunlaşması için önemli bir proteini kodladığı düşünülmektedir.

458R geni üç adet transmembran domeinine sahiptir. CIV yapısal genlerin arasındaki etkileşimlerin maya iki hibrit sistemi ile tespit edildiği bir çalışmada kullanılan genlerin 17 tanesi (010R, 034R, 061R, 084L, 111R, 117L, 118R, 138R, 203L, 213R, 234R, 307L, 312R, 337L, 325L, 361L, 457L) transmembran domeini içermektedir (Özşahin, 2015). Transmembran domeini içeren bu proteinlerden 13 tanesi integral membran proteinleri olarak tanımlanmıştır (İnce vd., 2015). İntegral proteinlerin büyük çoğunluğu zar içerisinde bulunan hidrofobik transmembran heliksler ile membrana tutunur (Kristensen vd., 2015). CIV öz genlerinden olan 118L üç adet transmembran domeini içermektedir. SGIV'ye ait VP088 proteininin zarf füzyonunda yer alabileceğini düşündüren üç baskın transmembran domein içerdiği belirtilmektedir (Zhou vd., 2011). Membran-ilişkili VV L1R (Martin, 1997), FV-3 53R ve zarf proteini kodlayan RGV 53R (Zhao vd., 2008) genleri iki adet transmembran domaini içermektedir. Bu açıdan bakıldığında 458R'nin bir zarf proteini kodladığı ve virüsün hücreye giriş mekanizmasında görev aldığı düşünülebilir.

Yapılan biyoinformatik analizler doğrultusunda ve gerçekleştirilen literatür araştırmaları neticesinde, CIV'e ait 458R açık okuma zincirinin virüsün inşası, olgunlaşması, enfeksiyon yapabilme yeteneği kazanması ve/veya hücreye tutunması için gerekli miristilasyonlu ve transmembran domeinine sahip bir yapısal protein kodladığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, fonksiyonel çalışmalara temel teşkil edebilecek 458R açık okuma zincirinin yapısal ve transkripsiyonel özellikleri araştırılmıştır.

Transkripsiyonel olarak aktif bir gen olduğu ileri sürülen 458R (D'Costa vd., 2004) açık okuma zincirinin bu çalışmada hangi gen ifade sınıfına dahil olduğu araştırılmıştır. Gen ifade sınıfının belirlenmesi, belirli bir sınıfın genlerinin ortak promotor elementleri paylaşıp paylaşmadığının belirlenmesinde ve bu bölgelerle etkileşime giren viral ve/veya konakçı faktörlerin tanımlanması için ilk adımdır (Majji vd., 2009). Bu bağlamda, 458R geninin DNA sentez inhibitörü ve protein sentez inhibitörü varlığında transkripsiyonunun gerçekleşmediği, genin ifadesi için protein sentezine ihtiyaç duyduğu

dolayısı ile “geç gen” olduğu belirlenmiştir. Geç genler genellikle enzimler (Martin, 1998) ve virüs yapısal proteinlerini kodlamaktadır (Martin, 1998; Chambers vd., 1999; Ebrahimi vd., 2003; Lua vd., 2005; Wan vd., 2010). Fakat yapısal proteinlerin sadece geç genler tarafından kodlandığına dair bir yanılgıya düşülmemelidir. Çünkü CIV ile yapılan çalışmalar, gen ifade sınıflarının tümünün bünyesinde yapısal protein kodlayan genler bulunduğunu göstermiştir (İnce vd., 2013; İnce vd., 2015). Geç transkriptler, viral replikasyonun sonraki aşamalarında ve yeni oluşan DNA’dan sentezlenir (D’Costa vd., 2001). Geç mRNA’ların transkripsiyonu enfekte hücrenin sitoplazmasında olabileceği gibi, virüs inşa bölgesinde de gerçekleşebilmektedir (Nalçacıoğlu vd., 2009). Poxvirüslerin aksine, *Iridoviridae* familyası üyelerinin geç genlerinin transkripsiyonu için erken mesajların tamamen bozulması gerekmez (D’Costa vd., 2001). Erken transkriptler, enfeksiyonun erken aşamalarında ifade olmalarına rağmen, geç genlerin transkripsiyonu başladıktan sonra dahi görünür seviyede ortamda bulunurlar (D’Costa vd., 2001). Geç genlerin virüs inşasında veya olgunlaşma süreçlerinin hangisinde rol alacağı, translasyon sonrası modifikasyonlarla belirlenmektedir (Martin, 1998). Vaksiniya virüste erken genlerin transkripsiyonu için RNA polimeraza sıkı bir şekilde bağlanan PAR94 proteini geç bir proteindir. Bu protein, erken transkripsiyon için gerekli olan RNA polimerazın ve diğer bileşenlerin viriyon inşası sürecinde paketlenmesi için gereklidir (Yang ve Moss, 2009). 458R geninin ürünü yapısal proteinler arasında yer almadığı daha önceki çalışmalarda (İnce vd., 2010) belirtilmekle birlikte, geç gen olması nedeniyle şu andan itibaren bir yapısal protein kodladığı düşüncesi oluşmaktadır.

CIV virionlarının yapısında bulunan yani yapısal olan proteinlerin konak makromoleküler sentezini durdurduğu (Cerutti ve Devauchelle, 1980), virüse ait erken genlerin transaktivasyonunu sağladığı bilinmektedir (Nalçacıoğlu vd., 2003; İnce vd., 2013). CIV genomunda transkripsiyonu gerçekleştiren genler Northern blot (D’Costa vd., 2004), RT-PCR (İnce vd., 2013) ve kütle spektroskopisi (İnce vd., 2015) yöntemleri ile araştırılmıştır. Northern blot analizinde tüm genomda transkripsiyonu gerçekleştiren 137 genin 65 tanesi geç gen olarak tanımlanmıştır. RT-PCR yöntemi ile tespit edilebilen 41 adet yapısal proteinden 7 tanesinin geç gen ürünleri olduğu belirlenmiştir. Kütle spektroskopisi ile yapılan çalışmada ise 95 adet genin ifade edildiği ve bunlardan 37 tanesinin virüs yapısal proteini kodladığı belirtilmiştir. Bu 37 proteinin ise 7 tanesinin geç gen ifade grubuna dahil olan genler tarafından kodlandığı ifade edilmiştir. CIV yapısal transkriptlerinden 159L, 198R, 234R, 274L, 317L, 342R, 401R (İnce vd., 2013), 268L,

325L, 443R, 453R genleri (İnce vd., 2015) gen geç ifade sınıfına dahildir. RGV 53R (Zhao vd., 2008), SGIV 088L (Zhou vd., 2011), VV L1R (Martin vd., 1997) genleri de geç genlerdir. CIV geç genlerinden olan 282R, 287R, 295L genleri bipartite nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) profilleri içermektedir (D'Costa vd., 2004). Viral replikasyonun muhtemel nükleer fazı göz önüne alındığında, NLS içeren proteinler bu süreç için gereklidir (D'Costa vd., 2004). NLS taşıyan proteinler, virüs DNA replikasyonu ve virüs inşası için gerekli proteinleri nükleusa yönlendirmektedir (Özşahin, 2015). Tez kapsamında 458R'nin NLS taşıdığı, bilgisayar temelli analizlerle tespit edilmiştir (Şekil 14). 458R geninin miristilasyon domeini içermesi, geç gen olması ve NLS taşıması, genin virüs DNA'sının replikasyonunda görev yaptığını veya virüs inşasında gerekli olan proteinlerin üretilmesi için nükleusa gitmesi gereken bir protein kodladığını gösterebilir.

Tez çalışması dahilinde gerçekleştirilen bir diğer analiz ise 458R geninin transkripsiyonunun gerçekleştiği zaman aralıklarının belirlenmesidir. LACE yöntemi ile gerçekleştirilen bu çalışmada 458R geninin, enfeksiyonu takiben 12 ila 24. saatler arasında transkripsiyonun başladığı ve 48. saate kadar azalarak devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum, CIV geç gen transkripsiyonlarının 6., 12. ya da 24. saatlerde gerçekleştiği (D'Costa vd., 2004) bilgisi ile uyumludur. Ayrıca bir zarf proteini kodlayan RGV 53R transkriptlerinin enfeksiyonu takiben 12. saatte ortamda tespit edilmesi ve geç gen olarak tanımlanması (Zhao vd., 2008) 458R transkriptinin özellikleri ile uyumludur ve 458R'nin de yapısal protein kodluyor olma ihtimali destekleyebilir.

Bir gen anatomik bakımdan promotor bölgesi, transkripsiyon başlangıç bölgesi (5' UTR), kodlayan kısım ve translasyon bitiş bölgesi (3' UTR) şeklinde detaylandırılır. Tez kapsamında 458R geninin anatomik yapısı kısmen aydınlatılmıştır. Promotor bölgesinin tespiti hariç 5' ve 3' UTR ve protein kodlayan bölgeler belirlenmiştir.

5' UTR analizinde RACE yöntemi (Frohman vd., 1988) tercih edilmiştir. Başlangıç kodonunun yukarısında 53 nükleotitlik bölge, genin 5' translasyona uğramayan kısmını oluşturmaktadır. 458R genin 5' bölgesinde +1 ila +4 nükleotidleri arasında konumlanmış, CIV DNAPol geninin 5' ucunda bulunan "AAAAT" (Nalçacıoğlu vd., 2007) motifine benzeyen "AAAT" motifi mevcuttur. Gecikmiş erken bir gen olan DNAPol geninin promotor aktivasyonu için gerekli olduğu belirtilen bu motifin (Nalçacıoğlu vd., 2007), gecikmiş erken gen promotor aktiviteleri için korunmuş bir regülasyona işaret edip etmediği konusunda kesin bir yargı yoktur. Ancak bu tez çalışması sonucunda geç gen olduğu belirlenen 458R geninin de 5' ucunda bahsi geçen motife benzer bir nükleotid

dizisinin varlığı, “AAAAT” motifinin yalnızca gecikmiş erken genlere özgü olmadığını gösterebilir. İlaveten, 458R promotor analizi yapılarak bu motifin promotor aktivasyonunda bir etkisi olup olmadığı açıklığa kavuşturulabilir. Genin 3' UTR analizinde ise, genin zamanını belirlemek için oluşturulan cDNA örnekleri kullanılmıştır. Tez dahilinde, genomda 458R geninin stop kodonunun aşağısında bulunan 40 nükleotidlik bölgenin, 458R geni 3' UTR bölgesi olduğu belirlenmiştir. 458R cDNA'sının dizi analizi neticesinde stop kodonundan sonra poli A kuyruk bulunmamasının tespiti, CIV mRNA'larının oligo d(T) primer ile çoğaltılamamasının somut kanıtı niteliğindedir. Hatta CIV mRNA'larının 3' ucunda transkripsiyon esnasında veya sonrasında bir modifikasyona uğramadığı söylenebilir.

Sonuç olarak tez kapsamında yapılan çalışma ve araştırmaların neticeleri özetlenecek olursa; CIV 458R açık okuma zincirinin transkripsiyonel analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda; 458R kodlu ORF, transkripsiyonu enfeksiyonu takiben 12 ila 24. saatler arasında başlayan ve 48. saate kadar azalarak devam eden bir genidir. DNA sentez inhibitörü ve protein sentez inhibitörleri varlığında ortamda bulunmayışı nedeniyle geç gen ifade sınıfına dahil bir genidir. İçerdiği miristilasyon domeinleri nedeniyle “Muhtemel miristilasyon membran proteini” kodladığı belirtilen bu gen, üç adet transmembran heliksi, nükleer lokalizasyon sinyali taşımaktadır. İçerdiği domeinler ve sinyaller nedeniyle 458R, virüsün inşasında, olgun viriyon oluşumunda, viral replikasyonda görev yapan bir protein kodladığı düşünülmektedir. Geç gen olduğu için yapısal bir protein kodluyor olma ihtimali ise virüs inşasında gerekli olduğu fikrini destekler niteliktedir. Ayrıca benzerlik gösterdiği genler ile yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, 458R'nin protein kodlayan bir öz gen olabileceği, bir zarf proteini kodladığı öngörülmektedir. Genin anatomik yapısı incelendiğinde; CIV genomunun 207044-208531. bazlar arasındaki bölge, 458R geninin kodlayan kısmını oluşturmaktadır. 1488 nükleotitlik bu bölge 495 amino asit kodlamaktadır. Genomun 206991. bazı ile 207043. bazı arasındaki bölge genin translasyona uğramayan 5' ucunu içermektedir. Genin 3' translasyona uğramayan kısmı ise genomda 208532 ila 208571. bazlar arasında konumlanmıştır. Translasyona uğramayan bölgelerin hiçbiri 458R'den önce ve sonraki ORF'lerin içerisine kadar uzanmamıştır.

5. SONUÇLAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar neticesinde *Chilo iridescent* virüs'e ait 458R açık okuma zincirinin; biyoinformatik analizi yapılmış, ait olduğu transkripsiyon ifade sınıfı, transkripsiyonun gerçekleştiği zaman aralığı belirlenmiş, genin 3' ve 5' bölgelerinde transkript olmayan kısımların uzunlukları ve dizileri tespit edilmiştir.

1) 458R geni, CIV'ye ait 118L geni ile %30 oranında benzerlik göstermektedir. 118L ve 458R genleri CIV öz genleri arasındadır ve FV-3'ün zarf proteini kodlayan 53R ile homologlardır (Eaton vd.,2010). Ayrıca 458R ve 118L genleri, virüs enfeksiyonunda çok önemli bir zarf proteini kodlayan (Yuan vd., 2016) ve yapısal proteinler arasında olduğu belirtilen SGIV 088L açık okuma zinciri ile de benzerlik göstermektedir (Song vd., 2004). Bu bilgiler ışığında öz gen olarak değerlendirilen 458R geninin (Eaton vd.,2007), bir zarf proteini kodladığı ve bu proteinin enfeksiyonda önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

2) 458R geni üç adet transmembran domeini, miristilasyon motifi, *N*-glikolizasyon, kazein kinaz II fosforilasyon, protein kinaz C fosforilasyon, cAMP- ve cGMP- bağımlı protein kinaz fosforilasyon bölgeleri ve bipartite nükleer lokalizasyon sinyal profilleri içermektedir. 5' uçta miristilasyon motifi içermesi, 458R geninin muhtemel bir miristilasyonlu protein kodladığını göstermektedir. Eğer 458R proteini miristilleniyor ise, miristilasyonlu viral proteinler ile yapılan çalışmalar dikkate alındığında, bu proteinin viral replikasyonda, viriyon inşasında olgun viriyon oluşumunda ve/veya hücreye girişte rol oynaması muhtemeldir. Ayrıca içerdiği bipartite nükleer lokalizasyon sinyali ve viral replikasyonun nükleer fazı, 458R tarafından kodlanan proteinin nükleus ile ilgili bir görevi olabileceğini göstermektedir.

3) Transmembran analizleri ışığında genden üretilen proteinin tamamına yakınının membranın iç bölgesinde ve çok az kısmının membranın dışında konumlanmakta olduğu ve üç adet transmembran heliksi içerdiği belirlenmiştir. İçerdiği transmembran domeinleri, üretilen proteinin membranda konumlandığını göstermektedir. 118L dahil olmak üzere CIV yapısal proteinlerinin 17 tanesi transmembran domeini içermektedir (Özşahin, 2015). Membran proteini olması muhtemel olan bu 458R proteininin, virüsün konağın hücre membranına bağlanmasında görev yapan proteinlerinden bir tanesi olabileceğini göstermektedir.

4) Gen ifade sınıfının ve transkripsiyon zamanının belirlenmesi ile genin transkripsiyonel analizi gerçekleştirilmiş oldu. Bu kapsamda;

a) 458R açık okuma zincirinin geç gen ifade sınıfına dahil olduğu tespit edilmiştir. Geç genlerin genellikle yapısal proteinleri kodladıkları varsayılmaktadır. Bunun yanında, yapısal proteinler kodlamasına rağmen en erken ve erken gen ifade sınıflarına dahil genlerin varlığı CIV ile yapılan çalışmalar da gösterilmiştir (İnce vd., 2013; İnce vd., 2015). RGV 53R geni de tıpkı 458R gibi geç gen ifade sınıfına dahildir (Zhao vd., 2008).

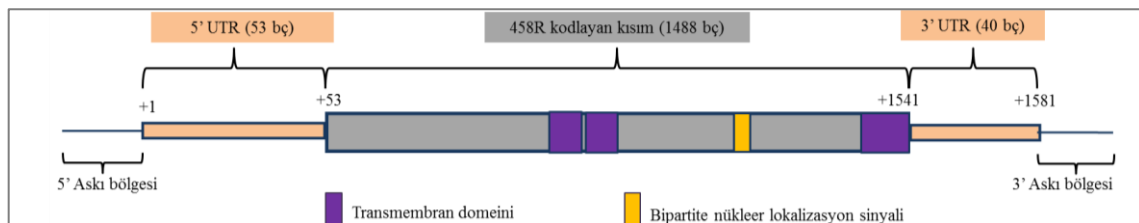
b) 458R açık okuma zincirinin transkripsiyonunun enfeksiyonu takiben 12 ila 24. saatler arasında başladığı, 24. saatte en yüksek miktarda transkript olduğu, 48. saate kadar azalarak devam ettiği belirlenmiştir. Zarf proteini kodlayan RGV 53R transkripti, enfeksiyonu takiben 12. saatte ortamda tespit edilmiş ve transkripsiyonun 48. saate kadar artarak devam ettiği gözlenmiştir (Zhao vd., 2008). Bu bilgiler ışığında 458R geninin, CIV'nin yapısal protein kodlayan genlerinden biri olduğu düşünülmektedir.

5) Genin anatomik yapısını belirlemek üzere, 3' ve 5' translasyon olmayan bölgeleri analiz edildi.

a) 458R açık okuma zincirinin 3' ucunda proteine dönüşmeyen bölgenin stop kodununun aşağısında 40 nükleotid uzunluğunda "5'-TGCATAATTTTAAGCTATATTTTAATGATTAAATCATT-3'" dizisi olduğu belirlenmiştir.

b) 458R açık okuma zincirinin 5' ucunda proteine dönüşmeyen bölgenin başlangıç kodununun yukarısında 53 nükleotid uzunlukta, "5'-AAATATAACTACAAGGAGTGTAGATATTTTACTAACCAAGTCAGAATACTAAC-3'" dizisi olduğu ve TATA kutusunun transkripsiyon başlangıç noktasında 2 nükleotid aşağısında konumlandığı tespit edilmiştir.

c) 3' ve 5' translasyon olmayan bölgelerin analizi sonucunda genin anatomik yapısının aydınlatılmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. 458R geninin anatomik yapısı

6. ÖNERİLER

Çalışmada, CIV 458R açık okuma zincirinin geç bir protein kodladığı ve enfeksiyonu takiben 12 ila 24. saatler arasında transkripsiyona uğradığı tespit edilmiştir. Miristilasyon motifi içerdiği belirlendiğinden 458R proteinin viral inşa, replikasyon, virüsün hücreye tutunması ve /veya girişinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. İlgili genin virüs enfeksiyonudaki görevinin tespiti için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır. Bu bağlamda;

1) Geç gen olması ve transmembran domeini içermesi bakımından yapısal olma ihtimaline karşı, 458R proteininin CIV'ye ait diğer yapısal proteinler ile etkileşimi maya iki hibrit sistemi ile incelenebilir.

2) Gen ifade vektör sisteminde ifade edilecek 458R proteinine karşı antikor üretilip, bu antikoron virüsü nötralize edip etmediğine ve virüs yapısında bulunan proteinlere bağlanıp bağlanmadığına bakılabilir.

3) Miristilasyonun CIV viriyon formasyonunda ve inşasındaki etkisi, miristilasyon inhibitörü aracılığı ile tespit edilebilir.

4) 458R geni RNAi veya benzeri yöntemle susturulabilir ya da homolog rekombinasyon veya benzeri bir yöntemle genomdan silinebilir. Bu sayede 458R'nin virüs replikasyonu, inşası ve/veya virüsün hücreye girişindeki tahmini rolüne kesinlik kazandırılabilir.

5) Genin içerdiği kazein kinaz II fosforilasyon, protein kinaz C fosforilasyon, cAMP- ve cGMP- bağımlı protein kinaz fosforilasyon bölgeleri dikkate alındığında, proteinin fosforilasyon görevi üstlenen bir enzim olabileceği ihtimali göz önünde bulundurularak bu aktivitenin varlığı araştırılabilir.

6) Genin anatomik yapısının tam belirlenebilmesi bakımından promotor bölgesi analizi yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Ahlers, L. R. H., Bastos, R. G., Hiroyasu, A. ve Goodman, A. G., 2016. Invertebrate Iridescent Virus 6, a DNA Virus, Stimulates a Mammalian Innate Immune Response through RIG-I-Like Receptors, PLOS ONE, 11, 11, e0166088.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G. ve Jessee, J., 1996. Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac® baculovirus expression system, Focus, 17, 53-58.
- Andrés, G., García-Escudero, R., Salas, M.L. ve Rodríguez, J.M., 2002a. Repression of African swine fever virus polyprotein pp 220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. J. Virol. 76, 6, 2654–2666.
- Barray S. ve Devauchelle G., 1987. Protein synthesis in cells infected by Chilo iridescent virus: Evidence for temporal control of three classes of induced polypeptides. Virology 138, 253–261.
- Bastidas, A. C., Deal, M. S., Steichen, J. M., Keshwani, M. M., Guo, Y. ve Taylor, S. S., 2012. Role of N-terminal myristylation in the structure and regulation of cAMP-dependent protein kinase, J Mol Biol, 422, 2, 215-229.
- Bigot, Y., Piegu, 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, 1, 246-254.
- Bilimoria, S. L., 2001. Use of viral proteins for controlling the cotton boll weevil and other insect pests, United States Patent no. 6200561,
- Bilimoria, S. L., 2009. Use of Iridoptin to Induce Toxicity in Insects United States Patent no. US2009/0069239A1,
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Vodovar, N., İnce, İ. A., Blanc, H., Vlak, J. M., Saleh, M.-C. ve van Rij, R. P., 2012. The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the Drosophila RNAi machinery, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, 51, E3604–E3613.
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Venselaar, H. ve van Rij, R. P., 2014. A dsRNA-binding protein of a complex invertebrate DNA virus suppresses the Drosophila RNAi response, Nucleic Acids Research, doi: 10.1093/nar/gku910
- Bryant, M. ve Ratner, L., 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 523–527.
- Capul, A.A., Perez, M., Burke, E., Kunz, S., Buchmeier, M.J. ve de la Torre, J.C., 2007. Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. J. Virol. 81, 9451–9460.

- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1980. Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an invertebrate virus (iridovirus type 6 or CIV), Archives of Virology, 63, 3-4, 297-303.
- Chambers, J., Angulo, A., Amaratunga, D., Guo, H., Jiang, Y., Wan, J.S., Bittner, A., Frueh, K., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Erlander, M.G. ve Ghazal, P., 1999. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. J. Virol. 73, 5757–5857.
- Chinchar, V. G., Essbauer, S., He, J. G., Hyatt, A, Miyazaki, T., Seligy, V., and Williams, T. (2005). Iridoviridae. In “Virus Taxonomy: 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses” (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, eds.), pp. 163–175. Elsevier, London.
- Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T. ve Williams, T., 2009. Family Iridoviridae: poor viral relations no longer, Curr Top Microbiol Immunol, 328, 123-170.
- 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, 10, 1959-1985.
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q., and ICTV Report Consortium, 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*, Journal of General Virology, 98, 890-891.
- Ciccarone, V., C., Polayes, D. ve Luckow, V., A., 1997. Generation of recombinant baculovirus DNA in E. coli using baculovirus shuttle vector, 13, U. Reisch, ed., Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C.F. ve Williams, T. 2001. A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6, J Virol Methods, 98, 2, 109-18.
- Dizman, Y. A., Demirbag, Z., İnce, I. A. ve Nalçacıoğlu, R., 2012. Transcriptomic analysis of Chilo iridescent virus immediate early promoter, Virus Research, 167, 2, 353-357.
- D'Costa, S. M., Yao, H. ve Bilimoria, S. L., 2001. Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells, Archives of Virology, 146, 11, 2165-2178.
- D'Costa, S. M., Yao, H. J. ve Bilimoria, S. L., 2004. Transcriptional mapping in Chilo iridescent virus infections, Archives of Virology, 149, 4, 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, Archives of Virology, 157, 11, 2171-2178.

- Duronio, R.J., Rudnick, D. A., Adams, S. P., Towler, D. A., ve Gordon, J. I., 1991. *J. Biol. Chem.* 266, 10498-10504.
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C. ve Brunetti, C. R., 2007. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes, *Virology*, 4, 11.
- Eaton, H. E., Ring, B. A. ve Brunetti, C. R., 2010. The genomic diversity and phylogenetic relationship in the family iridoviridae, *Viruses*, 2, 7, 1458-1475.
- Ebrahimi, B., Dutia, B.M., Roberts, K.L., Garcia-Ramirez, J.J., Dickinson, P., Stewart, J.P., Ghazal, P., Roy, D.J. ve Nash, A.A., 2003. Transcriptome profile of murine gammaherpesvirus-68 lytic infection. *Journal of General Virology*, 84, 99–109.
- Farazi, T.A., Waksman, G. ve Gordon, J.I., 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276, 43, 39501–39504.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A Chilo Iridescent Virus (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera : Pyralidae), *Applied Entomology and Zoology*, 1, 2, 69-72.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. ve Martin, G. R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998-9002.
- Fukuda, T., 1971. Per os transmission of Chilo iridescent virus to mosquitoes, *J. Invertebr. Pathol.*, 18, 1, 152-153.
- Goorha, R., Willis, D. B. ve Granoff, A., 1977. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VI. Frog virus 3 replication is dependent on the cell nucleus, *J. Virology*, 21, 2, 802-805.
- Goorha, R. ve Dixit, P., 1984. A temperature-sensitive (TS) mutant of frog virus 3 (FV3) is defective in second-stage DNA replication, *Virology*, 136, 1, 186-195.
- Goorha, R., Granoff, A., Willis, D. B. ve Murti, K. G., 1984. The role of DNA methylation in virus replication: inhibition of frog virus 3 replication by 5-azacytidine, *Virology*, 138, 1, 94-102.
- Goshorn, S. C. ve Schlievert, P. M., 1989. Bacteriophage association of streptococcal pyrogenic exotoxin type C, *Journal of Bacteriology*, 171, 6, 3068-3073.
- Göttlinger, H.G., Sodroski, J.G. ve Haseltine, W.A., 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5781–5785.

- Gregory, C. R., Latimer, K. S., Pennick, K. E., Benson, K. ve Moore, T., 2006. Novel Iridovirus in a Nautilus (Nautilus Spp.), Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 18, 2, 208-211.
- Hama, H., 1968. On the cross inoculation of Chilo iridescent virus, Japan. J. Appl. Entomolo. Zool., 12, 34-39.
- Hartschuh, R. D., Wargacki, S. P., Xiong, H., Neiswinger, J., Kisliuk, A., Sihm, S., Ward, V., Vaia, R. A. ve Sokolov, A. P., 2008. How rigid are viruses, Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 78, 2 Pt 1, 021907.
- Harper, D. R. ve Gilbert, R. L., 1995. Viral lipoproteins: the role of myristoylation, Biochemical Society Transactions, 23, 3, 553-557.
- He, L. B. Gao, X. C. Ke, F. ve Zhang, Q. Y., 2013. A conditional lethal mutation in Rana grylio virus ORF 53R resulted in a marked reduction in virion formation, Virus Res., 177, 2, 194-200.
- Henderson, C. W., Johnson, C. L., Lodhi, S. A. ve Bilimoria, S. L., 2001. Replication of Chilo iridescent virus in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay, Archives of Virology, 146, 4, 767-775.
- Hink, W. F., 1970. Established Insect Cell Line from the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*, Nature, 226, 5244, 466-467.
- Hyatt, A. D., Gould, A. R., Zupanovic, Z., Cunningham, A. A., Hengstberger, S., Whittington, R. J., Kattenbelt, J. ve Coupar, B. E. H., 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses, Archives of Virology, 145, 2, 301-331.
- İnce, I. A., Westenberg, M., Vlak, J. M., Demirbag, Z., Nałçacıoğlu, R. ve van Oers, M. M., 2008. Open reading frame 193R of Chilo iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP), Virology, 376, 1, 124-131.
- İnce, İ. A., Boeren, S. A., van Oers, M. M., Vervoort, J. J. ve Vlak, J. M., 2010. Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405, 1, 253-258.
- İnce, I. A., Ozcan, 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, 1, 187-192.
- İnce, I. A., Boeren, S., van Oers, M. M. ve Vlak, J. M., 2015. Temporal proteomic analysis and label-free quantitation of viral proteins of an invertebrate iridovirus, Journal of General Virology, 96, 1, 196-205.
- 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, 1, 182-196.

- Jancovich, J. K., Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. ve Zhang, Q. Y., 2012. Family Iridoviridae. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz. San Diego, CA, Elsevier Academic Press, 193-210.
- Kelly, D. C., 1985. Insect iridescent viruses, *Curr. Top. on Microbiol. Immunol.*, 116, 2335.
- Kim, Y. S. Ke, F. Lei, X. Y. Zhu ve R. Zhang, Q. Y., 2010. Viral envelope protein 53R gene highly specific silencing and iridovirus resistance in fish Cells by AmiRNA, *PLoS One*, 5, 4, e10308.
- Kristensen, D. M., Saeed, U., Frishman, D., ve Koonin, E. V., 2015. A census of α -helical membrane proteins in double-stranded DNA viruses infecting bacteria and archaea. *BMC Bioinformatics*, 16, 380.
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y. ve Ren, J., 2015. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences, *Bioinformatics*, 31, 20, 3359-3361.
- Liu, Y., Tran, B. N., Wang, F., Ounjai, P., Wu, J. ve Hew, C. L., 2016. Visualization of Assembly Intermediates and Budding Vacuoles of Singapore Grouper Iridovirus in Grouper Embryonic Cells, *Scientific Reports*, 6, 18696.
- Lua, D.T., Yasuike, M., Hirono, I. ve Aoki, T., 2005. Transcription program of red sea bream iridovirus as revealed by DNA microarrays, *J. Virol.* 79, 15153–15164.
- Majji, S., Thodima, V., Sample, R., Whitley, D., Deng, Y., Mao, J. ve Chinchar, V. G., 2009. Transcriptome analysis of Frog Virus 3, the type species of the genus Ranavirus, family Iridoviridae, *Virology*, 391, 2, 293-303.
- Mao, J., Hedrick, R. P. ve Chinchar, V. G., 1997. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses, *Virology*, 229, 1, 212-220.
- Martin, K.H., Grosenbach, D.W., Franke, C.A. ve Hruby, D.E., 1997. Identification and analysis of threemyristylated vaccinia virus late proteins, *J. Virol.* 71, 7, 5218–5226.
- Martin, K.H., 1998. Fatty Acylation of Vaccinia Virus Proteins: Dual Myristylation and Palmitoylation of the A-type Inclusion Protein, Doktora Tezi, Oregon State University, Oregon, USA.
- Martin, K.H., Franke, C.A. ve Hruby, D.E., 1999. Novel acylation of poxvirus A type inclusion proteins. *Virus Res*, 60, 147–157.
- Martin, D. D. O., Beauchamp, E. ve Berthiaume, L. G., 2011. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death, *Biochimie*, 93, 1, 18-31.

- Maurer-Stroh, S. ve Eisenhaber, F., 2004. Myristoylation of viral and bacterial proteins, Trends in Microbiology, 12, 4, 178-185.
- Merrihew, R., V., Clay, W., C., Condreay, J., P., Witherspoon, S., M., Dallas, W., S. ve Kost, T., A., 2001. Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells, J. Virol., 75, 2, 903–909.
- Mitsuhashi, J., 1967. Infection of leafhopper and its tissues cultivated in vitro with Chilo iridescent virus, J. Invertebr. Pathol., 9, 3, 432-434.
- Mosig, G., 1968. A Map of Distances along the DNA Molecule of Phage T4, Genetics, 59, 2, 137-151.
- Nalçacıoğlu, R., Marks, H., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2003. Promoter analysis of the Chilo iridescent virus DNA polymerase and major capsid protein genes, Virology, 317, 2, 321-329.
- Nalçacıoğlu, R., İnce, I. A., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2007. The Chilo iridescent virus DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif, Journal of General Virology, 88, 9, 2488-2494.
- Nalçacıoğlu, R., Ince, I. A. ve Demirbağ, Z., 2009. The biology of Chilo iridescent virus, Virologica Sinica, 24, 4, 285-294.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R. T., Katagiri, F. ve Dangl, J. L., 2000. Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*, Cell, 101, 4, 353-363.
- Ohba, M. ve Aizawa, K., 1979. Multiplication of Chilo iridescent virus in non insect arthropods, Journal of Invertebrate Pathology, 33, 278-283.
- Özgen, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z., Vlak, J. M., van Oers, M. M. ve Nalçacıoğlu, R., 2014. Construction and characterization of a recombinant invertebrate iridovirus, Virus Research, 189C, 286-292.
- Özşahin, E., 2015. *Chilo* iridescent virüs'e ait yapısal proteinler arasındaki moleküler etkileşimler, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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
- Radloff, C., Vaia, R. A., Brunton, J., Bouwer, G. T. ve Ward, V. K., 2005. Metal nanoshell assembly on a virus bioscaffold, Nano Lett, 5, 6, 1187-1191.

- Reed, L. J. ve Muench, H., 1938. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints, American Journal of Epidemiology, 27, 3, 493-497.
- Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F. ve Hew, C. L., 2004. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis, J Virol, 78, 22, 12576-12590.
- Stanbridge, L., J., Dussupt, V. ve Maitland, N., J., 2003. Journal of Biomedical Biotechnology, 2, 79-91.
- 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> 19 Şubat 2017
- URL-2 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_149921.1 15 Şubat 2017
- URL-3 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 15 Şubat 2017
- URL-4 <http://prosite.expasy.org/scanprosite/> 15 Şubat 2017
- URL-5 <http://ibs.biocuckoo.org/online.php> 15 Şubat 2017
- URL-6 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 15 Şubat 2017
- URL-7 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> 15 Şubat 2017
- URL-8 <http://www.uniprot.org/uniprot/Q91F68> 15 Şubat 2017
- Wan, Q.J., Gong, J., Huang, X.H., Huang, Y.H., Zhou, S., Ou-Yang, Z.L., Cao, J.H., Ye, L.L. ve Qin, Q.W., 2010. Identification and characterization of a novel capsid protein encoded by Singapore grouper iridovirus ORF038L, Arch. Virol. 155, 351-359.
- Whitley, D. S., Yu, K., Sample, R. C., Sinning, A., Henegar, J., Norcross, E. ve Chinchar, V. G., 2010. Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro, Virology, 405, 2, 448-56.
- Williams, T., 1996. The iridoviruses, Adv. Virus. Res., 46, 345-412.
- Williams, T., 1998. Invertebrate iridescent viruses. In: The Insect Viruses (Eds. Miller L. & Ball A.) Plenum Press, New York
- Williams, T.; Chinchar, G.; Darai, G.; Hyatt, A.; Kalmakoff, J.; Seligg, V.: Family Iridoviridae. In Virus Taxonomy - 7th report of the international committee on taxonomy of viruses. Van Regenmortel, M.H.V., Ed.; Academic Press: New York, U.S.A., 2000; pp. 167-182.

- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V. G., 2005. A Decade of Advances in Iridovirus Research. Advances in Virus Research, Academic Press. Volume 65, 173-248.
- Williams, T. 2008. Iridoviruses of Invertebrates. Encyclopedia of Virology, Elsevier Ltd. 3, 161-167.
- Williams, T. ve Ward, V.K., 2010. Insect Virology, Sassan Asgari ve Karyn Johnson Ed., Caister Academic Press, Australia.
- Wrigley, N. G., 1969. An Electron Microscope Study of the Structure of Sericesthis Iridescent Virus, Journal of General Virology, 5, 1, 123-134.
- Willis, D.B., Foglesong, D. ve Granoff, A., 1984. Nucleotide sequence of an immediate-early frog virus 3 gene, J Virol, 52, 905–912.
- Yan, X., Olson, N. H., Van Etten, J. L., Bergoin, M., Rossmann, M. G. ve Baker, T. S., 2000. Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses, Nature structural biology, 7, 2, 101-103.
- Yuan, Y., Wang, Y., Liu, Q., Zhu, F. ve Hong, Y., 2016. Singapore grouper iridovirus protein VP088 is essential for viral infectivity, Scientific Reports, 6, 311170.
- Yang, Z. ve Moss, B., 2009. Interaction of the Vaccinia Virus RNA Polymerase-Associated 94-Kilodalton Protein with the Early Transcription Factor, J. Virol., 83, 23, 12018-12026.
- Zhao, Z., Ke, F., Huang, Y., Zhao, J., Gui ve J., Zhang, Q., 2008. Identification and characterization of a novel envelope protein in Rana grylio virus, Journal of General Virology, 89, 1866–1872.
- Zhou, S., Wan, Q., Huang, Y., Huang, X., Cao, J., Ye, L., Lim, T.-K., Lin, Q. ve Qin, Q., 2011. Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088, PROTEOMICS, 11, 11, 2236-2248.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini 24 Şubat İlköğretim Okulunda, ortaöğrenimini ise Vakfıkebir Anadolu Lisesinde tamamladı. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğrenimini, 2015 yılında bölüm üçüncüsü olarak tamamladı. 2015-2016 eğitim-öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir. İyi derecede İngilizce ve başlangıç seviyesinde Almanca bilmektedir.

