

139213

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CHILO İRİDESCENT VİRÜSÜNÜN BOMBYX MORI HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
REPLİKASYONU VE DNAPOL İLE MCP GENLERİNİN  
TRANSKRİPSİYONAL ANALİZİ**

Remziye NALÇACIOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce  
"Doktor"  
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.11.2003  
Tezin Savunma Tarihi : 20.11.2003

139213

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Saadettin GÜNER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2003

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## ÖNSÖZ

“*Chilo iridescent* virüs’ün *Bombyx mori* hücre kültüründe replikasyonu ve *dnapol* ile *mcp* genlerinin transkripsiyonal analizi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Bu tez ileride potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılacak olan *Chilo iridescent* virüs üzerinde, ülkemizde ve dünyada, *Bombyx mori* (ipek böceği) hücrelerinde replikasyonu ve promotör sıralarının aydınlatılması konusunda yapılmış ilk araştırma olup, bu çalışmanın bu alanda yapılacak yeni çalışmalara temel oluşturacağı inancını taşıyorum.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan tez izleme jürisi üyelerimden sayın Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e ve sayın Doç. Dr. Saadettin GÜNER’e, tezin bir kısmının gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarından istifade etmemi sağlayan Wageningen Üniversitesi (Hollanda), Viroloji Bölümü elemanlarından Prof. Dr. Just M. Vlak’a ve Dr. M. Monique Van Oers’e teşekkürleri bir borç bilirim. Maddi desteklerinden dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Projeleri Destekleme Merkezi’ne, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na ve Devlet Planlama Teşkilatı (DPT)’na teşekkür ediyorum. Ayrıca tez süresince bana her konuda destek veren aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon, 2003

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET... ..	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ .....	X
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. İridovirüslerin Keşfi .....	2
1.3. İridoviridae Familyasının Oluşturulması .....	2
1.4. İridoviridae Familyasının Özellikleri.....	4
1.5. İridovirüslerde Genom Özellikleri .....	6
1.6. İridovirüslerde Replikasyon.....	7
1.7. İridovirüslerde Gen İfadesi ve Regülasyonu.....	8
1.8. İridovirüslerde Promotor Özellikleri .....	11
1.9. İridovirüslerin Üretimi ve Sayımı .....	12
1.10. <i>Chilo</i> İridescent Virüs (CIV) .....	13
1.11. Çalışmanın Amacı.....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	16
2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini .....	16
2.2. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini.....	16
2.3. <i>Chilo</i> İridescent Virüs'ün (CIV) <i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründeki Replikasyonunun Tespiti .....	17
2.3.1. CIV'nin SPC-BM-36 Hücrelerindeki Replikasyonunun Işık Mikroskobu ile Tespiti.....	17
2.3.2. CIV'nin SPC-BM-36 Hücrelerindeki Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyon Yöntemi ile Tespiti.....	17
2.3.2.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Nitroselüloz Membrana Geçirilmesi .....	17
2.3.2.2. Proben Hazırlanması ve İşaretlenmesi.....	18

2.3.2.3.	Slot-Blot Hibridizasyonu .....	19
2.3.3.	CIV'nin SPC-BM-36 Hücrelerindeki Replikasyonunun Transkripsiyonal olarak Tespiti ve Genlerin Transkripsiyon Sınıflarının Tayini.....	19
2.3.3.1.	Enfekte Olmuş Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyon Tayini .....	20
2.3.3.2.	Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	21
2.4.	<i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Hücrelerinde Üretilen Yeni CIV ile Bu Hücrelerin Yeniden Enfeksiyonu.....	22
2.5	Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerinin (5'-UTR) ve Transkripsiyon Başlangıç Noktalarının Tespit Edilmesi .....	22
2.5.1.	Genlerin cDNA'larının 5' Uçlarının Hızlı Çoğaltılması (5'RACE) ve Agaroz Jel Elektroforezi .....	22
2.5.2.	Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerini İhtiva Eden DNA Zincirlerinin Agaroz Jelden Temizlenmesi ve pGEMT-Easy Vektörüne Klonlanması .....	25
2.5.3.	Elektrokompotent DH5 $\alpha$ <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	26
2.5.4.	Elektrotransformasyon.....	26
2.5.5.	Genlerin Proteine Dönüşmeyen 5' Bölgelerini İhtiva Eden Klonların Seçilmesi için Plazmit DNA'larının Hızlı Miniprep Metodu ile İzolasyonu ..	27
2.5.6.	Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerini İhtiva Eden Plazmit DNA'larının Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi .....	27
2.5.7.	Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerini İhtiva Eden Klonların Dizi Analizi.....	27
2.6.	Gen Ekspresyonu .....	28
2.6.1.	Lusiferaz Deneyi için, <i>dnapol</i> ve <i>mcp</i> Genlerinin Muhtemel Promotor Bölgelerini İhtiva Eden Rekombinant Promotor Plazmitlerinin Oluşturulması .....	28
2.6.2.	<i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Hücrelerinin Rekombinant Plazmitler ile Transfeksiyonu.....	32
2.6.3.	Lusiferaz Proteinlerinin İzolasyonu ve Luminometrede Ölçülmesi .....	33
2.6.4.	PCR'a Bağlı Nokta Mutasyon ile Promotor Bölgesinin Test Edilmesi.....	34
2.6.5.	Promotor Bölge Motiflerinin Belirlenmesi için CIV Genomunun Bilgisayar Analizi .....	34
3.	BULGULAR.....	35

3.1.	<i>Chilo Iridescent</i> Virüs'ün (CIV) <i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründe Replikasyonu.....	35
3.1.1.	CIV'nin <i>Bombyx mori</i> Hücrelerindeki Replikasyonunun Işık Mikroskobu ile Tespiti .....	35
3.1.2.	CIV'nin <i>Bombyx mori</i> Hücrelerindeki Replikasyonunun Slot-Blot Hibridizasyonu ile Tespiti.....	36
3.1.3.	CIV'nin <i>Bombyx mori</i> Hücrelerindeki Replikasyonunun Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Tespiti ve Genlerin Transkripsiyon Sınıflarının Belirlenmesi.....	37
3.2.	<i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Hücrelerinde Üretilen Yeni CIV ile Bu Hücrelerin Yeniden Enfeksiyonu.....	38
3.3.	Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerinin Transkripsiyonal Analizi.....	38
3.3.1.	cDNA'nın 5' Uçlarının Hızlı Çoğaltılması (5'-RACE).....	38
3.3.2.	Genlerin Promotor Bölgelerinin Analizi.....	40
3.4.	Mutasyon Analizi.....	42
3.5.	Promotor Bölgelerinin Bilgisayar Analizi .....	42
4.	TARTIŞMA .....	44
5.	SONUÇLAR.....	49
6.	ÖNERİLER.....	50
7.	KAYNAKLAR .....	51
	EKLER.....	56

## ÖZET

*Chilo iridescent* virüs (CIV) İridoviridae familyası içerisindeki *İridovirüs* cinsinin örnek türü olup, önemli böcek zararlıları üzerinde yüksek derecede patojenik etki gösterir. Bu çalışma, CIV'nin *Bombyx mori* (SPC-BM-36) hücrelerinde replikasyonunun gösterildiği ilk çalışmadır. Ayrıca CIV'ye ait genlerin regülasyonu üzerinde çalışmalar yapıldı. Bunun için DNA polimeraz (*dnapol*) ve major kapsid proteini (*mcp*) genleri seçildi. Bu genlerin temporal sınıfları ve proteine dönüşmeyen baz sıraları belirlendi. Muhtemel promotor bölgelerinin belirlenmesi üzerinde detaylı çalışmalar yapıldı.

CIV'nin *B. mori* hücrelerindeki replikasyonu ışık mikroskobu ile, DNA-DNA hibridizasyonu ile ve transkripsiyonal olarak belirlendi. CIV'nin *B. mori* hücrelerini enfeksiyonunu takip eden 48. saatte, hücrelerin enfekte olmamış kontrol hücrelerden tamamen farklılık gösterdiği tespit edildi. Sonuçlar CIV-Bm enfeksiyonunun duyarlı olduğunu göstermektedir. Enfekte olan hücrelerin kontrollere göre 2-3 kat daha büyük oldukları ve içlerinde küçük sitoplazmik boşluk oluştuğu belirlendi. *B. mori* hücrelerinin Ara-C (DNA replikasyonu engelleyicisi) ve sikloheksimit (protein sentezi engelleyicisi) varlığında enfeksiyonu, izole edilen total RNA üzerinde *dnapol* ve *mcp* için özel primerler kullanılarak yapılan RT-PCR ile takip edildi ve sonuç *dnapol*'ün "erken" *mcp*'nin de daha önce belirtildiği gibi "geç" grubu gen olarak ifade edildiğini gösterdi. CIV ile enfekte olmuş *B. mori* hücrelerinden izole edilen RNA üzerinde yapılan 5'-RACE analizi, transkripsiyonun, translasyon başlangıç noktalarına göre *dnapol* için -35., *mcp* için de -15./-16. pozisyonda başladığını gösterdi. Bu genlerin muhtemel promotorlarının sınırlarını tayin etmek için, çeşitli uzunluklardaki 5'-dizileri, ateşböceği lusiferaz işaret geninin önüne klonlandı. Oluşan plazmit yapıları transfeksiyon deneyinde test edildi. *mcp* promotor aktivitesi translasyon başlangıç noktasının yukarısındaki sıralar -67. nükleotidden -43. nükleotide indirildiğinde güçlü bir şekilde düştü. *dnapol* için ise promotor aktivitesi, translasyon başlangıç noktasının yukarısındaki sıralar -62.'den -41. nükleotide indirildiğinde hemen hemen sıfırlandı. Translasyon başlangıç noktasının yukarısında bulunan TTGTTTT motifindeki G bazının C ile değiştirilmesi, promotor aktivitesini % 25 oranında düşürdü.

**Anahtar Kelimeler:** *Chilo* İridescent Virüs, *Bombyx mori*, *dnapol*, *mcp*, Gen Regülasyonu

## SUMMARY

### Replication of *Chilo* Iridescent Virus (CIV) in *Bombyx mori* Cell Culture and Transcriptional Analysis of *dnapol* and *mcp* Genes

*Chilo* iridescent virus (CIV), the type species of the genus Iridovirus, a member of the *Iridoviridae*, is highly pathogenic for a variety of insect larvae. This is the first study of the replication of CIV in *Bombyx mori* (SPC-BM-36) cell culture. Studies were also performed on regulation of CIV genes in this study. For this, DNA polymerase (*dnapol*) and major kapsid protein (*mcp*) genes were selected. Temporal classes and untranslated sequences of these genes were determined. Detailed studies were performed on detection of the potential promoter sequences.

Replication of CIV in *B. mori* cells was detected by light microscopy, DNA-DNA hybridization and transcriptionally. At 48 hours post infection of *B. mori* cells by CIV, virus infected cells showed completely diversity from non infected cells. They were 2-3 times larger than controls and small viroplasmic centres were evident in the cytoplasm of infected cells. Results indicate that CIV-Bm infection is permissive. Infection of *B. mori* cells in the presence of Ara-C (inhibits DNA replication) or cycloheximide (inhibits protein synthesis), followed by RT-PCR on isolated total RNA using specific primers for *dnapol* and *mcp*, showed that *dnapol* is expressed as a delayed-early gene and confirmed that *mcp* is a late gene. 5'RACE analysis on RNA isolated from CIV-infected *B. mori* cells showed that transcription initiated at position -35 for *dnapol* and position -15/-16 for *mcp*, relative to the translational start sites of these genes. To determine the limits of the putative promoters, upstream sequences of various lengths were cloned in front of a firefly luciferase reporter gene. The resulting plasmid constructs were tested in a transfection assay. The *mcp* promoter activity was strongly reduced when the length of the sequence upstream of the translational start site was reduced from 67 to 43 nucleotides. For *dnapol*, the promoter activity was reduced to almost zero when the upstream fragment was reduced from 62 to 41 nucleotides. Changing the G base to C in a TTGTTT motif just upstream of the transcription initiation site of *dnapol* reduced the promoter activity with 25%.

**Key Words:** *Chilo* Iridescent Virus, *Bombyx mori*, *dnapol*, *mcp*, Gene Regulation

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	İridovirüs enfeksiyonu nedeni ile vücudu maviye dönüşmüş <i>Galleria mellonella</i> larvası .....	4
Şekil 2.	İridovirüs ile enfekte olmuş Sf-21 hücrelerinde virüsün sitoplazmik görünümü .....	5
Şekil 3.	İridovirüslerde kapsid simetrisini ve iç yapıyı gösteren diyagram .....	6
Şekil 4.	İridovirüs genomunun “Terminal Redundansi” özelliğinin şematik gösterimi .....	7
Şekil 5.	Frog virüs 3 (FV3) DNA’sının replikasyon modeli.....	8
Şekil 6.	Model bir genin anatomik yapısı .....	9
Şekil 7.	İridovirüslerde transkripsiyonun modeli.....	10
Şekil 8.	<i>Chilo iridescent</i> virüs genomunun yapısı.....	14
Şekil 9.	5’RACE analizinin şematik gösterimi .....	23
Şekil 10.	<i>dnapol</i> ve <i>mcp</i> genlerinin lusiferaz işaret geni önüne klonlanacak promotor bölgelerinin gösterimi .....	29
Şekil 11.	<i>Chilo iridescent</i> virüs’ün (CIV) SPC-BM-36 hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etkiler .....	35
Şekil 12.	<i>Chilo iridescent virüs</i> (CIV) DNA’sının <i>Bombyx mori</i> (Bm) böcek hücre kültüründeki replikasyonunu gösteren slot-blot hibridizasyonu.....	36
Şekil 13.	<i>dnapol</i> ve <i>mcp</i> transkriptlerinin RT-PCR analizi .....	37
Şekil 14.	<i>dnapol</i> ve <i>mcp</i> transkriptlerinin 5’ uçları.....	39
Şekil 15.	<i>dnapol</i> ve <i>mcp</i> genlerinin promotor analizleri.....	41



## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İridoviridae familyasının sınıflandırılması .....	3
Tablo 2. RT-PCR deneyinde kullanılan primerler .....	21
Tablo 3. 5'RACE analizinde kullanılan primerler .....	25
Tablo 4. Promotor plazmitlerini oluşturmak için kullanılan primerler .....	32
Tablo 5. CIV genlerinin kodlayan kısımlarının 5' bölgelerinin 80 nükleotid yukarı bölgelerinde, 4 nükleotidli motiflerin tüm genoma göre bulunma sıklığı.....	43
Ek Tablo 1. CIV genomundaki genlerin kodlayan bölgelerinin özellikleri.....	56

## SEMBOLLER DİZİNİ

Ara-C	: Sitozin $\beta$ -D-arabino-furanozit
cDNA	: Mesajcı ribonükleik asitden sentezlenmiş deoksiribonükleik asit
CIV	: <i>Chilo iridescent</i> virüs
Cyc	: Siklohekzimit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>dnapol</i>	: DNA polimeraz geni
DSMZ	: Alman mikroorganizma ve hücre kültürlerinin koleksiyonu
FBS	: Fetal bovine serum
FV3	: Frog virüs 3
<i>mcp</i>	: Major kapsit protein geni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
5'-RACE	: cDNA'nın 5' uçlarının rastgele çoğaltılması
RNA	: Ribonükleik asit
RNA pol II	: RNA polimeraz II
RT-PCR	: Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
5'-UTR	: Translasyona uğramayan 5' bölgesi
UV	: Ultraviyole

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Grace (1962) tarafından böcek hücrelerinin *in vitro* ortamlarda daimi olarak büyütülmeleri çok çeşitli yeni araştırma alanları açmıştır. Zararlı böcekler üzerinde patojen olan virüslerin hücre kültürlerinde üretilibilmeleri bu alanlardan bir tanesidir. Hücre kültürlerinin birçok avantajları vardır. Özellikle, kullanılması ve bulunması zor olan hayvanlardan uzak durulması ve ortamın kontrolünün tamamen kişinin elinde olması çok önemlidir. Bu şekilde ortamın sıcaklığı, pH'ı, ozmotik basıncı araştırmacı tarafından ayarlanabildiği gibi, yine deneyin şartlarına göre gerekli kimyasalların ilave edilmesi veya edilmemesi gibi durumların oluşturacağı sonuçlar izlenebilmektedir (Cann, 1993).

Bir virüs ile konak hücresi arasındaki en hassas ilişki virüsün nükleik asit ve protein sentezi yapabilmesi için hücrenin bazı yapılarına ihtiyaç duymasıdır. Virüs replikasyonunun akışı, gen ekspresyonu ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun kontrolü prokaryotik hücrelerdekine göre çok daha karmaşıktır ve işlemin kontrolünde temel bazı farklar mevcuttur. Hücrelerdeki bu farkların, hücreleri konak olarak kullanan virüsleri etkilemesi kaçınılmazdır. Buna ilaveten virüs genomunun (en basit hücreninki ile karşılaştırıldığında) nispi basitliği ve büyüklüğü, genom üzerinde daha fazla baskıya sebep olur. Hücreler geniş genetik kapasitelerini kullanarak, gen ekspresyonlarını kontrol etmek için çeşitli ve kompleks mekanizmalar geliştirir. Virüsler de, oldukça kısıtlı genetik kaynaklarıyla, ekspresyonlarının özgün olarak miktarını, basamağını ve özel durumunu kontrol eder. Virüsler, bu problemlere, geniş çözümler üreterek, genetik kısıtlamalarını aşmaktadır. Bu mekanizmalar; genin ekspresyonunu teşvik eden veya engelleyen sinyaller, genlerin üst üste binmesi ile meydana gelen sıkıştırılmış genomlar ve tek bir mRNA'dan birçok polipeptid elde etmek için tasarlanmış birçok strateji gibidir. Gen regülasyonu sinyallerin aracılık ettiği düzenleyici döngülere sahiptir. Bu sinyaller *cis* veya *trans* pozisyonlarında işlem görür (Cann, 1993).

## 1.2. İridovirüslerin Keşfi

1954 yılı Mart ayında, İngiltere, Sproshire’de, Cambridge Üniversitesi mensubu olan Claude F. Rivers adlı bilim adamı, yaptığı bir arazi çalışması sırasında bazı *Tipula paludosa* larvalarında epiderminin hemen altında parlak mavi bir renk olduğunu gözlemiştir. Rivers bu larvalardan bol miktarda toplayarak Nick Xeros adlı başka bir araştırmacıya vermiş ve Xeros bu larvalardan ilk iridovirüsü (*Tipula paludosa* iridovirus; IV1) izole etmiştir. Böylece, Xeros tarafından 1954 yılında iridovirüsler ile ilgili ilk yayın Nature dergisinde “*Tipula paludosa* larvasında ikinci bir virüs hastalığı” başlığı ile gerçekleştirilmiştir (Xeros, 1954). O zamanlarda iridovirüslerin keşfi oldukça büyük yankı uyandırdı. Ardından başka böcek türlerinde de belirgin iridovirüs enfeksiyonları tespit edildi. İridovirüs enfeksiyonlarının tespit edildiği böcekler arasında önemli bazı pestlerin bulunması, bu virüslerin potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılabilirliklerini düşündürmüştür. Ayrıca iridovirüsler, çoğunluğunun böcek larvalarında yüksek oranda üretilebilmeleri ve birçok izolatinde hücre kültürüne uygulanabilir olması bakımından laboratuvar çalışmaları açısından da birçok avantaja sahiptir.

## 1.3. İridoviridae Familyasının Oluşturulması

İridoviridae familyası, gittikçe artan sayıdaki omurgalı ve omurgasız konaklardan rapor edilen ve karakteristik olarak virüsü oluşturacak olan yapıların birleşme işlemini konak sitoplazmasında gerçekleştirdiği “ikosaedral” yapıdaki DNA virüslerini içine almak üzere 1976 yılında oluşturulmuştur (Fenner, 1976).

Virüslerin sınıflandırılmasını yapan ve uluslararası bir kuruluş olan “Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi” (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından yapılan son açıklamalara göre bugün İridoviridae familyası altında *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus* ve *Ranavirus* olmak üzere 4 cins bulunmaktadır (van Regenmortel vd., 2000) (Tablo 1). Omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar *Iridovirus* (örnek tür: *Chilo iridescent* virüs) ve *Chloriridovirus* (örnek tür: *Mosquito iridescent* virüs) cinsleri altına dahil edilmişlerdir. Omurgasız konakların çoğunluğunu böcekler oluşturmaktadır. Şöyle ki; mevcut omurgasız iridovirüslerinin 40 tanesi Diptera, 8 tanesi Coleoptera ve 7 tanesi de Lepidoptera ordolarından izole edilmişlerdir. Bunun yanında böcek olmayan omurgasız konaklarda

Tablo 1. İridoviridae familyasının sınıflandırılması (Williams, 1998).

Cins	Kullanılan isim	Konak türü	Cinsin üyesi
<i>Iridovirus</i>	Küçük iridescent böcek virüsleri	Çeşitli omurgasız takımlar	<i>Tipula paludosa</i> IV (IV1) <i>Sericesthis pruinosa</i> IV (IV2) <i>Chilo suppressalis</i> IV (IV6) <i>Wiseana cervinata</i> IV (IV9) <i>Witlesia sabulosella</i> IV (IV10) <i>Costelytra zealandica</i> IV (IV 16) <i>Pterosticus madidus</i> IV (IV17) <i>Opogonia</i> sp. IV (IV18) <i>Odontria striata</i> IV (IV19) <i>Simocephalus expinosus</i> IV (IV20) <i>Helicoverpa armigera</i> IV (IV21) <i>Simulium</i> sp. IV (IV22) <i>Heteronychus arator</i> IV (IV23) <i>Apis cerana</i> IV (IV24) <i>Tipula</i> sp. IV (IV25) Ephemopteran (IV26) <i>Nereis diversicolor</i> (IV27) <i>Lethocerus columbiae</i> IV (IV28) <i>Tenebrio molitor</i> IV (IV29) <i>Helicoverpa zea</i> IV (IV30) <i>Armadillidium vulgare</i> IV (IV31) <i>Porcellio scaber</i> IV (IV32)
<i>Chloriridovirus</i>	Büyük iridescent böcek virüsleri	Sivri sinekler	<i>Aedes taeniorhynchus</i> IV (IV3) <i>Aedes cantans</i> IV (IV4) <i>Aedes annulipes</i> IV (IV5) <i>Simulium ornatum</i> IV (IV7) <i>Culicoide's</i> sp. IV (IV8) <i>Aedes stimulans</i> (IV11) <i>Aedes cantans</i> (IV12) <i>Corethralla brakeleyi</i> IV (IV13) <i>Aedes detritus</i> IV (IV14) <i>Aedes detritus</i> IV (IV15) <i>Chironomus plumosus</i> IV
<i>Ranavirus</i>	Kurbağa virüsü	Amfibiler	Frog Virüs 1, 2 Frog Virüs 3 (FV3) Frog Virüs 5-24 Frog Virüs L2, L4, L5 Tadpole Edema virüs <i>Xenopus</i> virüs T21 Lucke triturus virüs LTI-LT4 Newt virüs T6-T20
<i>Lymphocystivirus</i>	Lenfosit hastalığı virüsü	Çeşitli balıklar	Lymphocystivirus type 1 (LCDV-1) Lymphocystivirus type 2 (LCDV-2) <i>Octopus vulgaris</i> disease virüs

vardır. 8 türün izole edildiği izopodlar ve dafnidler başlıcalarıdır. Omurgalıları enfekte eden izolatlarda *Lymphocystivirus* (örnek tür: Flounder virüs) ve *Ranavirus* (örnek tür: Frog virüs 3) cinsleri altına dahil edilmişlerdir. İridovirüsler ile ilgili çalışmaların çoğunluğu Frog virüs 3 (FV3) üzerinde yapılmıştır.

#### 1.4. İridoviridae Familyasının Özellikleri

İridoviridae kelimesi bu familyaya ait, omurgasız konaklardan izole edilen virüslerin çoğunluğunun ağır olarak enfekte ettikleri böceklerde oluşturdukları mavi-yeşil karışımı renk dolayısı ile kullanılmıştır. Bu virüsler ile ağır olarak enfekte olmuş böceklerde mavi-yeşil karışımı, ışık vurdukça parlayan bir renk oluşmaktadır. Dolayısı ile bu familyaya, gökkuşağı gibi rengi olan anlamındaki İngilizce “Iridescence” kelimesinden hareketle “İridoviridae” adı verilmiştir. Omurgalı iridovirüslerinde ise böyle bir renk oluşturma sözkonusu değildir (Williams, 1996).

Bu çalışma sırasında da ağır *Chilo* iridescent virüs enfeksiyonu nedeni ile tüm vücudu mavi-yeşil renge dönmüş *Galleria mellonella* larvasında bu durum gözlemlendi (Şekil 1). Ne var ki mavi-yeşil rengin oluşumu ancak ağır enfeksiyonlarda tespit edilebildi. Ağır enfekte olmayan larvalarda ise renk, enfekte olmamış kontrol larvaların rengine kıyasla belirgin şekilde beyazlaşır.

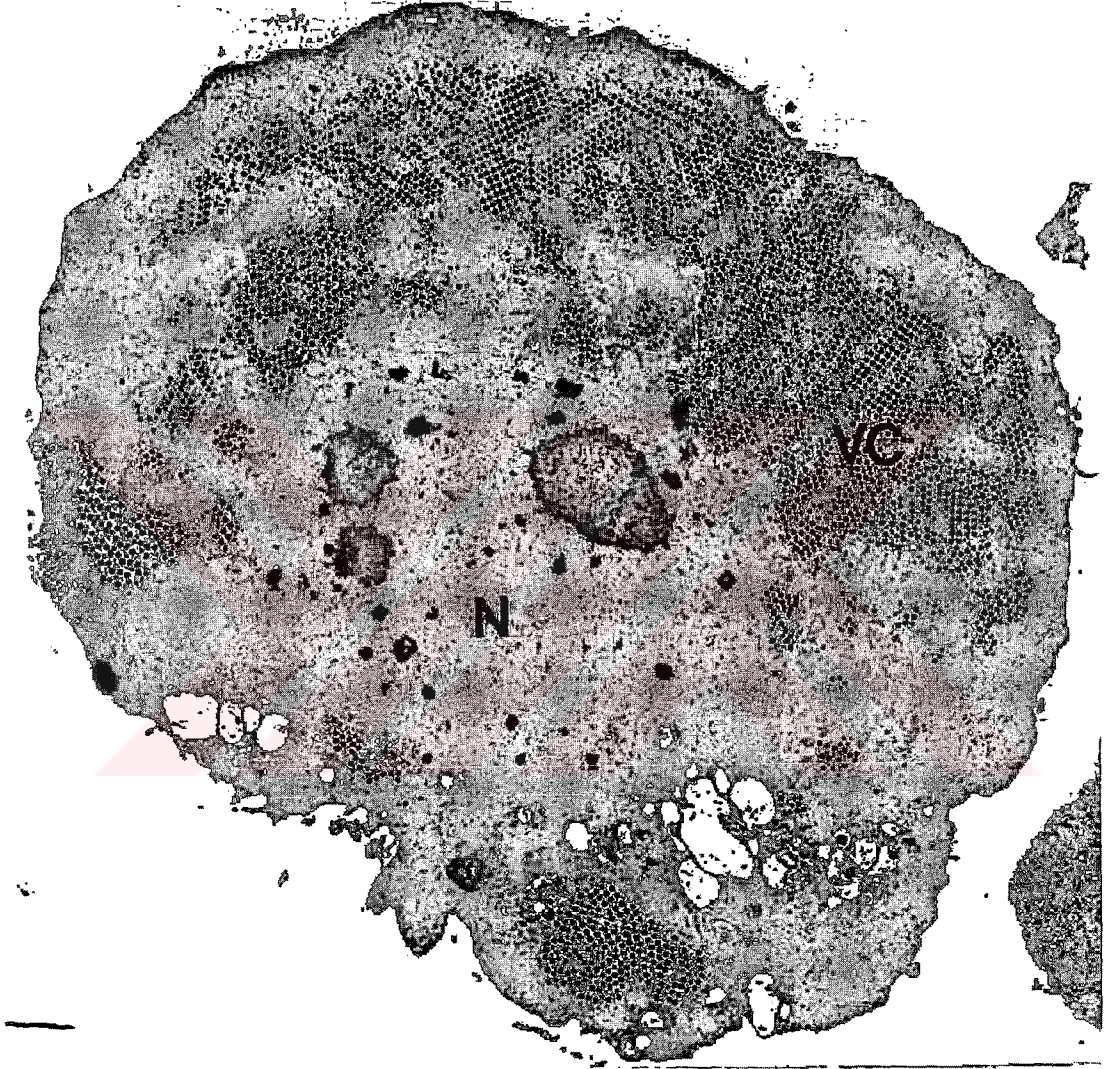


Şekil 1. İridovirüs enfeksiyonu nedeni ile vücudu maviye dönmüş *Galleria mellonella* larvası

İridovirüslerde virion çapı 120-300 nm arasında değişmektedir. Bununla birlikte, virion çapı 350 nm'ye ulaşanlar da mevcuttur. İridovirüsler nükleopolihedrovirüsler (NPVs), granulovirüsler (GVs), sitoplazmik polihedrovirüsler (CPVs) ve entomopoxvirüsler den (EPVs) farklı olarak koruyucu bir protein matriks içine gömülü



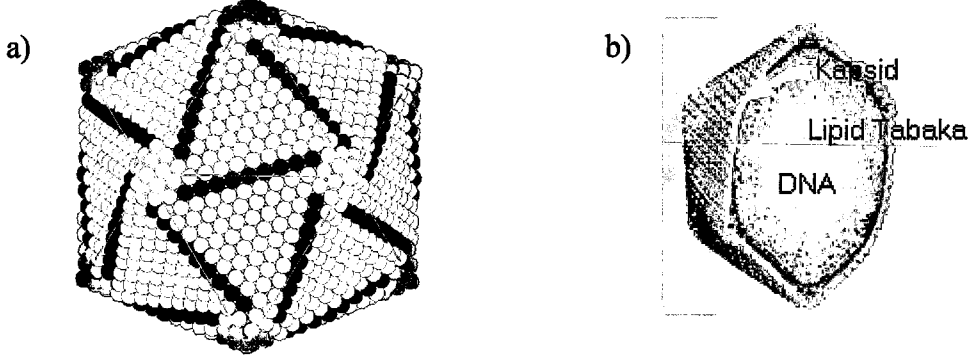
değildir (Williams, 1998). Virionu oluşturan yapıların birleşme işlemi konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir. Dolayısı ile oluşan yeni virüsler hücrenin sitoplazmasında toplanır (Şekil 2).



Şekil 2. İridovirüs ile enfekte olmuş Sf-21 hücrelerinde virüsün sitoplazmik görünümü. N: Nükleus, VC: Virojenik stroma (URL-1, 2003).

İridovirüsler ikosahedral geometriye sahiptir ve virüsün yapısını sırası ile en içte proteinler ile kompleks oluşturmuş DNA, bunları çevreleyen yaklaşık 4 nm kalınlığında lipid tabaka ve bu tabakayı da çevreleyen protein yapıdaki kapsid tabakası oluşturmaktadır (Şekil 3). Kapsid proteini 50 kDa civarında olup virüsün toplam proteinlerinin % 45'ini oluşturmaktadır. Bazı iridovirüslerde virüsü çevreleyen bir zarf bulunmaktadır. Bu zarf

genellikle hücre kültüründe çoğalan iridovirüslerde virüsün hücreden tomurcuklanma yöntemi ile ayrılması durumunda kazanılmaktadır (Williams, 1998).

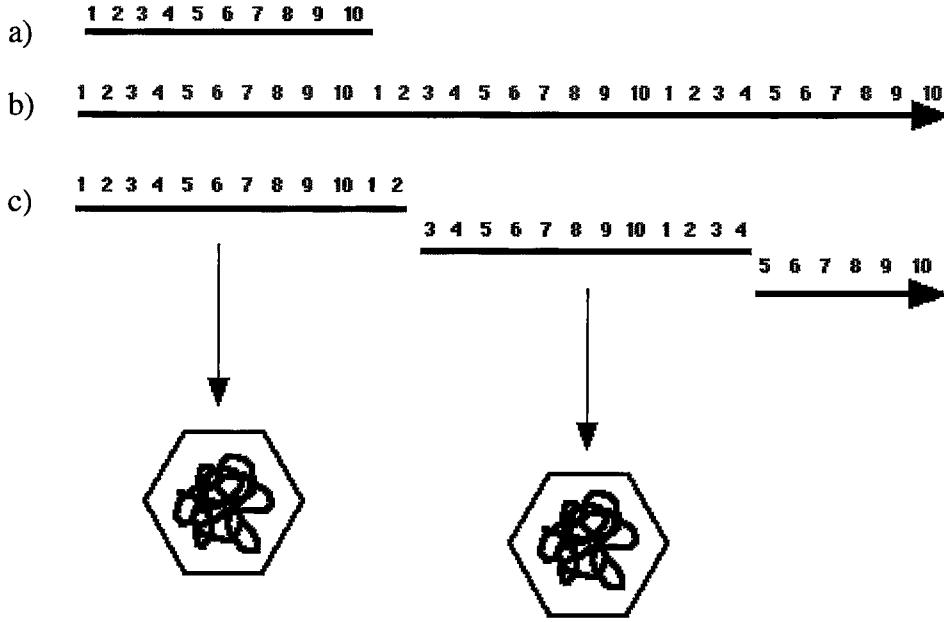


Şekil 3. İridovirüslerde kapsid simetrisini ve iç yapıyı gösteren diyagram. a) kapsid simetrisi, b) ayrıntılı yapı (URL-2, 2000).

### 1.5. İridovirüslerde Genom Özellikleri

İridovirüsler 140-303 kbp büyüklüğünde lineer çift zincirli DNA genomuna sahiptirler (Van Regenmortel vd., 2000). Genom omurgasız iridovirüslerde omurgalılarınkine göre daha büyüktür (Kelly, 1985; Williams, 1998). İridovirüs genomu karakteristik olarak uç kısımlarında bazı genlerin tekrarlarını (terminal redundansi) içerir (Goorha ve Murti, 1982; Willis ve Granoff, 1985) (Şekil 4). Bu özellik ökaryotik virüsler arasında sadece iridovirüslerde mevcuttur. Replikasyon sırasında viral DNA'nın kopyaları (a) parental DNA'dan sentezlendikten sonra peş peşe eklenerek konkatemerleri (b) oluşturur. Konkatemerler halindeki viral DNA kapsit içerisine farklı bölgelerden kesilerek paketlenir (c). Paketlenmiş DNA komple virüs DNA'sının yanında genomdaki bazı genlerin tekrarlarını da içerir. Paketlenen DNA'nın uzunluğu bir virüsten diğerine farklılık gösterir. Bu genomik yapı şimdiye kadar çalışılmış bütün iridovirüslerde tespit edilmiştir. Omurgalı iridovirüslerin genomlarında yüksek oranda metillenme söz konusudur (Willis ve Granoff, 1980; Eaton vd., 1991). Omurgasız iridovirüslerde ise bu durum mevcut değildir.





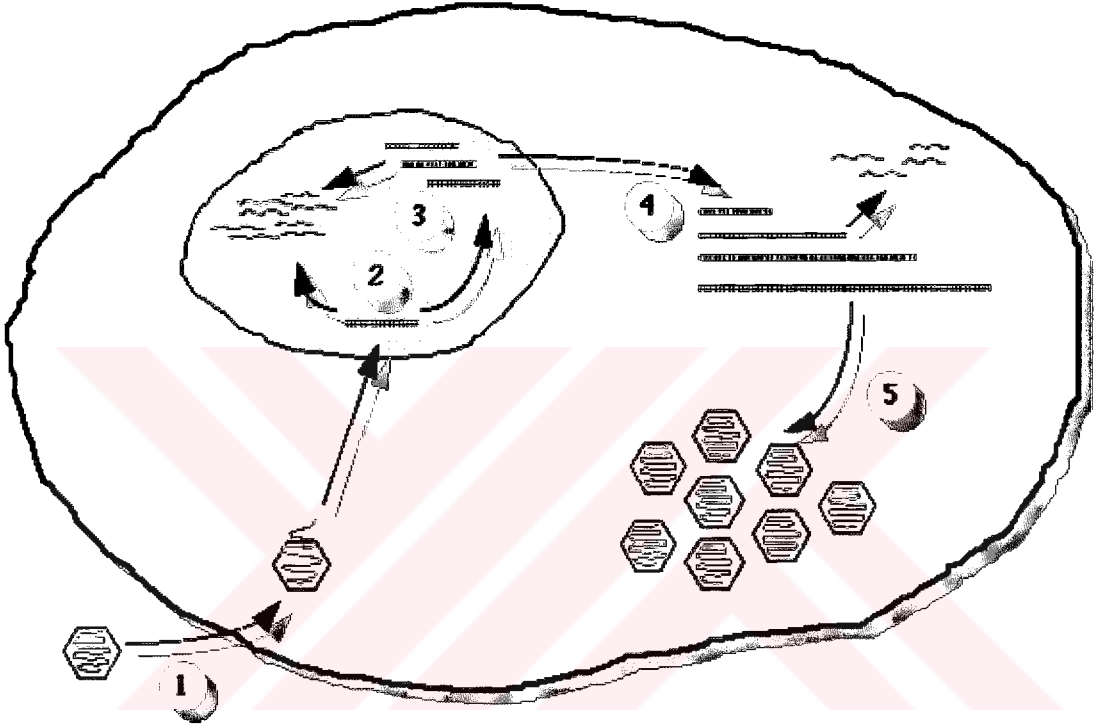
Şekil 4. İridovirüs genomunun "Terminal Redundansı" özelliğinin şematik gösterimi (URL-1, 2003).

## 1.6. İridovirüslerde Replikasyon

İridovirüslerde DNA replikasyonu Frog virüs 3 (FV3) üzerinde ayrıntılı olarak çalışılmış ve bu, İridoviridae familyasının replikasyonu için model olarak kabul edilmiştir. Önceleri DNA genomuna sahip hayvan virüslerinin ya tamamı ile nükleusda (Herpesvirüs, Adenovirüs) ya da sitoplazmada (Poxvirus) replike oldukları bilinmekteydi. Dolayısı ile iridovirüslerin de sitoplazmik virüsler oldukları bilindiği için tamamı ile sitoplazmada replike oldukları düşünülmüştür. Ancak FV3 ile enfekte edilen hücrelerin UV ile inaktivasyonu veya nükleusunun çıkarılması, virüs enfeksiyonuna engel olmuş, dolayısı ile FV3 replikasyonu için fonksiyonel bir nükleusa ihtiyaç olduğu görülmüştür. Nitekim elektron mikroskopu çalışmaları ile virüs DNA'sının, enfeksiyonun başlangıcında hücrenin nükleusunda bulunduğu, daha sonra sitoplazmaya geçtiği ve virüsü oluşturan yapıların birleşme işlemini konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Goorha vd., 1977).

FV3 DNA'sı için replikasyon modeli Şekil 5'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu şekle göre virüs hücreye pinositoz yolu ile girmekte ve hücre içerisinde DNA'sını saran kapsitten kurtulmaktadır (1). Kapsitten ayrılan virüs DNA'sı nükleusa transfer edilmekte ve nükleusta konak RNA pol II'sini kullanarak transkripsiyon başlatılmaktadır. Parental

DNA kullanılarak virüs DNA'sının kopyası oluşturulur (2, 3). Yeni oluşan DNA sitoplazmaya geçer ve sitoplazmada konkatemer oluşumu gerçekleşir (4). Oluşan konkatemerler virüs kapsiti içerisine paketlenir (5). Virionların hücreden ayrılması ise tomurcuklanma yöntemi ile veya hücrenin parçalanması ile gerçekleşir.



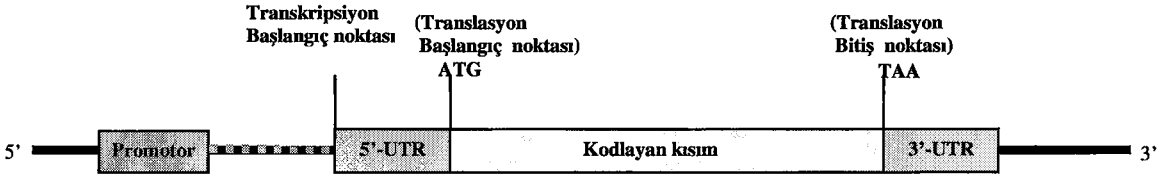
Şekil 5. Frog virüs 3 (FV3) DNA'sının replikasyon modeli (URL-1, 2003).

### 1.7. İridovirüslerde Gen İfadesi ve Regülasyonu

Gen, kromozom üzerinde bulunan, anlamlı bir RNA molekülünün sentezini kodlayan ve gerekli bilgileri taşıyan özgün nükleotid dizisidir. Genlerin yapıları prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda farklılık gösterir. Genel olarak bir genin yapısına bakıldığında, genin kodlayan bölgesinin baş ve aşağı kısımlarında translasyona uğramayan bölgeler (5'-UTR, 3'-UTR) ve translasyon başlangıç noktası olan ATG'nin yukarısında da promotor bölgesi bulunur (Şekil 6).

Gen ifadesi (gen ekspresyonu), genlerin oluşturduğu genetik bilginin DNA'dan RNA moleküllerine ve daha sonra RNA moleküllerinden protein moleküllerine aktarılması ile başlar. Tek bir DNA zincirinin bir kısmının kalıp olarak kullanılarak RNA polimeraz

enzimince polimerizasyonu sonucu RNA molekülleri sentezlenir. RNA zincirinin sentezinin başlaması, zincirin uzaması ve zincir sentezinin sona ermesi olaylarının hepsine birden “transkripsiyon” denilir.



Şekil 6. Model bir genin anatomik yapısı

İridoviridae familyasında, transkripsiyon ve translasyonun düzenlenmesi ayrıntılı olarak FV3 ve CIV’de çalışılmıştır. Önceleri iridovirüslerin, herhangi bir polimeraz aktivitesinin olmadığı konak sitoplazmasında replike oldukları bilindiği için Poxvirüsler gibi kendi RNA polimerazlarına sahip oldukları düşünülmekteydi. Ancak daha sonra FV3 replikasyonunun, konak hücrenin nükleusunun varlığına bağlı olduğu görüldü (Goorha vd., 1978). Replikasyonun ikinci aşamasında gerekli olan proteinlerin ilk aşamada sentezlenmesi (Goorha vd., 1977), konak polimeraz II’sinin viral transkripsiyonun erken safhalarında rol oynadığını göstermektedir (Goorha vd., 1978; Goorha, 1979). CIV ve LCDV-1’de ökaryotik RNA polimeraza ait küçük alt ünitelerin varlığına rastlanmıştır. Ancak bunların muhtemelen transkripsiyonun sitoplazmik fazında rol oynadığı düşünülmektedir.

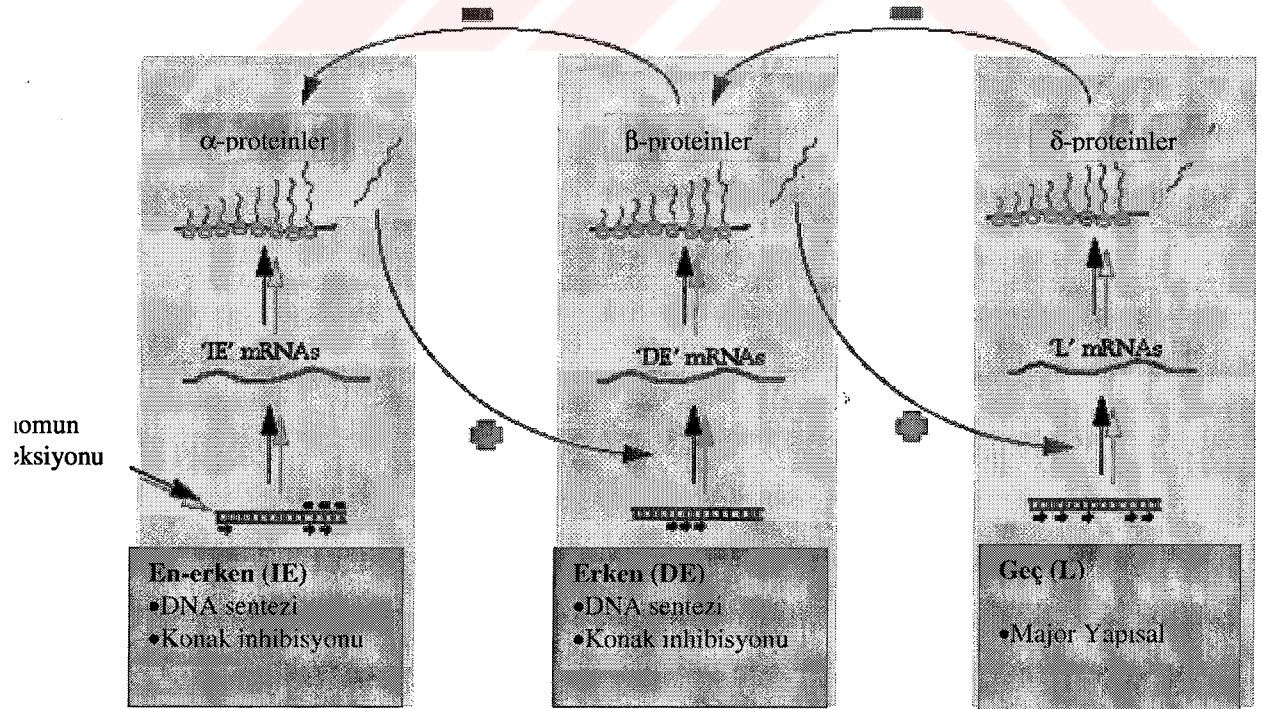
İridovirüslerde gen ifadesi basamaklı bir şekilde düzenlenmekte olup ifade edilen genler en erken ( $\alpha$ , IE), erken ( $\beta$ , DE) ve geç ( $\gamma$ , L) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 7). Her sınıfın ürünleri bir sonraki sınıfın ürünlerini önemli bir şekilde etkilemektedir. En erken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

Saflaştırılmış FV3 DNA’sı hücreye verildiğinde enfeksiyonu başlatamamaktadır. Ancak virion bileşenlerinin saflaştırılmış viral DNA ile birlikte hücreye verilmesi durumunda enfeksiyonun oluşması, virüsün replikasyonu için viriona ait bir bileşenin olması gerektiğini göstermektedir (Willis ve Granoff, 1985). UV veya sıcaklık ile inaktive

olmuş virüsler de ayrı ayrı hücreye verildiklerinde enfeksiyon oluşturamamaktadır. Ancak her ikisinin birlikte hücreye verilmeleri durumunda enfeksiyon görülmüştür. Bu durumda yine UV ile inaktive olmuş virüs partikülünün, sıcaklık ile inaktive olmuş virüsteki DNA'yı aktive etmek için gerekli olan polipeptidleri sağladığı düşünülmektedir. FV3 virion yapısı içerisinde DNA bağımlı RNA polimeraza sahip değildir. Dolayısıyla konak RNA polimeraz II si viral RNA'nın transkripsiyonu için gereklidir (Goorha vd., 1978; Goorha, 1979).

Çoğu iridovirüs mRNA'ları poli A kuyruğuna sahip değildir. Şimdiye kadar poli A kuyruğu sadece, TIV'in 2 mRNA'sında ve LCDV-1 virüsünün fonksiyonu bilinmeyen bazı genlerinde tespit edilmiştir. Bütün iridovirüs mRNA'ları şapka taşır, fakat intron bulundurmaları veya bulundurmamaları ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur.

FV3'deki geç genler DNA replikasyonunun nükleer fazından sonra sentezlenir. Muhtemelen bu genlerin transkripsiyonu, konak RNA polimerazı veya virüs tarafından kodlanan DNA bağımlı RNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir. Böyle bir enzime ait gene CIV'de ve LCVD-1'de rastlanmıştır (Schnitzler vd., 1994; Bahr vd., 1997; Tidona ve Darai, 1997).



Şekil 7. İridovirüslerde transkripsiyonun modeli (URL-1, 2003).

Çoğu ökaryotik virüslerden farklı olarak FV3 genomu yüksek oranda metillenmiştir. Nükleusta oluşan yeni DNA metillenmez. Metilasyon DNA'nın stoplazmaya geçişinden sonra viral DNA metil transferaz tarafından gerçekleştirilir (Willis vd., 1984). Ancak CIV genomu ve diğer böcek virüslerinin de DNA'ları metillenmez. Bu durum metilasyonun FV3 genomuna özgün olduğunu veya CIV ve diğer böcek iridovirüslerindeki metilasyonun transkripsiyon ve düzenlenmesinde kritik rol oynamadığını göstermektedir.

Poxviridae, African Swine Fever virüs (ASFV) ve İridoviridae familyaları büyük sitoplazmik DNA virüsleri olmalarına rağmen replikasyon ve transkripsiyon stratejileri bakımından farklılık gösterir. Poxvirüsler tamamıyla sitoplazmada replike olurken ASFV ve iridovirüslerde ilk olarak nükleusta gerçekleşen bir viral DNA replikasyon safhasının olduğu gösterilmiştir. Poxvirüslerin ve ASFV'lerin benzer DNA yapısına sahip olmaları bunların aynı DNA replikasyon mekanizması göstereceğini düşündürmesine rağmen ASFV'ler DNA sentezi için konak nükleusuna ihtiyaç duymaları bakımından farklılık gösterir. Diğer taraftan ASFV'nin genomunun FV3'ünkinden farklı olmasına rağmen benzer DNA replikasyon mekanizmasına sahiptir.

### **1.8. İridovirüslerde Promotor Özellikleri**

RNA polimerazın DNA üzerinde bağlandığı özel bölgelere "promotor" denilir. Promotor bölgesi genin başlangıç kodonunun (ATG) sola doğru yukarı kısmında (5'-ucu) yer alır. Bu bölgenin baz dizileri genin diğer bölgelerinde bulunmaz ve farklı genler arasında bu bölgeler korunur.

Prokaryot ve ökaryot genleri üzerinde promotor fonksiyonu gören korunmuş bölgeler mevcuttur. Bu bölgeler prokaryotlarda, ATG başlangıç kodonunun A'sı +1 olarak alındığında sola doğru -10 bölgesinde bulunan ve "Pribnow kutusu" olarak bilinen TATAAT baz sırası ile -35 civarında bulunan TTGACA sıralarıdır. Ökaryotlarda ise istisnalar hariç -25 veya -30 civarlarında olup TATA veya "Hogness kutusu" olarak bilinen TATAAAT sırası ile bazı promotorlarda bulunan ve -80 civarlarındaki CAAT kutusu olarak bilinen GG(T/C)CAATCT sırası ve yine bazı promotorlarda görülen ve -90 civarlarındaki GC kutusu olarak bilinen GGGCGG baz sıralarıdır (Turner vd., 1998).

Nükleusta replike olan DNA virüsleri ökaryotik hücrelerinkine benzer promotorlara sahiptir (örn: Baculovirüsler) (Nevins, 1983). Sadece sitoplazmada replike olabilen



Poxvirüsler ise kendi RNA polimerazlarını kodlarlar ve değişik bir düzenleyici element dizisine sahiptirler (Venkatesan vd., 1981).

İridovirüslerde ise replikasyon hem nükleusda hem de sitoplazmada gerçekleşir. Bu virüslerde promotor modelleri üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmamıştır. Sadece bir türe ait (Frog virüs 3; FV3) iki en erken genin (ICR 169, ICR 468) promotor bölgeleri çalışılmıştır. Bunlardan biri olan ve enfeksiyon sırasında fazla miktarda üretilen ICR 169 geni 18 kD büyüklüğünde, fonksiyonu bilinmeyen bir proteini kodlar. ICR 169 da translasyona uğramayan sıralar ve promotor bölgeleri tespit edilmiştir. Transkripsiyon başlangıç noktasının 29 bp yukarı kısmında TATA kutusuna benzer TATTTTA sırası tespit edilmiştir. Yapılan delesyon çalışmalarında bu sıranın tamamen silinmesi genin ekspresyonunu ortadan kaldırmamıştır. Daha fazla delesyonlar yapılmış ve neticede TATTTTA sırasının yukarısında bulunan 14 bazlık (CAGGGGAATTGAAA) kısmın genin promotor bölgesi fonksiyonunda kilit rol oynadığı belirlenmiştir (Willis, 1987). FV3'e ait bir başka en erken gen olan ICR 489 geninde de promotor tayini çalışmaları yapılmış ve genin promotor bölgesinde klasik TATA, CAAT ve GC kutularına rastlanmıştır. Ayrıca genin transkripsiyon başlangıç noktasının yukarı kısmında da ICR 169 geninde tespit edilen 14 bp lik sıraya benzer bir baz dizilimi görülmüştür (Willis ve Granoff, 1985). Fakat bu benzer sıra, genin 5'-kısmının oldukça uzağında bir bölgededir.

### 1.9. İridovirüslerin Üretimi ve Sayımı

İridovirüslerin üretiminde çoğunlukla canlı konaklar kullanılmaktadır. Bu virüsler konak kaynaklarının virüs partikülüne dönüştürülmesinde en etkili böcek virüsleri arasında yer alır. Ölü bir böceğin kuru vücut ağırlığının % 25'i virüs olabilmektedir (Williams ve Smith, 1957). Yaklaşık  $2 \times 10^{15}$  g ağırlığındaki virüs partikülü *Tipula oleraceae* larvasında  $2.5 \times 10^{12}$  (IV1), *Galleria mellonella* pupasında  $2 \times 10^{12}$  (IV2) virüs partikülü oluşturmaktadır (Carter, 1973; Day ve Mercer, 1964).

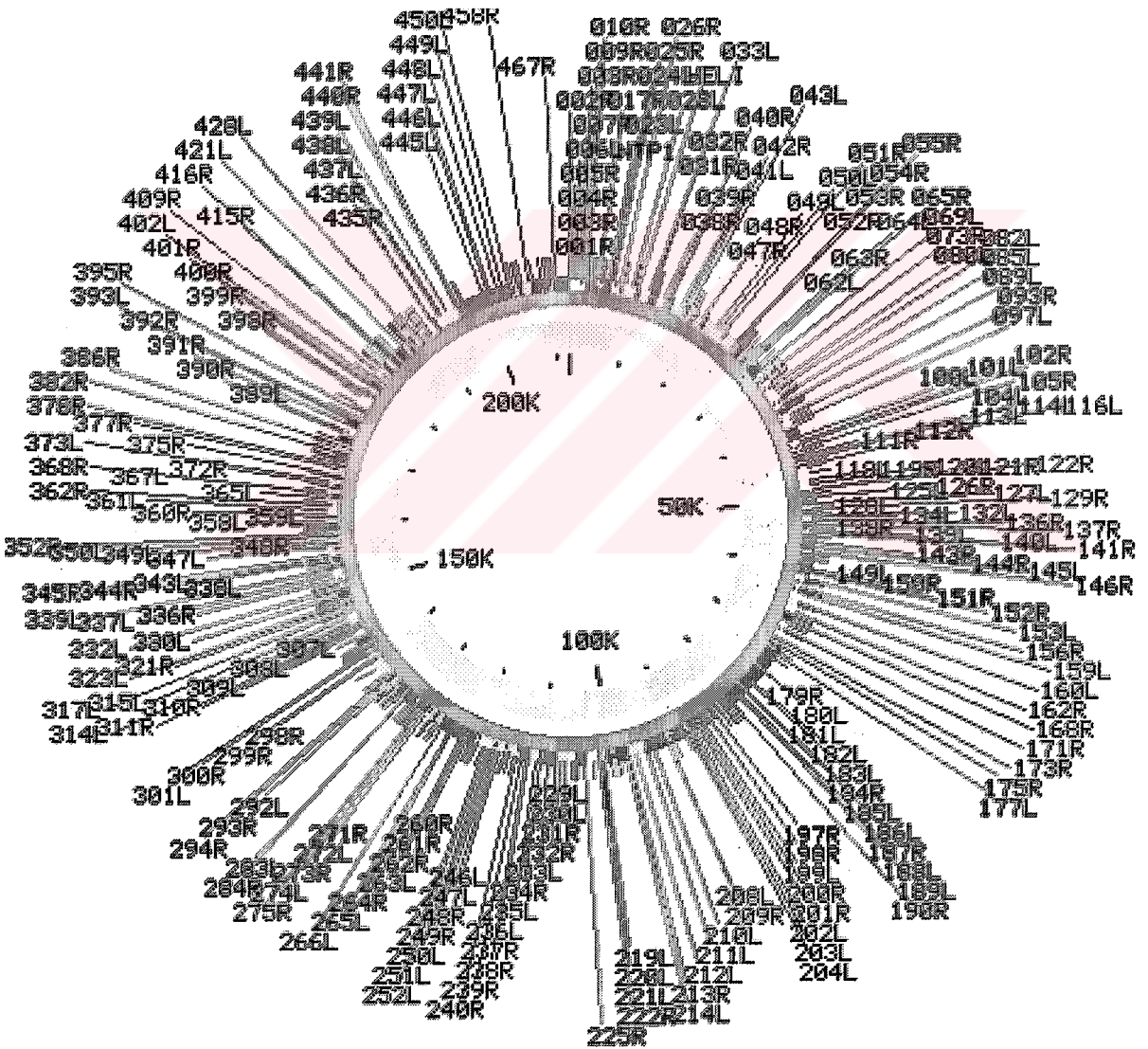
İridovirüslerin sayımı, plak deneyi, elektron mikroskobu ile doğrudan sayım, optik yoğunluk ve enzim bağlı immünosorbent deneyleri (ELISA) ile yapılabilmektedir. 260 nm'deki 1 absorbans değeri  $10^5$  plak oluşturan ünite değerine karşılık gelmektedir (Williams, 1998).

### 1.10. *Chilo* İridescent Virüs (CIV)

*Chilo* iridescent virüs (CIV) İridoviridae familyasının *İridovirus* cinsine ait bir böcek virüsüdür. CIV aynı zamanda “Insect iridescent virus type-6” olarak da bilinir. CIV Japonya’da Fukaya ve Nasu (1966) tarafından bir lepidopter olan *Chilo suppressalis* (Asya piriç deleni) böceğinden izole edilmiştir. CIV’nin konak spektrumu araştırılmış ve 6 ordoya ait (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera) 100’den fazla böcek türünün bu virüse duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; Fukuda, 1971; McLaughlin vd., 1972). CIV ziraatte zararlı bazı herbivor böcekleri enfekte ettiği için ekonomik ve ekolojik olarak özel bir öneme sahiptir (Smith, 1976). Dolayısı ile bu böcek iridovirüsü potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülmektedir (Kleespies vd., 1999; Hernandez vd., 2000). Enfekte ettiği önemli zararlılar arasında *Anthonomus grandis* (Coleoptera; pamuk göz kurdu), *Nephotettix cincticeps* (Homoptera; piriç kurdu), *Colladonus montanus* (Homoptera; dağ kirazı kurdu), *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera; kök kurdu), *Bemisia tabaci* (Homoptera; Pamuk beyaz sineği), *Drosophila melanogaster* (Diptera; sirkesineği), *Galleria mellonella* (Lepidoptera; Büyük balmumu güvesi), *Trichoplusia ni* (Lepidoptera; lahanana kurdu) bulunmaktadır. CIV’nin replikasyonunun tespit edildiği çok çeşitli hücre kültürleri mevcuttur. Bunlar *Choristoneura fumiferana*, *Drosophila melanogaster*, *Pierris rapae*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella*, *Aedes albopictus* hücreleridir. Fakat virüsün üretimi için hücre kültürleri tercih edilmemektedir. Bunun nedeni CIV’nin üretimi için şimdiye kadar verimli bir hücre kültürünün tespit edilememiş olmasındandır.

CIV partikülünde en dışta kapsid örtü, bunun altında lipit tabaka ve bununda altında lineer çift zincirli DNA molekülü mevcuttur. Lineer durumdaki DNA molekülünün “terminal redundansi” özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Delius vd., 1984; Schnitzler vd., 1987; Fischer vd., 1990). Şimdiye kadar CIV ile ilgili virion yapısı, viral proteinlerin enzimatik aktiviteleri (Cerutti ve Devauchelle, 1980; Cerutti vd., 1981), 6 adet replikasyon orijininin pozisyonu ve genomdaki tekrar eden DNA elementlerinin varlığı (Fischer vd., 1988a, b; Handerman vd., 1992) gibi biyolojik ve genomik özellikler çalışılmıştır. Major kapsit protein geni, DNA bağımlı RNA polimeraz büyük alt ünitesi, ATPaz ve DNA polimeraz gibi bazı önemli viral genler tespit edilmiştir (Stohwasser vd., 1993; Tidona vd., 1998; Müller vd., 1999). D’Costa ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada

CIV'nin transkripsiyonel analizi yapılmıştır. DNA ve protein sentezi inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmada CIV'ye ait 38 en erken, 34 erken ve 65 geç genin varlığı tespit edilmiştir. Son olarak da Jakob ve arkadaşları (2001) tarafından CIV'nin bütün genomunun dizin analizi gerçekleştirilmiştir. Genom büyüklüğü 212,418 bp olarak tespit edilmiştir. Baz bileşimi %71,37 oranında A+T, %28,63 oranında da G+C'den oluşmaktadır. Yine dizin analizi sonucunda CIV genomunda 468 adet gen kodlandığı tespit edilmiştir (Şekil 8, Ek Tablo 1).



Şekil 8. *Chilo iridescent* virüs genomunun gösterimi (Jakob vd., 2001).



### 1.11. Çalışmanın Amacı

Bu tezde İridoviridae familyasına ait iridovirüs cinsi üyesi olan *Chilo iridescent* virüs (CIV) üzerinde çalışılmıştır. CIV'nin üretiminde konak olarak çeşitli larvalar kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanlar *Galleria mellonella* ve *Trichoplusia ni* larvalarıdır. CIV'nin üretimi için hücre kültürünün tercih edilmemesinin nedeni, şimdiye kadar üretken bir hücre kültür sisteminin bu virüs için geliştirilememiş olmasından kaynaklanmaktadır. CIV'nin replikasyonunun tespit edildiği çok çeşitli hücre kültürleri bildirilmiştir (Constantino vd., 2001). Fakat şimdiye kadar CIV'nin *Bombyx mori* hücrelerindeki replikasyonu hakkında herhangi bir bilgi yoktur. Dolayısı ile bu çalışmada üretken bir hücre kültür sistemi tespit etmek amacı ile CIV'nin *Bombyx mori* hücrelerindeki replikasyonu ışık mikroskobu, DNA-DNA hibridizasyonu ve revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleri ile araştırılacaktır.

Ayrıca literatüre bakıldığında CIV'ye ait genlerin promotor modelleri üzerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Promotor modellerinin bilinmesi genlerin düzenlenmesinin anlaşılması için önemli bir adımdır. Bu sebeple, bu çalışmada ileride biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılacak CIV'nin, genlerini düzenleyen promotor modellerinin tayini üzerinde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilecektir. Bu amaç için önce CIV'ye ait iki gen belirlendi; DNA polimeraz (*dnapol*) ve major kapsid proteini (*mcp*) genleri. Bu iki genin öncelikle transkripsiyon sınıfları, "Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)" yöntemi ile tespit edilecektir. Genlerin proteine dönüşmeyen baz dizinlerinin (5'-UTR) sırası cDNA'nın 5' uçlarının rastgele çoğaltılması (5'-RACE) yöntemi ile aydınlatılacak. Son olarak, genlerin promotor bölgelerinin bulunabileceği muhtemel sıralar lusiferaz metodu ile tayin edilecektir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini

*Bombyx mori* (SPC-BM-36) hücre kültürü “Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürlerinin Koleksiyonu (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-DSMZ)” kuruluşundan temin edildi. Hücreler 27 °C’ de %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma, Kat No: F-0643) ihtiva eden besiyeride (Grace’s Insect Medium-GIBCO, Kat No: 11605-045) büyütüldü.

*Chilo iridescent* virüs tip-6 (CIV) (Fukaya ve Nasu, 1966) Dr. C. Joel Funk (USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona)’dan temin edildi.

### 2.2. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Virüsün çoğaltılması için konak olarak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları kullanıldı. Larvalar virüs ile, 30 G1/2 iğne kalınlığına sahip enjektör kullanılarak enfekte edildi. Enfekte edilen larvalar 27 °C’ de 3 hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enfeksiyonun geliştiği larvalar –80 °C’ de muhafaza edildi.

Virüsün saflaştırılması Marina ve arkadaşlarının (1999) geliştirdikleri metoda göre gerçekleştirildi. Donmuş 1 adet larva 1 ml steril ddH<sub>2</sub>O’da homojen hale getirildi. Homojenat sırası ile 490×g, 960×g ve 1.250×g’de 10’ar dk santrifüj edilerek doku parçalarından ve kaba partiküllerden arındırıldı. Ardından 15.300×g’de santrifüj edilerek virüs çökelti haline getirildi. Çökelti 500 µl steril ddH<sub>2</sub>O’da çözüldü ve % 30’luk sukroz çözeltisi üzerine bırakılarak 15.300×g’de 30 dk santrifüj edildi. Oluşan çökelti 1 kez yıkandı ve 1 ml steril ddH<sub>2</sub>O’da çözüldü. Bu şekilde saflaştırılan virüs 0,22 µm’lik filtreden süzülerek steril tüplerde toplandı ve +4 °C’ de muhafaza edildi.

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

## **2.3 *Chilo Iridescent* Virüs'ün (CIV) *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründeki Replikasyonunun Tespiti**

### **2.3.1. CIV'nin SPC-BM-36 Hücrelerindeki Replikasyonunun Işık Mikroskobu ile Tespiti**

CIV'nin SPC-BM-36 hücrelerinde replikasyon sonucu oluşturduğu sitopatik etkileri belirlemek için hücreler tek basamak büyüme koşulları altında virüs ile 5 µg/ml konsantrasyonunda enfekte edildi (D'Costa vd., 2001). Virüsün hücrelere tutunması için hücreler 1 saat boyunca 50 rpm hızına ayarlanmış sallayıcı platform üzerinde bekletildi. Bu süre sonunda virüs hücrelerin üzerinden alındı ve hücreler FBS'siz besiyeri ile yıkandı. Hücrelerin üzerine FBS katkılı besiyeri ilave edildi ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak kullanılan enfekte olmamış hücreler de aynı şekilde muamele edildi.

Enfeksiyonu takip eden 48. ve 72. saatlerde hücrelerin durumları ışık mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı.

### **2.3.2. CIV'nin SPC-BM-36 Hücrelerindeki Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyon Yöntemi ile Tespiti**

#### **2.3.2.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Nitroselüloz Membrana Geçirilmesi**

Virüs enfektivitesini belirlemenin önemli bir yolu viral DNA replikasyonunun tespit edilmesidir. Bunun için SPC-BM-36 hücreleri, DNA replikasyonu engelleyicisi olan sitozin β-D-arabino-furanozit (Ara-C) (Sigma, Kat No: C-1768) inhibitörünün mevcudiyetinde ve inhibitörün olmadığı ortamlarda CIV ile yukarıda belirtildiği gibi tek basamak büyüme koşulları altında enfekte edildi. Enfeksiyonlar 35 mm'lik hücre kültür kaplarında yapıldı. Enfekte olmamış hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. 24 saat sonra enfekte olmuş ve olmamış hücrelerden hücre lizatları elde edildi (Demirbağ, 1993). Lizatları elde etmek için hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak yerine 0,5 M sodyum hidroksit ve 10 M amonyum asetat karışımı ilave edildi. Hücreler bu karışım içerisinde pipetlenerek parçalandı. Oluşan hücre lizatı +4 °C'de kullanılıncaya kadar bekletildi.

CIV ile inhibitör varlığında ve yokluğunda enfekte olmuş hücrelerden elde edilen lizatlardan 100'er µl nitroselüloz membrana (Sigma, Kat No: 7897) geçirildi. Membrana geçirme "slot blot" aleti (Hoefer Scientific Instruments) kullanılarak gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak CIV DNA'sı, negatif kontrol olarak da enfekte olmamış SPC-BM-36 hücrelerinden elde edilen lizatlar membrana geçirildi. Membran oda sıcaklığında 30 dk kurutuldu. DNA'ların membrana bağlanmasını sağlamak için membran 5 dk UV ışığı ile muamele edildi ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi.

### 2.3.2.2. Proben Hazırlanması ve İşaretlenmesi

CIV'ye ait major kapsid protein geni (*mcp*) prob olarak kullanıldı. Bu geni elde edebilmek için CIV DNA'sı *mcp*'ye ait özel primerler ile PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. PCR reaksiyonu 2 µl virüs DNA'sı (35 ng/mL), 1'er µl özel primerler (10 µM), 1 µl dNTP (10 mM), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl 10×PCR tamponu, 5 ünite *Taq* DNA polimeraz (0,5 µl) ve 35.5 µl H<sub>2</sub>O biraraya getirilerek hazırlandı. PCR reaksiyonu ise 94 °C'de 2 dk'lık ilk denaturasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1 dk bekletilerek gerçekleştirildi. PCR ürünü %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Elektroforez sonucunda UV ışığı altında görünen DNA fragmenti jelden kesilip çıkartıldı. DNA fragmentini ihtiva eden jel parçası cam pamuğu kullanılarak hazırlanmış, fragmenti jelden temizleme ünitesinde, 14.500×g'de 10 dk santrifüj edildi. Jel parçaları cam pamuğu tarafından tüpün üst kısmında tutuldu. *mcp* genini ihtiva eden DNA fragmenti ise sıvı halinde tüpün alt kısmında toplandı.

Bir mikrosantrifüj tüpüne jelden temizlenmiş olan *mcp* geninden 16 µl (~1 ug) bırakıldı ve 10 dk kaynayan su içinde bekletildi. Hemen buz üzerine alınıp karıştırıldıktan sonra üzerine DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Kat No: 1 745 832)'ine ait işaretleme çözeltisinden 4 µl ilave edildi ve nazikçe santrifüj edildi. 37 °C' de 16 saat inkübe edilerek işaretleme gerçekleştirildi. Ardından 65°C'de 10 dk bekletilerek reaksiyon durduruldu. Kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### 2.3.2.3. Slot-Blot Hibridizasyonu

Prehibridizasyon ve hibridizasyon, radyoaktif olmayan DNA işaretleme kiti (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I -Roche Diagnostics GmbH, Kat No: 1 745 832) ve bu kitte tavsiye edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi.

Prehibridizasyon öncesi, hibridizasyon tamponu kaynayan su banyosunda 10 dk bekletildi ve ardından hemen buz üzerine alındı. Tampon buz üzerinde biraz soğutulduktan sonra (yaklaşık 42 °C) daha önceden numuneleri emdirilmiş olan membranın üzerine döküldü ve 42 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında 16 saat bekletildi. Daha sonra yeni bir tampon alındı ve 5 µl işaretlenmiş probdan ilave edilerek kaynayan su banyosunda 10 dk bekletildi. Ardından hemen buz üzerine alındı. Membranın üzerindeki prehibridizasyon tamponu döküldü ve yerine prob ihtiva eden hibridizasyon tamponu boşaltıldı. 16 saat boyunca 42 °C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda şişenin içerisindeki hibridizasyon tamponu alınıp bir tüpe aktarıldı ve -20 °C'de muhafaza edildi. Membran 2×SSC, % 1'lik SDS içerisinde oda sıcaklığında 2 defa 5'er dk sallayıcı üzerinde yıkandı. Membran tekrar 2×SSC, % 1'lik SDS içerisinde 65 °C'de 2 defa 15'er dk sallayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra membran 20 ml maleik asit tamponunda 5 dk sallayıcı üzerinde yıkandı. 70 ml bloklama çözeltisinde 30 dk sallayıcı üzerinde bekletildi. 20 ml bloklama çözeltisinde 4 ml DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I'deki vial 4'den ilave edildi. (1:5.000 oranında). Membran bunun içerisinde 30 dk sallayıcı üzerinde bekletildi. 2 defa 15'er dk yıkama çözeltisinde (50'şer ml) yıkandı. 10 ml taze hazırlanmış renk çözeltisinde, üzeri kapalı olarak karanlıkta bekletildi (10-15 dk içerisinde renk oluşmaya başlar). Oluşan rengin koyuluğuna göre 2 saat sonra membran bu çözelti içerisinde alındı ve fotoğraflandı.

### 2.3.3. CIV'nin SPC-BM-36 Hücrelerindeki Replikasyonunun Transkripsiyonal Olarak Tespiti ve Genlerin Transkripsiyon Sınıflarının Tayini

SPC-BM-36 hücrelerindeki CIV replikasyonunu transkripsiyonal olarak belirlemek için CIV ile enfekte olmuş hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı (Chomczynski, 1993). İzole edilen RNA özel primerler kullanılarak revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizine tabi tutuldu. Bu sırada belirlediğimiz *dnapol* ve *mcp*

genlerinin transkript edildikleri sınıfları da tayin edebilmek için CIV ile enfekte olmuş SPC-BM-36 hücreleri, DNA ve protein sentezi inhibitörleri ile muamele edildi. Bu şekilde muamele edilmiş hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen RNA RT-PCR analizine tabi tutuldu.

### **2.3.3.1. Enfekte Olmuş Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu ve Konsantrasyon Tayini**

SPC-BM-36 hücreleri daha önce belirtildiği şekilde üç set olarak 6 gözlü hücre kültürü kaplarında enfekte edildi. Uygun hücrelerin bir seti enfeksiyondan 1 saat önce 200 µg/ml konsantrasyonunda protein sentezi inhibitörü sikloheksimit (Cyc) (Sigma, Kat No: 7698) ve 100 µg/ml konsantrasyonunda da DNA sentezi inhibitörü sitozin β-D-arabino-furanozit (Ara-C) ile muamele edildi (Demirbağ, 1993). Bu inhibitörler enfeksiyon boyunca aynı konsantrasyonda uygulandı. Toplam RNA enfekte olmuş hücrelerden 0. ve 24. saatte trizol (Gibco, BRL, Kat No: 15596-026) kullanılarak firma tarafından tavsiye edilen yöntemle göre izole edildi. İzolasyon için hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve her göze 1 ml Trizol ilave edildi. Trizol pipetlenerek hücrelerin tabandan kopması ve parçalanması sağlandı. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerlerine 0,2 ml kloroform ilave edildi. Nazikçe alt üst edildi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Karışım 12.000×g'de, 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe transfer edilip, buna 0,5 ml izopropanol ilave edildi ve yine nazikçe alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildikten sonra 12.000×g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve çökelti 1 ml %70'lik etanol ilave edilerek yıkandı. 7.500×g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen RNA çökeltisi havada 10-15 dk kurutulduktan sonra RNaz ihtiva etmeyen 30 µl ddH<sub>2</sub>O'da çözülerek -20°C'de muhafaza edildi. İzole edilen RNA -80 °C'de saklandı.

RNA konsantrasyonunun tayini spektrofotometrede 260 nm'de gerçekleştirildi. 260 nm'de ki 1 ünite absorbans değeri 40 µg/ml RNA'ya karşılık gelmektedir.

### 2.3.3.2. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR analizi için, CIV ile inhibitörler (Ara-C ve Cyc) varlığında veya yokluğunda enfekte edilmiş SPC-BM-36 hücrelerinden izole edilen RNA'lardan 2'şer µg tüplere bırakıldı. Bunların üzerine 10 ünite superscript II revers transkriptaz (Invitrogen), 10 ünite RNAsin ve 12.5 µM *mcp* ve *dnapol* genleri için özel revers primerlerden (*MCP R*, *DNAPOL R*, Tablo 2) konuldu. Reaksiyon 20 µl'lik hacim içinde 37 °C'de 1 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen cDNA'ların 2'şer µl'si özel "revers" ve "forward" primerler (*MCP F*, *MCP R*, *DNAPOL F*, *DNAPOL R*, Tablo 3) kullanılarak PCR' da çoğaltıldı. PCR reaksiyonu 2 µg RNA, 0,4 µM her bir primerden, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, %0,1 Triton X-100 ve 0,5 ünite *Taq* DNA polimeraz (Promega) içerecek şekilde 50 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu 94 °C'de 2 dk'lık ilk denaturasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C'de 1 dk, 50 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1 dk bekletilerek gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Ayrıca iki de kontrol kullanıldı. Biri için PCR da doğrudan RNA kullanılırken diğeri için de CIV ile enfekte olmuş hücrelerden 0. saatte izole edilen RNA dan elde edilen cDNA kullanıldı.

Tablo 2. RT-PCR deneyinde kullanılan primerler

Primer Adı	Sıralar (5' - 3')
<i>DNAPOL R</i>	CAC CTC TTT GTC CCA TTT TAG G
<i>DNAPOL F</i>	CAA GGA ACA AGA ACA TAT AAG
<i>MCP R</i>	CCA AGT GCT CCG CCG GAA
<i>MCP F</i>	CTT CTG GTT TCA TCG ATA TCG



## 2.4. *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Hücrelerinde Üretilen Yeni CIV ile Bu Hücrelerin Yeniden Enfeksiyonu

Larvadan izole edilen CIV kullanılarak *Bombyx mori* hücreleri daha önce belirtildiği şekilde enfekte edildi. Enfekte edilmiş hücrelerde üretilen yeni CIV kullanılarak sağlıklı *Bombyx mori* hücreleri enfekte edildi (Demirbağ, 1993).

## 2.5. Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerinin (5'-UTR) ve Transkripsiyon Başlangıç Noktalarının Tespit Edilmesi

### 2.5.1. Genlerin cDNA'larının 5' Uçlarının Hızlı Çoğaltılması (5'-RACE) ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

*mcp* ve *dnapol* genlerinin transkripsiyon başlangıç noktalarını tespit edebilmek için 5'-RACE tekniği kullanıldı. Deney şartları 5'-RACE kitindeki (ROCHE, Kat No: 1 734 792) kullanma yöntemine göre oluşturuldu. Şekil 9'da 5'-RACE analizi toplu halde şematik olarak anlatılmaktadır.

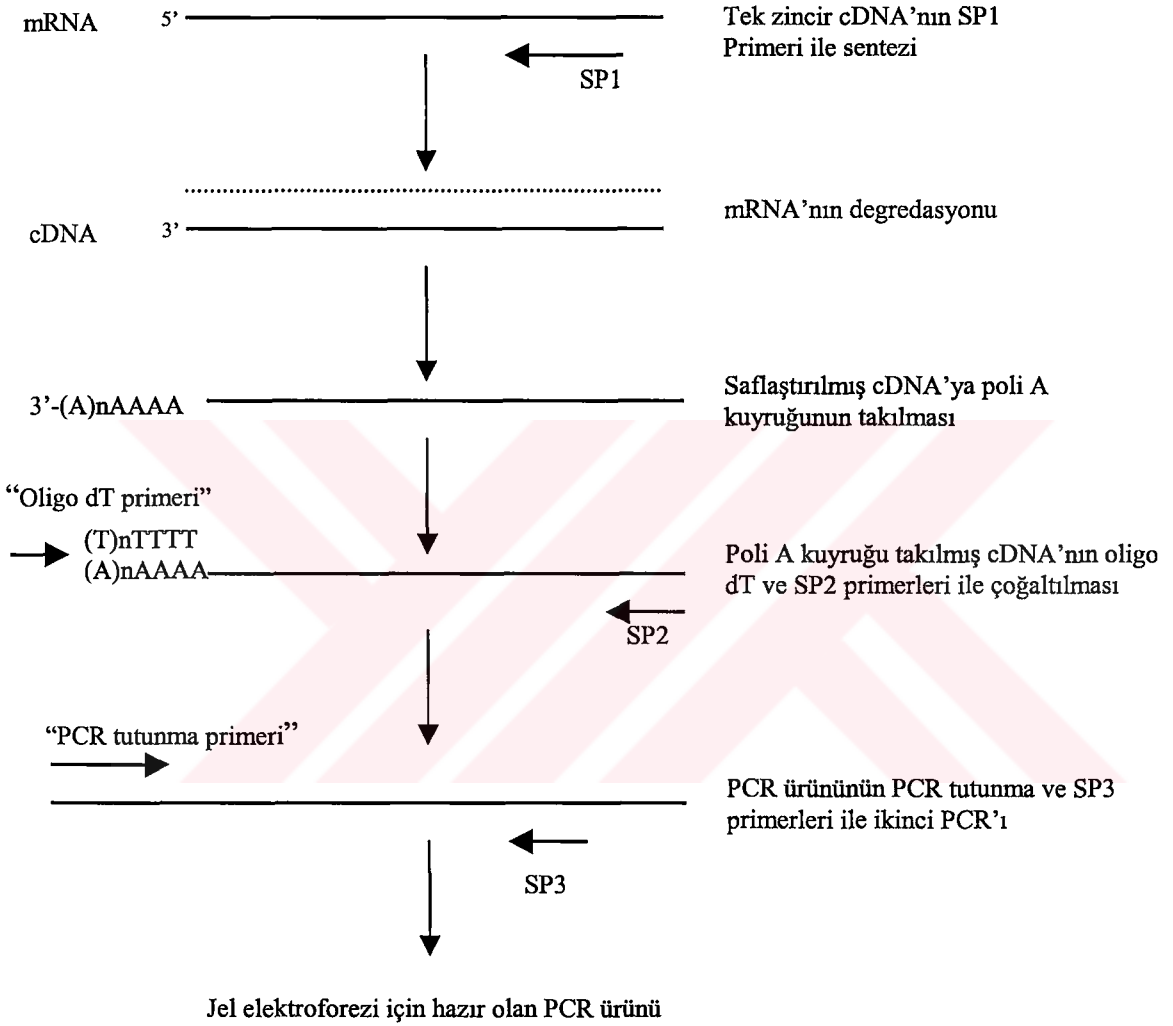
5'RACE analizinin ilk aşamasında toplam RNA'dan, gen için özel primerler (*DNAPOL* SP1, *MCP* SP1, Tablo 2) kullanılarak tek zincir cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her gen için ayrı birer tüpe;

cDNA sentez tamponu (tüp 1)	: 4 µl
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 2 µl
Her gen için özel SP1 primeri	: 1 µl (12 µM)
Toplam RNA	: 2 µg (3 µl)
AMV revers transkriptaz (tüp 2)	: 1 µl
H <sub>2</sub> O	: 9 µl

karışımı bırakıldı. Karışımın 55 °C'de 60 dk ve 65 °C'de de 10 dk bekletilmesi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA, "High Pure PCR Product Purification Kit'i (ROCHE, Kat No: 1732668)" kullanılarak temizlendi. Buna göre 20 µl hacimdeki cDNA'nın üzerine 100 µl bağlama tamponu ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. cDNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj



tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 20 µl 10 mM Tris-HCl ilave edildi ve 13.000×g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu şekilde cDNA, tampon ve enzim gibi kimyasallardan temizlenmiş oldu.



Şekil 9. 5'RACE analizinin şematik gösterimi

Temizlenen cDNA'nın 3' ucuna terminal transferaz enzimi kullanılarak “poli A” kuyruğu takıldı. Her gen için birer tüpe;

Temizlenen cDNA örneği	: 19 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 2,5 µl
2 mM dATP (tüp 4)	: 2,5 µl

karışımı bırakıldı ve karışım 94 °C’de 3 dk bekletildikten sonra hemen buz üzerine alındı. Üzerine 1 µl terminal transferaz (tüp 6, 10 ünite/µl) ilave edilip karıştırıldı ve 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından enzimi inaktive etmek için 70 °C’de 10 dk bekletildi.

Bu şekilde “poli A” kuyruğu takılmış cDNA özel primerler (*MCP SP2*, *DNAPOL SP2*, *MCP SP3*, *DNAPOL SP3*, Tablo 3) kullanılarak birbirini takip eden iki ayrı PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Birinci PCR reaksiyonunda her gen için ayrı birer tüpe;

“Poli A” kuyruğu takılmış cDNA	: 5 µl
Oligo dT primeri (tüp 8)	: 1 µl
Her gen için özel SP2 primeri	: 1 µl (12 µM)
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl
H <sub>2</sub> O	: 36,5 µl

karışımı bırakıldı ve PCR yapıldı. PCR reaksiyonu 94 °C’de 2 dk’lık ilk denatürasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C’de 1 dakika, 45 °C’de 1 dk ve 72 °C’de 1 dk bekletilerek gerçekleştirildi.

İkinci PCR reaksiyonunda ise yine her gen için ayrı birer tüpe;

Birinci PCR ürünü	: 1 µl
PCR-tutunma primeri (tüp 9)	: 1 µl
Her gen için özel SP3 primeri	: 1 µl (12 µM)
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl
H <sub>2</sub> O	: 40,5 µl

karışımı bırakıldı ve üstteki PCR programına tabi tutuldu. Neticede oluşan ürün %1,5’lik agaroz jelde elektroforez edildi.

Tablo 3. 5'-RACE analizinde kullanılan primerler

Primer Adı	Sıralar (5'- 3')
<i>DNAPOL SP1</i>	CTC CCG GAG ATG TTT GAA C
<i>DNAPOL SP2</i>	CAC AGG CTT TAA ATC TCC TA
<i>DNAPOL SP3</i>	GAA CTT TAG GCT GTC CGC
<i>MCP SP1</i>	CCA CCT AAT TCT ACC ATT GG
<i>MCP SP2</i>	GGA ATT CTC ACT CTT AGC C
<i>MCP SP3</i>	GCA GAC CAT TCG CTT CCA

### 2.5.2. Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerini İhtiva Eden DNA Zincirlerinin Agaroz Jelden Temizlenmesi ve pGEMT-Easy Vektörüne Klonlanması

Elektroforez edilen PCR ürünlerinin oluşturdukları bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüplerine alındı ve ürünün jelden temizlenmesi "Concert Gel Extraction Systems (Gibco BRL, Kat No: 11457)" kiti ve kitin içindeki kullanma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 10 mg jel parçası için 30 µl jel çözme tamponu (L1) ve yine her 10 mg jel parçası için 1 µl silika rezin ilave edildi. Karışım 50 °C'de 15 dakikadan az olmayacak şekilde jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. Bu süre sonunda tüpler 12.000×g'de 30 saniye santrifüj edildi ve çökelti üstündeki sıvı atıldı. Çökelti tekrar 1 kez jel çözme tamponu (L1) ile ve ardından 2 kez de yıkama tamponu (L2) ile pipetlenerek yıkandıktan sonra havada kurutuldu. Kuruyan çökelti 20 µl TE tamponu içerisinde çözüldü ve 50 °C'de 5 dk inkübe edilerek DNA'nın rezinden ayrılması sağlandı. DNA içeren sıvı 12.000×g'de 30 saniye santrifüj işleminden sonra temiz tüplere alındı. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu % 1,5'lük agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEMT-Easy vektörüne 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg PGEMT-Easy) klonlandı. Reaksiyon 1 µl PGEMT-Easy vektörü, 5 µl 2×ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 3 µl DNA fragmenti biraraya getirilerek 10 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### 2.5.3. Elektrokompotent DH5 $\alpha$ *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Petriye ekilmiş DH5 $\alpha$  *E. coli* hücrelerinden tek bir koloni alınıp, NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB sıvı besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dk buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4.000×rpm hızında 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti soğuk % 10'luk gliserolde çözüldü ve 5.000×rpm'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompotent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50  $\mu$ l'lik hacimlerde) ve -80 °C'de saklandı.

### 2.5.4. Elektrotransformasyon

Genlerin translasyona uğramayan DNA zincirlerinin klonlandığı plazmitleri hücreye aktarmak için elektrokompotent DH5 $\alpha$  hücreleri kullanıldı. Kompotent *E. coli* hücrelerinin bulunduğu tüpler buz üzerine alındı ve bu hücrelerin üzerlerine 1-3  $\mu$ l ligasyon karışımından konuldu ve karıştırıldı. Karışım elektroporasyon küvetlerine aktarıldı ve küvetler elektroporasyon cihazına (BioRad) yerleştirildi. Küvetler cihazda 200 ohm, 1,5-2K ve 25mF'de 3-4 sn bekletildi. Ardından küvetin içeriği 1ml LB broth besiyerine transfer edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler 6.000×rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hücreler 200  $\mu$ l LB sıvı besiyerisinde süspanse edildi ve petri kaplarında bulunan LB-Agar besiyerisi üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler 37 °C'de 1 gece inkübasyona konuldu. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden gece kültürleri hazırlandı.

### **2.5.5. Genlerin Proteine Dönüşmeyen 5' Bölgelerini İhtiva Eden Klonların Seçilmesi için Plazmit DNA'larının Hızlı Miniprep Metodu ile İzolasyonu**

Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000×g'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, % 0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14.000×g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %100'lük etanol ilave edilerek 14.000×g'de 2 dk santrifüj yapıldı. Çökelti % 70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü.

### **2.5.6. Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerini İhtiva Eden Plazmit DNA'larının Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi**

İzole edilen plazmit DNA'ların DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA, 0,5 µl *EcoRI* (promega), 1,5 µl enzime ait 10× tamponu ve 3 µl H<sub>2</sub>O olacak şekilde 15 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

### **2.5.7. Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerini İhtiva Eden Klonların Dizi Analizi**

*dnapol* ve *mcp* için doğru olduğu gözlenen klonların 3'er tanesi tespit edildi. Bu klonlardan kit (High Pure Plasmid Isolation Kit-Roche, Kat No: 1 754 777) kullanılarak saf plazmit DNA'ları izole edildi. Bunun için 3 ml kültür 9.000×g'de 30 saniye santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 µl süspansiyon tamponunda çözüldü ve üzerine 250 µl parçalama tamponu ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra üzerine 350 µl bağlanma tamponu ilave edildi. Tekrar oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 10 dk en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kitte bulunan ve

içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 100 µl H<sub>2</sub>O ilave edildi ve 13.000×g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü. Tüm DNA'lardan 100 µl'lik hacim içinde 100 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek BaseClear Firmasına (BaseClear, P.O.Box 1336, 2302 BH Leiden, The Netherlands) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi. Dizin analizi için M13 primeri kullanıldı.

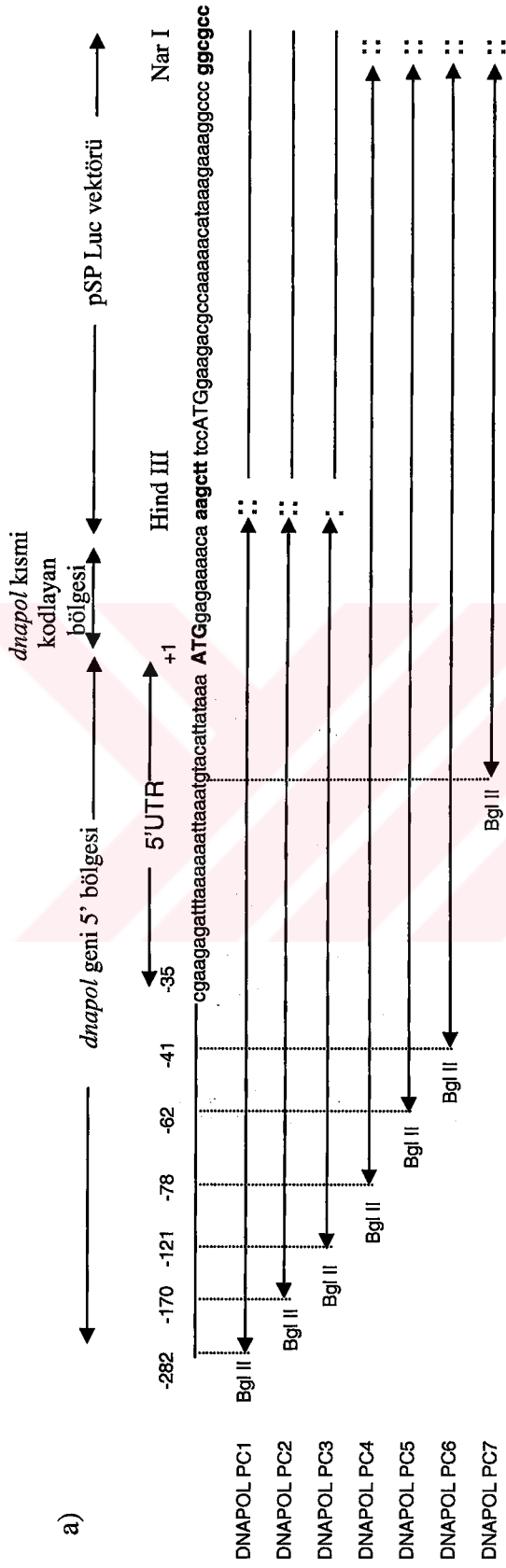
## 2.6. Gen Ekspresyonu

### 2. 6. 1. Lusiferaz Deneyi için, *dnapol* ve *mcp* Genlerinin Muhtemel Promotor Bölgelerini İhtiva Eden Rekombinant Promotor Plazmitlerinin Oluşturulması

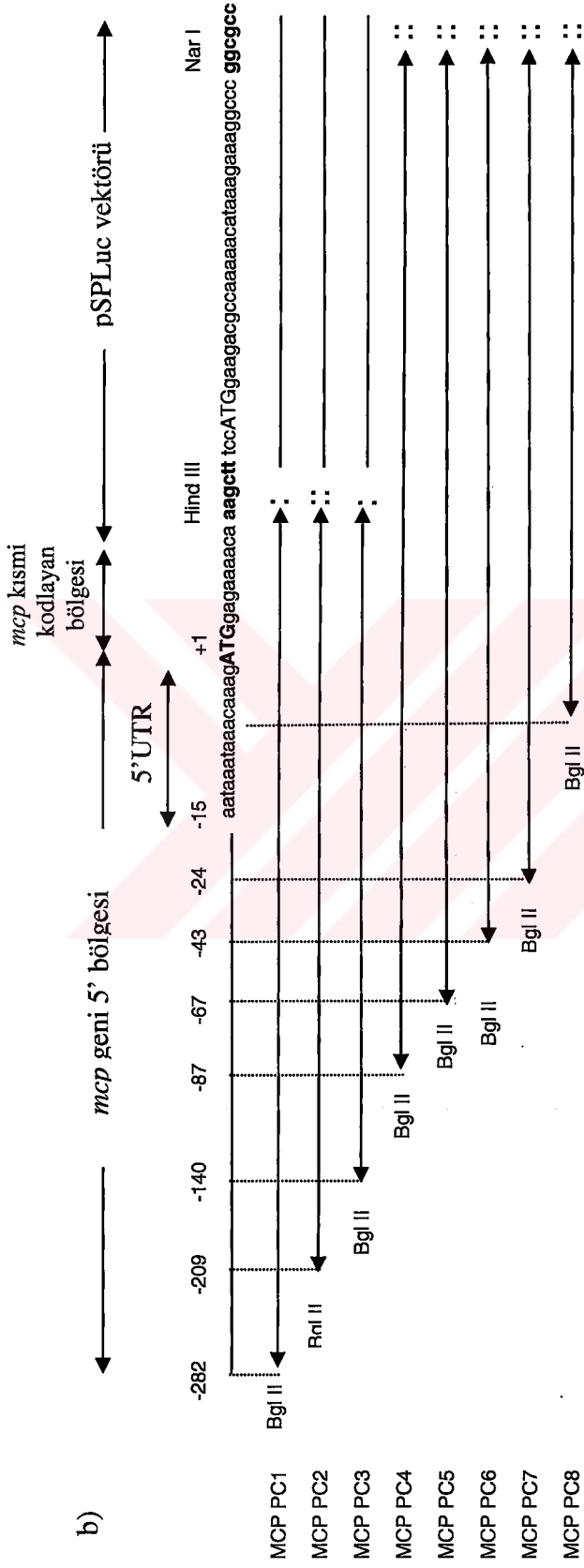
*dnapol* ve *mcp* genlerinin transkripsiyon başlangıç noktalarının tespit edilmesinin ardından bu iki genin promotor dizilerinin içinde bulunabileceğini düşündüğümüz ve genlerin transkripsiyon başlangıç noktalarına farklı uzaklıklardaki DNA fragmentleri belirlendi. *dnapol* geni için 7, *mcp* geni için ise 8 farklı, promotor dizilerini ihtiva etmesi mümkün DNA fragmenti tayin edildi (Şekil 10 a, b).

*dnapol* için belirlenen ilk üç fragmentin 5' uçları, translasyon başlangıç noktası +1 olarak kabul edildiğinde, sırası ile -282, -170 ve -121 noktalarından başlarken, *mcp* için belirlenen ilk üç fragmentin 5' uçları ise sırası ile -282, -209 ve -140 noktalarından başlamaktadır. Bu fragmentleri çoğaltmak için tasarlanan primerlerin 5' uçlarına *Bgl* II restriksiyon endonükleaz bölgesi eklendi. Fragmentlerin 3' uçları ise *dnapol* için +12, *mcp* için ise +15 noktalarından başlatıldı ve uçlarına da *Hind* III restriksiyon endonükleaz bölgesi eklendi.

Belirlenen DNA fragmentleri, PCR' da (94 °C'de 2 dk'lık ilk denaturasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C'de 1 dakika, 45 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1 dk) viral DNA'dan, özel primerler kullanılarak çoğaltıldı. Çoğaltılan fragmentler *Bgl* II ve



Şekil 10. *dnapol* ve *mcp* genlerinin lusiferaz işaret geni önüne klonlanacak promotor bölgelerinin gösterimi. a) *dnapol*, b) *mcp*. Uzunlukları gittikçe azalmakta olan DNA Fragmentleri, pSP-Luc+ vektörüne klonlandı.



Şekil 10'un devamı.



*Hind* III enzimleri ile muamele edilerek aynı enzimler ile muamele edilmiş pSP-Luc+ vektöründe (Promega) promotoru bulunmayan lusiferaz geninin önüne daha önce belirtildiği şekilde klonlandı. pSP-Luc+ vektörü kuzey amerikan ateş böceği *Photinus pyralis*'e ait lusiferaz geninin, promotorsuz olarak klonlandığı bir plazmittir. Böylece *dnapol* için DNAPol PC1, DNAPol PC2 ve DNAPol PC3, *mcp* için de MCP PC1, MCP PC2 ve MCP PC3 rekombinant plazmitleri oluşturuldu. Bu plazmitlerde lusiferaz geninin ekspresyonu, baş kısmına klonlanan ve promotör dizilerini ihtiva ettiği düşünülen DNA fragmentleri tarafından kontrol edildi.

*dnapol* için kalan diğer dört (-78, -62, -41 ve -13 konumlu 5' başlangıç noktalarına sahip fragmentler) ve *mcp* içinde diğer beş (-87, -67, -43, -24 ve -6 konumlu 5' başlangıç noktalarına sahip fragmentler) adet promotör bölgesini ihtiva etmesi mümkün fragmentlerde ise fragmentin büyüklüğü gittikçe azaldığı için bunların jelden temizlenmeleri ve klonlanmaları zor olacağından küçük olan fragmentler, viral DNA'dan değil de oluşturulan rekombinant plazmitlerden birincilerini kalıp olarak kullanarak yukarıdaki PCR programına göre bu plazmitlerden çoğaltıldı. Buradaki amaç küçük olan fragmentlere pSP-Luc+ vektörü tarafından bir miktar uzunluk kazandırarak, bu fragmentler ile çalışmayı kolaylaştırmaktı. Sentezlenen bu fragmentlerin de 5' uçlarına PCR ile *Bgl* II, 3' uçlarına ise *Nar* I restriksiyon endonükleaz bölgeleri eklendi. pSP-Luc+ vektörü de aynı restriksiyon endonükleazlar ile muamele edildi. Böylece, aynı enzim bölgelerine sahip DNA fragmenti ve plazmit DNA bir araya getirilerek birleştirildi ve neticede rekombinant pSP-Luc+ vektörleri elde edildi. Promotör plazmitlerinin oluşturulması için kullanılan primerler Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Promotor plazmitlerini oluşturmak için kullanılan primerler<sup>a</sup>

Primer Adı	Sırası (5' - 3')	Pozisyon
<i>DNAPOL</i> Luc F1	GGA GAT CTC GTG AAG GCA AAT GAT GA	-282/-265
<i>DNAPOL</i> Luc F2	GGA GAT CTC AAC TTG ACA ATG ATA TTT AC	-170/-150
<i>DNAPOL</i> Luc F3	GGA GAT CTG GGA GTT AAA TAG AGA CAA TTG	-121/-100
<i>DNAPOL</i> Luc F4	GGA GAT CTG TGG TTT TAA AAT ACA GCC	-78/-60
<i>DNAPOL</i> Luc F5	GGA GAT CTG CCA TAA AAA ATT GAT TAT TTG	-62/-41
<i>DNAPOL</i> Luc F6	GGA GAT CTG TTT TCG AAG AGA TTT AAA AAA	-41/-20
<i>DNAPOL</i> Luc F7	GGA GAT CTG TAC ATT ATA AAA TGG AGA AAA C	13/+11
<i>DNAPOL</i> Luc R	GGA <u>AGC TTT</u> GTT TTC TCC ATT TTA TAA TG	+12/-10
<i>MCP</i> Luc F1	GGA GAT CTC AAT ACA TAA CAA TCT TTC AT	-282/-262
<i>MCP</i> Luc F2	GGA GAT CTG TCT AGA CTT AAA ATG TC	-209/-192
<i>MCP</i> Luc F3	GGA GAT CTG AAC TCT CGC GAT CGT AAC	-140/-122
<i>MCP</i> Luc F4	GGA GAT CTG AAG ACAT GAA AAT TTA AAA GC	-87/-66
<i>MCP</i> Luc F5	GGA GAT CTG CAT TTA AAA ATA GTA ATC TG	-67/-47
<i>MCP</i> Luc F6	GGA GAT CTG TAT TCA AAT TTA AAT CTT GGC	-43/-22
<i>MCP</i> Luc F7	GGA GAT CTG GCA ATG TAA TAA ATA AAC AAA G	-24/-2
<i>MCP</i> Luc F8	GGA GAT CTC AAA GAT GTC TAT TTC TTC G	6/+15
<i>MCP</i> Luc R	GGA <u>AGC TTC</u> GAA GAA ATA GAC ATC TTT G	+15/+6
Luc <i>Nar</i> I R	GGA ATG GCG CCG GGC CTT TCT TTA TG	85/62

<sup>a</sup> Koyu yazılan *Bgl* II ve altı çizili olan *Hind* III enzim bölgeleri *dnapol* ve *mcp* primerlerine, pSP-Luc+ vektörüne klonlamayı kolaylaştırmak için eklenmiştir. *Nar*I primeri de pSP-Luc+ vektörünün 3' bölgesindeki *Nar* I bölgesi ile birleşmiştir.

### 2.6.2. *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Hücrelerinin Rekombinant Plazmitler ile Transfeksiyonu

Deney 35 mm'lik hücre kültür kaplarında gerçekleştirildi. Bm hücreleri bir gece önceden hücre kültür kaplarına her kapta  $1,5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde transfer edildi. Hücrelerin 2 saatlik tabana yapışma periyodunun ardından, üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine FBS ve katkı maddeleri ihtiva etmeyen besiyeri konuldu. Ertesi gün hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve yerine daha önceden hazırlanmış olan rekombinant promotor plazmiti (2 µg), cellfectin (10 µl) (Invitrogen, 10362-010) ve katkı maddeleri ihtiva etmeyen besiyeri (500 µl) karışımı bırakılarak plazmitin hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirildi. Bu sırada pipetlemeden veya ortam şartlarının olumsuzluğundan kaynaklanabilecek hataları ortadan kaldırmak amacı ile, hücrelere aynı anda her

rekombinant promotor plazmidinin yanında birde kontrol plazmidi olan pIC-IE1 (2 $\mu$ g)'in transfeksiyonu yapıldı. pIC-IE1 plazmidi *Renilla reniformis* organizması tarafından kodlanan lusiferaz geninin promotorsuz olarak klonlandığı pRL-null (Promega) plazmidinden oluşturulmuştur. Dr. Van Hulten (Wageningen University, Wageningen, The Netherland) pRL-Null plazmidinde lusiferaz geninin önüne AcMNPV'ye ait en erken grubu bir gen olan IE1 geninin promotorunu yerleştirmiş ve elde ettiği rekombinant plazmide pIC-IE1 adını vermiştir. 18 saatlik bir transfeksiyon periyodundan sonra hücreler *Chilo iridescent* virüs ile enfekte edildi. Bu işlemler her rekombinant plazmit için (*dnapol* için 7, *mcp* için 8) ayrı ayrı petrielerde kontrol plazmidi ile birlikte gerçekleştirildi.

### 2.6.3. Lusiferaz Proteinlerinin İzolasyonu ve Luminometrede Ölçülmesi

*dnapol*'e ait rekombinant plazmitlerin aktarıldığı hücreler enfeksiyondan 6 saat sonra, *mcp*' ye ait olanları için de 24 saat sonra petrielerden alındı. Hücrelerden lusiferaz proteininin izolasyonu lusiferaz kitinin (Promega, Kat no: E1910) içerisinde bulunan kullanma yöntemine göre gerçekleştirildi. Buna göre her gen için belirtilen inkübasyon zamanlarının sonunda, hücreler cam deney tüplerine transfer edilip 300 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelte halindeki hücrelerin üzerine 2 ml PBS ilave edilerek hücreler yıkandı ve tekrar santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Pelte 250  $\mu$ l 1 $\times$ parçalama tamponunda (kitte mevcut) çözüldü ve buz üzerine yerleştirildi. 10-15 sn vortekslenildi ve hücrelerin tamamen parçalanmasını sağlamak için 2 kez sıvı azota daldırılıp çıkarıldı. 12.000 $\times$ rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra proteini ihtiva eden süpernatant kısmı temiz tüplere alındı.

Promotor plazmitleri ve kontrol plazmiti tarafından ekspresyonu gerçekleştirilen lusiferaz proteinlerinin ölçümü luminometrede gerçekleştirildi. Ölçme işlemleri luminometre cihazına ait özel tüplerde yapıldı. Bir tüpe 20  $\mu$ l protein örneklerinden ve 100  $\mu$ l'de kit içinde bulunan "Luciferase Assay Reagent" den bırakıldı. Karışım luminometre cihazındaki özel bölgeye yerleştirildi ve cihazın numunedeki ateşböceği ve "renilla" lusiferaz protein değerlerini okuması sağlandı. İki değer birbirine oranlanarak ekspresyon değeri elde edildi.

#### **2.6.4. PCR'a Bağlı Nokta Mutasyon ile Promotor Bölgesinin Test Edilmesi**

*dnapol* geninin 5' bölgesinde bulunan TTGTTTT motifinin promotor dizisi olup olmadığını tespit edebilmek için bu motifin yapısında mutasyon yapıldı. Mutasyon iki basamaklı PCR metodu (Landt vd., 1990) kullanılarak G bazının C'ye değiştirilmesi ile gerçekleştirildi. Mutasyon, lusiferaz deneyi için oluşturulan en uzun fragmente sahip promotor plazmidi (DPOL PC1) üzerinde yapıldı.

#### **2.6.5. Promotor Bölge Motiflerinin Belirlenmesi için CIV Genomunun Bilgisayar Analizi**

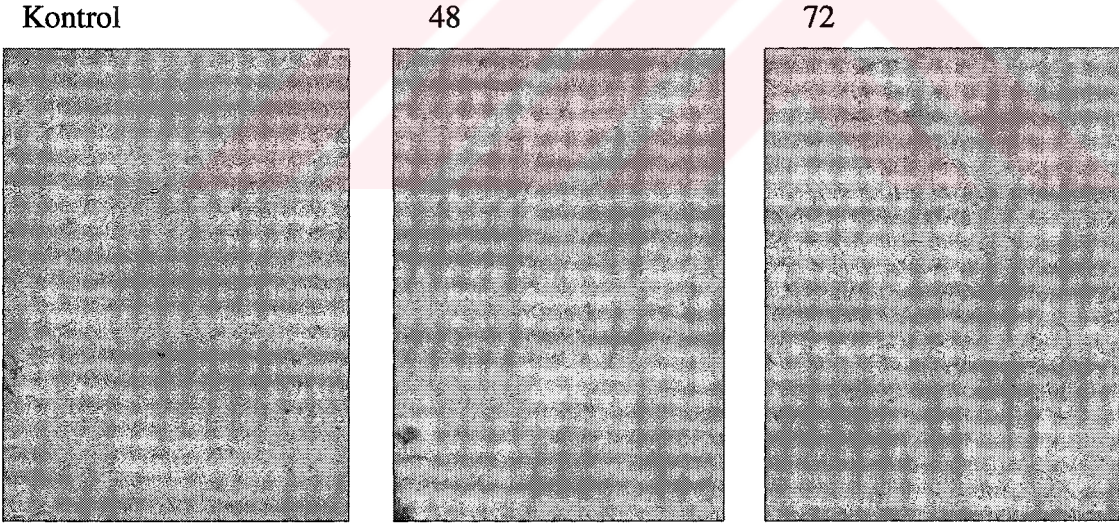
CIV genomunda bulunan tüm genlerin kodlayan bölgelerinin 80 ve 100 nükleotidlik yukarı bölgeleri, en sık ihtiva ettikleri 4 ve 6 nükleotidlik motifler bakımından Marks ve arkadaşlarının (2003) geliştirdikleri bilgisayar programına göre analiz edildi. Analiz yapılırken CIV genomunda bulunan tekrar elementleri göz ardı edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Chilo* İridescent Virüs'ün (CIV) *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründe Replikasyonu

##### 3.1.1. CIV'nin *Bombyx mori* Hücrelerindeki Replikasyonunun Işık Mikroskobu ile Tespiti

CIV'nin *Bombyx mori* hücrelerindeki enfektivitesini belirlemek amacıyla yapılan deneyde, enfeksiyonu takip eden 48. saatte hücrelerde şişmeler görüldü. 72 saat sonra ise virüs ile enfekte olmuş hücrelerin kontrollere göre 2-3 kat daha büyük oldukları belirlendi. Ayrıca sitoplazmalarında vesikül benzeri yapılar tespit edildi. *Bombyx mori* hücrelerinde kontrolden farklı olarak gözlenen bu değişiklikler, CIV'nin bu hücrelerde enfeksiyon oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 11).

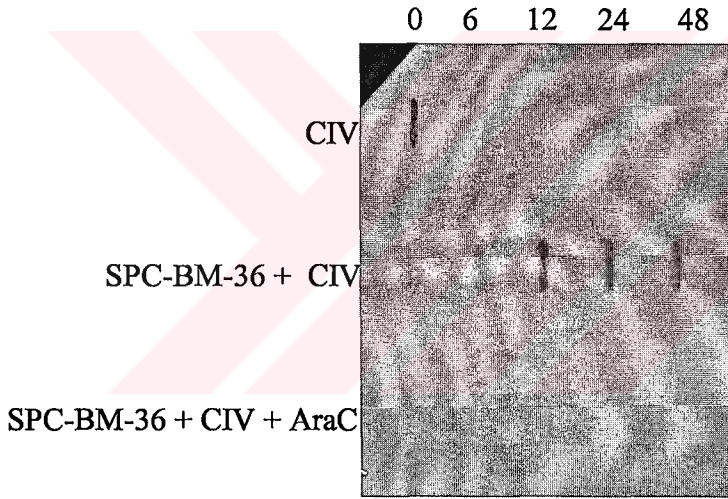


Şekil 11. *Chilo* iridescent virüs'ün (CIV) *Bombyx mori* hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etkiler. Kontrol: Enfekte olmamış SPC-BM-36 hücreleri. Numaralar enfeksiyondan sonra geçen süreyi saat olarak göstermektedir. Büyütme: 200×



### 3.1.2. CIV'nin *Bombyx mori* Hücrelerindeki Replikasyonunun Slot-Blot Hibridizasyonu ile Tespiti

CIV'nin *Bombyx mori* hücrelerindeki enfeksiyonunu moleküler olarak tespit etmek amacı ile yapılan Slot-Blot hibridizasyonu deneyi sonucunda CIV DNA replikasyonunun DNA inhibitörünün var olduğu ortamda (SPC-BM-36 + CIV + Ara-C) gerçekleşmediği, inhibitör kullanılmayan ortamda (SPC-BM-36 + CIV) ise virüs DNA replikasyonunun gerçekleştiği tespit edildi. CIV ile enfekte olmuş Bm hücrelerinde DNA replikasyonunun enfeksiyondan sonra 6. saatte başladığı, 12. saatte replikasyon oranının maksimum seviyeye ulaştığı, 24. ve 48. saate kadar replikasyonun bu seviyede devam ettiği belirlendi (Şekil 12).



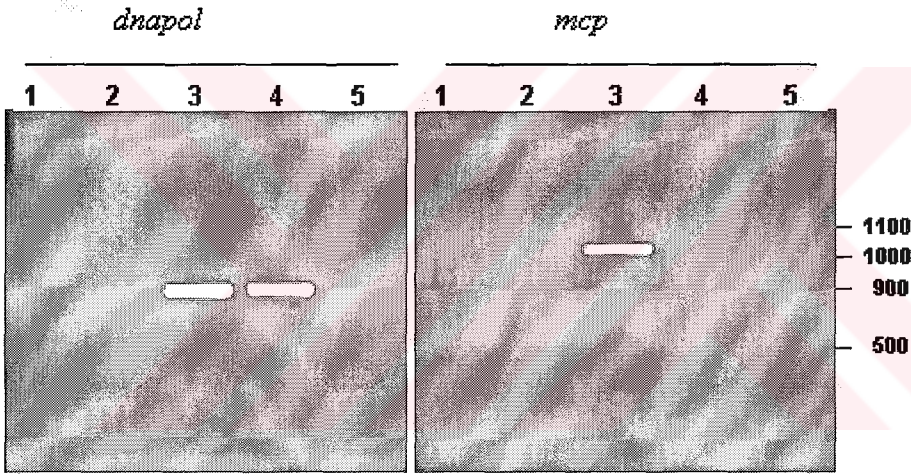
Şekil12. *Chilo iridescent virüs* (CIV) DNA'sının *Bombyx mori* (Bm) böcek hücre kültüründeki replikasyonunu gösteren slot-blot hibridizasyonu. Saatler hücre lizatlarının hazırlandığı enfeksiyonu takip eden zamanları göstermektedir



### 3.1.3. CIV'nin *Bombyx mori* Hücrelerindeki Replikasyonunun Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Tespiti ve Genlerin Transkripsiyon Sınıflarının Belirlenmesi

CIV'nin *Bombyx mori* hücrelerindeki replikasyonunu transkripsiyonal olarak belirlemek, ayrıca *dnapol* ve *mcp* genlerinin hangi temporal sınıfa ait olduklarını tespit etmek amacıyla yapılan RT-PCR deneyinde elde edilen verilere göre hem *dnapol* hemde *mcp* genlerinin *Bombyx mori* hücrelerinde transkripsiyon yapıldıkları belirlendi (Şekil 13).

DNA sentezi inhibitörü ara-C ve protein sentezi inhibitörü siklohekzimit kullanılarak yapılan deneyde, *dnapol* transkripti ara-C inhibitörünün kullanıldığı ortamda tespit edilirken siklohekzimitin kullanıldığı ortamda tespit edilememiştir. *mcp* transkripti ise sadece inhibitörün kullanılmadığı ortamda tespit edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. *dnapol* ve *mcp* transkriptlerinin RT-PCR analizi. 1) CIV ile enfekte olmuş *Bombyx mori* hücrelerinden izole edilen total RNA'nın özel primerler kullanılarak yapılmış PCR analizi. 2) 0. saatte, 3) 24. saatte, 4) 24. saatte Ara-C mevcudiyetinde, 5) 24. saatte siklohekzimit mevcudiyetinde CIV ile enfekte olmuş *Bombyx mori* hücrelerinden izole edilen total RNA'nın spesifik primerler kullanılarak yapılmış RT-PCR analizi

Bu sonuç, *dnapol*'ün transkripsiyonunun DNA sentezine ihtiyaç duymadığını fakat protein sentezine ihtiyaç duyduğunu dolayısı ile *dnapol*'ün erken gruba ait bir gen olduğunu göstermektedir. *mcp* transkriptinin ise inhibitör kullanılan ortamlarda tespit edilememesi, bu genin transkripsiyonunun virüs tarafından daha önce sentezlenmiş proteinlere ihtiyaç duyduğunu dolayısı ile genin geç gruba sınıfa ait bir gen olduğu söylenebilir.

### **3.2. *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Hücrelerinde Üretilen Yeni CIV ile Bu Hücrelerin Yeniden Enfeksiyonu**

*Bombyx mori* hücrelerinin CIV için yeterince verimli bir konak olup olmadığını tespit edebilmek için bu hücrelerde üretilen CIV ile yapılan ikinci enfeksiyon deneyinde CIV'nin yeterince üretilmediği tespit edildi.

### **3.3. Genlerin Translasyona Uğramayan 5' Bölgelerinin Transkripsiyonal Analizi**

#### **3.3.1. cDNA'nın 5' Uçlarının Hızlı Çoğaltılması (5'-RACE)**

*dnapol* ve *mcp* genlerinin transkripsiyon başlangıç noktalarını bulabilmek için 5'-RACE analizi gerçekleştirildi. Böylece her iki genin mRNA'sındaki proteine dönüşmeyen kısımlarının baz dizisi tespit edildi. *dnapol* için elde edilen klonların dizin analizi sonuçları bu genin transkripsiyon başlangıç noktasının, translasyon başlangıç noktası +1 olarak alındığında, -35. pozisyondaki C bazı veya bu bazın yanındaki 3 adet T'den biri olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde *mcp* içinde transkripsiyon başlangıç noktası -15. pozisyondaki A bazı veya bunun yanındaki T olduğu görülmektedir (Şekil 14).



### 3.3.2. Genlerin Promotor Bölgelerinin Analizi

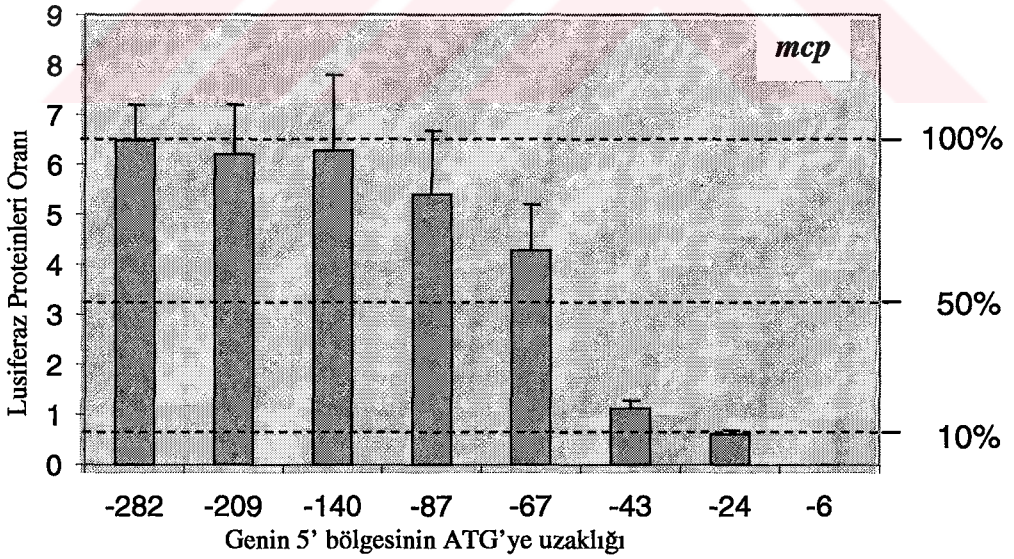
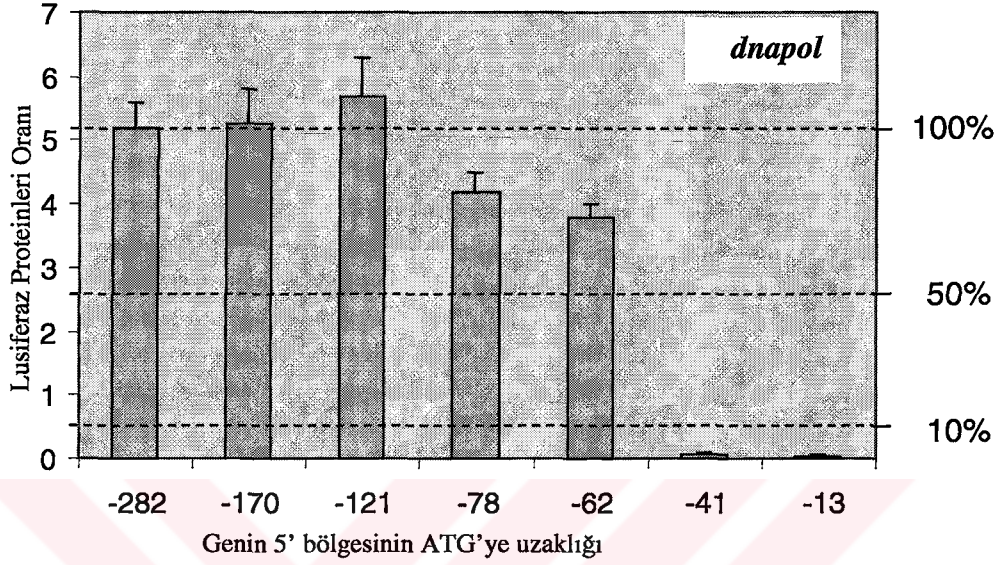
*dnapol* ve *mcp* genlerinin transkripsiyonal aktivasyonundan sorumlu DNA sıralarını tayin edebilmek için ikili lusiferaz deneyi yapıldı. Bu deney lusiferaz proteininin kullanıldığı bir çeşit işaret sistemidir. Burada kullanılan “ikili” kelimesi iki farklı lusiferaz geninin ürünlerinin tek bir sistem tarafından aynı anda ekspresyonu ve ölçülmesi anlamına gelmektedir. İkili lusiferaz işaret sistemi şu şekilde özetlenebilir; sistemde iki farklı plazmit mevcuttur. Bunlardan bir tanesi Kuzey Amerikan ateş böceği *Photinus pyralis*'e ait ateşböceği lusiferaz geninin promotorsuz olarak klonlandığı pSP-Luc+ plazmiti (Promega), diğeri ise bir mercan türü olan *Renilla reniformis* organizması tarafından kodlanan renilla lusiferaz geninin ekspres edildiği pIC-IE1 plazmitidir. pIC-IE1 plazmiti Mariella van Hulsten (Wageningen University, Laboratory of Virology) tarafından pRL-null (Promega) plazmitinden oluşturulmuştur. Dr. Van Hulsten pRL-Null plazmitinde promotorsuz olarak klonlanmış olan renilla lusiferaz geninin önüne AcMNPV'ye ait en erken grubu bir gen olan IE1 geninin promotörünü yerleştirmiş ve elde ettiği plazmite pIC-IE1 adını vermiştir.

5'-RACE analizi sonuçlarına göre -35. bazda transkripsiyon başlangıç noktası tespit edilen *dnapol* için 282 ile 41 nükleotid uzunlukları arasında değişen promotör fragmentlerine sahip 7 farklı rekombinant plazmit test edildi. Lusiferaz aktivitesi 282 ve 121 nükleotid uzunluklardaki DNA fragmentlerine sahip plazmitler arasında belirgin olarak değişmezken 78 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmanına sahip plazmitte %70-80 oranlarına düştü ve 62 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmitde de yaklaşık bu seviyede seyir etti. 41 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmitte ise aktivite 5'-UTR bölgesinin içindeki bir noktadan (13. nükleotid) başlayarak düzenlenmiş ve negatif kontrol olarak düzenlenmiş rekombinant plazmitinin aktivitesi gibi hemen hemen sıfır olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlara göre; *dnapol*'ün promotör bölgesinin önemli bir kısmının -62 ile -41 arasında ve aktiviteyi artırıcı bazı bölgelerin de -121 ile -78 arasında olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 15).

*mcp* içinde, 282 ve 24 nükleotid uzunlukları arasında değişen DNA fragmentlerinin klonlandığı 8 farklı rekombinant plazmit test edildi. Lusiferaz aktivitesi 282, 209, 140 ve 87 nükleotidlik uzunluklardaki DNA fragmentlerinin klonlandığı plazmitler arasında çok büyük bir değişiklik göstermedi. 43 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentinin klonlandığı rekombinant plazmitde ise aktivitede belirgin bir düşüş tespit edildi ve bu düşüş bir sonraki rekombinant plazmitin aktivitesinde de devam etti. Bu sonuçlara göre;



*mcp*'nin promotor bölgesinin önemli bir kısmının -67 ve -43 noktaları arasında olması gerektiği söylenebilir (Şekil 15).



Şekil 15. *dnapol* ve *mcp* genlerinin promotor analizleri. *Bombyx mori* hücreleri CIV mevcudiyetinde *dnapol* ve *mcp* ye ait promotor plazmitleri ile transfeksiyon yapıldı. Firefly lusiferaz aktiviteleri renilla lusiferaz aktivitesi ile orantılı olarak hesap edildi

### 3.4. Mutasyon Analizi

D'Costa ve arkadaşları (2001) tarafından en erken genler olarak tespit edilen RNA polimeraz ve helikaz genlerinin ve bu çalışmada erken olarak tespit edilen DNA polimeraz geninin 5' bölgelerinde ortak bir baz dizisi olan TTGTTTT sırası dikkati çekti. Bu sıranın promotor olup olmayacağını anlayabilmek için iki basamaklı PCR yöntemi ile buradaki G bazı C olarak değiştirildi. Değişiklik en uzun fragmente sahip rekombinant plazmit (*DNAPOL PC1*) üzerinde yapıldı. Bu plazmitteki G bazı C olarak değiştirildi ve transfeksiyon yapılarak lusiferaz proteininin ekspresyon miktarına bakıldı. Elde edilen sonuç mutasyon yapılmamış plazmitin (*DNAPOL PC1*) ekspresyon gücü ile karşılaştırıldığında lusiferaz aktivitesinde % 25 düşüş olduğu tespit edildi. Bu sonuca göre TTGTTTT motifinin promotorun bir parçası olduğu fakat aktivitesinde çok önemli bir kısmı olmadığı kanaatine varıldı.

### 3.5. Promotor Bölgelerinin Bilgisayar Analizi

CIV genomunu oluşturan genlerin kodlayan bölgelerinin yukarı kısımlarında bulunan 80 ve 100 nükleotid uzunluğuna kadar olan bazlar, en sık ihtiva ettikleri 4 ve 6 nükleotidlik motifler bakımından analiz edildi. Analiz sonucunda özellikle 4 nükleotidli motiflerden TAAA ve ATAA'nın genlerin kodlayan bölgelerinin yukarı kısımlarında tüm genoma oranla 2 kat daha fazla bulunduğu görüldü (Tablo 5). TAAA motifi *dnapol* geninde 70. ile 60. ve 60. ile 40. nükleotidler arasında iki kez tespit edildi (Şekil 12). Ayrıca 60. ve 40. nükleotidler arasında ATAAA motifine de rastlandı. Bu bölgelerin silinmesi promotor aktivitesinde belirgin bir düşüş meydana getirdi (Şekil 4). Aynı zamanda geç gen olan *mcp* geninde de TAAA motifine rastlandı. Yine bir başka erken gen olan *helikaz* geninde de TAAA motifine tekrarlar halinde rastlamak mümkündür. Ancak bunlar ile ilgili bir sonuca varmak için yeterli veri elimizde bulunmamaktadır. Ayrıca yine bu çalışmanın sonucuna göre *dnapol*'ü en erken ve *mcp*'yide geç grubu yapan faktörün ne olduğu anlaşılamamıştır.



Tablo 5. CIV genlerinin kodlayan kısımlarının 5' bölgelerinin 80 nükleotid yukarı bölgelerinde, 4 nükleotidli motiflerin tüm genomla göre bulunma sıklığı

4-bazlı motif	Genomda bulunma	Promotorda bulunma	Promotor bölgesindeki nisbi oran
taaa	7280	650	2.1
ataa	5120	437	2.0
aata	5438	408	1.8
ttaa	6960	519	1.8
taag	1247	86	1.6
aaat	7966	548	1.6

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada CIV'nin, şimdiye kadar replikasyonunun tespit edilmediği *Bombyx mori* (Bm) böcek hücre kültüründe replike olduğu ışık mikroskobu çalışmaları, slot-blot hibridizasyonu ve revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleri ile tespit edildi. Aynı zamanda RT-PCR yöntemi ile *dnapol* ve *mcp* genlerinin ekspresyon sınıflarının neler oldukları belirlendi. Ayrıca *dnapol* ve *mcp* genlerinin 5' translasyona uğramayan bölgeleri 5'-RACE deneyi ile ve promotorlarının bulunabileceği muhtemel baz aralıkları lusiferaz deneyi ile belirlendi. Böylece bu çalışma aynı zamanda böcek iridovirüslerine ait promotor bölgelerinin araştırılması ile ilgili yapılan ilk çalışmadır.

CIV, orijinal olarak pirinç kök delici kurdu, *Chilo suppressalis*'den (Lepidoptera; Pyralidae) Japonya'da izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu, 1966). Böcekler sınıfı içerisinde konak spektrumu incelenmiş ve altı ordoya (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera) ait 100'den fazla böcek türünün CIV'ye duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; Fukuda, 1971; McLaughlin ve ark., 1972). Ayrıca CIV'nin replike olduğu çok sayıda böcek hücre suşu bilinmektedir (Constantino vd., 2001). Özellikle CF-124T hücre suşu CIV replikasyonunun ilk olarak tespit edildiği suştur. Ne varki CIV ile ilgili yapılan çalışmalarda çoğunlukla larvadan elde edilen virüs kullanılmaktadır. Larvadan elde edilen virüs hücre kültüründe kolaylıkla replike olabilmekte ve çok sayıda yavru virüs oluşturmaktadır (Devauchelle vd., 1985). Ancak hücre kültüründen elde edilen CIV ile yapılan çalışmalar çok sınırlıdır (Ohba ve Aizawa, 1978). Çünkü hücre kültüründe bir kez pasajlanan CIV, inokülüm olarak kullanıldığında çok düşük sayıda virüs oluşturmaktadır.

Bu çalışmada CIV'nin replikasyonunun şimdiye kadar tespit edilmediği *Bombyx mori* (SPC-BM-36) hücrelerinde gerçekleştiği belirlendi. CIV için yeni bir konak olarak tespit edilen *Bombyx mori* hücreleri literatüre yeni bir kayıt olarak geçecektir. Böylece *B. mori* hücrelerinin CIV için duyarlı oldukları tespit edilmiş oldu. Fakat *B. mori* hücrelerinde üretilen yeni CIV ile sağlıklı hücreler yeniden enfekte edilince enfeksiyon çok yavaş gelişti. Bu sonuç *B. mori* hücrelerinin, CIV'nin replikasyonunun tespit edildiği diğer hücreler gibi virüsün çoğaltılması için kullanılacak yeterince verimli bir konak olmadığını göstermektedir.

SPC-BM-36 hücreleri CIV'nin replike olabildiği yeni bir konak olarak tespit edildikten sonra tez çalışması *dnapol* ve *mcp* genleri üzerinde sürdürüldü.

CIV'de genlerin transkripsiyonu üç aşamada gerçekleşmektedir. Transkript olan genler en erken, erken ve geç şeklinde sınıflandırılır. Daha önceden yapılmış çalışmalara göre *mcp*'nin geç grubu bir gen olduğu bilinmemektedir (D'Costa vd., 2001). Çalışmadaki diğer bir gen olan *dnapol*'ün hangi sınıfa ait olduğunu tespit etmek amacıyla inhibitörler kullanılarak enfekte edilmiş SPC-BM-36 hücrelerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak RT-PCR analizi yapıldı. Protein sentezini inhibe etmek için 200 µg/ml konsantrasyonunda sikloheksimit kullanıldı (Liu ve Bilimoria, 1997; Ross ve Guarino, 1997). DNA sentezini inhibe etmek için 100 µg/ml konsantrasyonunda Ara-C kullanıldı (D'Costa vd., 2001). *dnapol* transkriptinin, DNA sentezi inhibitörü Ara-C mevcudiyetinde tespit edilmesi, protein sentezi inhibitörü varlığında ise tespit edilememesi, bu genin, transkripsiyonu için DNA sentezine ihtiyaç duymadığını fakat protein sentezine ihtiyaç duyduğunu, dolayısı ile erken grubu bir gen olduğunu göstermektedir. *mcp* transkriptinin de sadece inhibitörsüz ortamda tespit edilmiş olması hem DNA hem de protein sentezine ihtiyaç duyduğunu dolayısı ile D'Costa ve arkadaşları (2001) tarafından daha önce belirtilen sonucu destekleyici şekilde geç grubu gen olduğunu göstermiştir. D'costa ve arkadaşları tarafından yayınlanan bu çalışmada *mcp*'nin yanında *helikaz* ve *rnapol* genlerinin transkripsiyonları da incelenmiş ve *helikaz* ve *rnapol*'ün en erken grubu genler oldukları gösterilmiştir.

RT-PCR sonuçlarına dayanarak *dnapol* ve *mcp* genlerinin promotor bölgeleri ayrıntılı olarak incelendi. 5'-RACE analizi sonucunda *dnapol*'ün transkripsiyon başlangıç noktasının, translasyon başlangıç noktası +1 olarak alındığında, -35. pozisyonda ki C bazı veya bu bazın yanındaki 3 adet T'den biri olduğu belirlendi. Aynı şekilde *mcp* içinde transkripsiyon başlangıç noktası -15. pozisyonda ki A bazı veya bunun yanındaki T olduğu tespit edildi. 5'-RACE analizi sırasında tek zincir cDNA'ya dA kuyruğu takıldığı için bu T'lerin kuyruk dolayısı ile karşılık gelen T'lerden mi yada genin yapısındaki T'lerden mi geldiğini kesin olarak söylemek mümkün değildir.

Lusiferaz deneyinde, CIV promotor plazmitleri hem *dnapol* ve hem de *mcp* için, sadece CIV virüs partiküllerinin mevcudiyetinde aktif olabildi. Kloramfenikol asetil transferaz (CAT) deneyiyle Frog virüs 3 (FV3, Ranavirüs) ICR-169 geninin promotor aktivitesinin incelenmesi sırasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Willis ve Granoff, 1985). CAT sentezi hücreler transfeksiyondan sonra FV3 ile enfekte edilince görülebilmektedir. Ayıntılı çalışmalar FV3 geninin aktivasyonu için viral DNA'nın yeterli

olmadığını, virüs partikülünün gerekli olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışma ile CIV içinde aktivasyonun bu şekilde olduğu gösterilmiştir. Şöyleki, saflaştırılmış viral DNA'nın UV ile muamele edilmiş virüs partikülü ile birleştirilmedikçe enfeksiyon oluşturmadığı belirlenmiştir (Cerutti vd., 1989). Ancak erken genlerin aktivasyonunu sağlayan virüse ait yapının ne olduğu henüz bilinmemektedir.

Erken genlerin transkripsiyonu için virüs partikülündeki bir bileşene ihtiyaç duyulması iridovirüslerde olduğu gibi poxvirüslerde ve asfarvirüslerde de görülmektedir. Vaccinia virüslerde örneğin RAP94 polipeptidi erken transkripsiyon için gereklidir. RAP94 geç bir gen dir ve virüs bağımlı erken bir transkripsiyon faktörü fonksiyonu görebilir (Ahn vd., 1994). Ayrıca yine vaccinia virüslerde, enfeksiyonun geç safhasında sentezlenip erken promotora ve viral RNA polimeraza bağlanan VETF'ye, erken genlerinin transkripsiyonu için ihtiyaç vardır (Moss, 1996). CIV'de benzer bir fonksiyon, omurgalı iridovirüsü Lymphocystis disease virüs (LCDV-1, Lymphocystis virüs genusu)'ün erken transkripsiyon faktörü ile homolog olan ORF 022L geni tarafından yapılabilir (Jakob vd., 2001).

FV3 transkripsiyonun başlaması için konak nukleusuna ve dolayısı ile de konak RNA polimeraz ilişkisine ihtiyaç duyarken (Goorha vd., 1977; Gorrha vd., 1978) poxvirüsler ve asfarvirüsler erken genlerin sitoplazmadaki transkripsiyonu için virionda mevcut olan viral RNA polimerazı kullanır (Baroudy ve Moss, 1980). African Swine Fever virüsde (ASFV) Poxvirüsler ve Asfarvirüsler gibidir. Ancak ASFV'ün replikasyonu için fonksiyonel bir nukleusa ihtiyaç duyulur (Garcia-Beato vd., 1992). CIV ve LCVD-1'de enfeksiyonun geç safhalarında sitoplazmik transkripsiyonda rol oynayabilecek RNA polimeraz alt ünitesi homologları mevcuttur (Tidona ve Darai, 1997; Jakob vd., 2001).

Poxvirüs ve Asfarvirüs mRNA'larının aksine çoğu iridovirüs mRNA'larında poliadenilleşme yoktur. Poliadenilleşmeye sadece *Tipula* iridescent virüs (TIV)'ün iki transkriptinde ve LCDV-1'in bazı genlerinde rastlanılmıştır (Williams, 1998). Nitekim bu çalışmada da CIV'ye ait *dnapol* ve *mcp* transkriptlerinin oligo dT primerler kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonuç vermedi (veriler gösterilmedi).

Şimdiye kadar sadece FV3'e ait iki en erken gen üzerinde promotor çalışmaları yapılmıştır. Bu genler ICR 169 ve ICR 489 genleridir (Willis, 1987). ICR 489 geninin promotor bölgesinde klasik TATA, CAAT ve GC kutuları bulunmaktadır. ICR 169 geninin transkripsiyon başlangıç noktasının 29 bp yukarı kısmında TATA kutusuna benzer TATTTTA sırası tespit edilmiştir. Yapılan delesyon çalışmalarında bu sıranın tamamen

silinmesi genin ekspresyonunu ortadan kaldırmamış fakat promotör aktivitesinde %16'lık bir düşüş gözlenmiştir. Aktivitenin tamamen kaybolmaması şartıcı olabilir. Fakat TATA kutusunun silinmesi durumunda aktivitenin tamamen kaybolmadığını destekleyen başka çalışmalarda mevcuttur (Willis, 1987). Ayrıca bilinen TATA kutularından farklı olan TATA kutularının RNA polimeraz II'yi yerleştirme fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada tespit edilen TTGTTTT motifinin de benzer bir fonksiyona sahip olup olmadığını belirlemek için daha ayrıntılı çalışmalar yapmak gerekir. Fakat bu motifin pozisyonunun transkripsiyonun başlangıç noktasından hemen sonra olması benzer bir fonksiyonu yürüttüğü görüşünü kuvvetlendirmektedir. Sadece bir bazda mutasyon aktiviteyi tamamen düşürmeye yeterli olmayabilir. ICR 169 geninin 5' kısmında daha fazla delesyonlar yapılmış ve neticede TATTTTA sırasının yukarısında bulunan 14 bazlık (CAGGGGAATTGAAA) kısmın genin promotör bölgesi fonksiyonunda kilit rol oynadığı belirlenmiştir (Willis, 1987).

5'-RACE analizi ve lusiferaz deneylerinin sonuçları CIV'nin promotör bölgelerinde AT bakımından zengin motiflerin olduğunu gösteren bilgiler bilgisayar programı analizi ile desteklenmiştir. Bu analiz sonucunda CIV genomunda AT bakımından zengin motiflerin tespit edilmesine rağmen bu motiflerin promotör dizileri olup olmadığı konusunda bir sonuca varılamamaktadır. Aynı program Baculovirüs genomuna uygulandığında da erken motif CAGT ve geç motif TAAG kolaylıkla bulunmuştur (Marks vd., 2002). Ayrıca bu çalışma sonucunda *dnapol*'ü erken ve *mcp*'yi de geç gen yapan faktörün ne olduğu anlaşılamamıştır. Poxvirüs ve Asfarvirüs promotör motifleri de aynı zamanda AT bakımından zengindir (Moss, 1996; Rodriguez vd., 1996; Garcia-Escudero ve Vinuela, 2000). Erken Poxvirüs genlerinde transkripsiyon, Poxviridae familyası içinde korunmuş bir bölge olan (A)GTG(A)AAAA/TA'nın 12- 17 nükleotid aşağısında bulunan bir purin ile başlar (Moss, 1996). Vaccinia virüslerde geç promotörler (TAAA ve TAAAT) ATG'nin hemen yukarısında bulunur. Hatta ATG'nin üstünede gelmiş olabilmektedir. Poxvirüs transkriptleri 5' poli A kuyruğuna sahiptir (Moss, 1996) ancak CIV transkriptlerinde buna rastlanmamıştır.

Geç gen olan *mcp*'de promotör sırası Vaccinia virüslere göre translasyon başlangıç noktasının biraz daha yukarısında bulunmaktadır. Fakat yine de promotörün uzaması ihtimaline karşı promotör plazmitlerinin hazırlanması sırasında *dnapol* ve *mcp*'ye ait translasyon başlangıç kodonları ve bu kodonların önündeki birkaç nükleotid plazmitlere dahil edilmiştir.

Bu çalışmalar CIV *dnapol* ve *mcp* genlerinin 35 ve 15 nükleotidlik kısa 5' translasyona uğramayan bölgelere sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca promotor aktivitesi için önemli olan sıraların translasyon başlangıç noktaları +1 olarak alındığında –70. ve –40. pozisyonlar arasında olduğu görülmektedir. Promotor dizilerinin bulunduğu bu baz dizileri arasında AT bakımından zengin motifler bulunmaktadır. Sonuç olarak CIV'de erken ve geç promotorları daha ayrıntılı promotor çalışmalarlarıyla incelenmelidirler.



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda *Chilo iridescent* virüs'ün replikasyonunun şimdiye kadar tespit edilmediği yeni bir konak tespit edildi. Ayrıca CIV'ye ait DNA polimeraz (*dnapol*) ve major kapsid protein (*mcp*) genlerinin transkripsiyonlarının gerçekleştiği sınıflar, 5' uçlarındaki proteine dönüşmeyen sıralar ve bu iki genin promotorlarının bulunabileceği muhtemel baz aralıkları belirlendi.

CIV'nin *Bombyx mori* (SPC-BM-36) böcek hücrelerinde replike olduğu ışık mikroskobu ve slot-blot hibridizasyonu çalışmaları ile tespit edildi. Virüs enfeksiyonu sonucu SPC-BM-36 hücrelerinde irileşme ve vakuolleşmeler meydana geldi.

CIV'ye ait *dnapol* ve *mcp* genlerinin ait oldukları transkripsiyon sınıfları Revers-Transkripsiyon PCR analizi ile tespit edildi. Buna göre *dnapol*'ün erken, *mcp*'nin ise geç grubu genler oldukları belirlendi.

*dnapol* ve *mcp* genlerine ait özel primerler kullanılarak elde edilen cDNA'lar kullanılarak bu iki genin proteine dönüşmeyen sıraları tespit edildi. Sonuçta *dnapol* için 35 *mcp* için ise 16 baz uzunluğunda proteine dönüşmeyen baz dizileri belirlendi. Promotor bölgelerinin analizi çalışmalarında *dnapol*'ün promotor aktivitesinin -62. ile -41. nükleotidler arasında hemen hemen sıfırlandığı görüldü. Buna göre *dnapol*'ün promotor bölgesinin bu bazlar arasında olduğu söylenebilir. *mcp* için ise promotor aktivitesinde belirgin bir düşüş -67. ile -43. bazlar arasında gözlemlendi. Dolayısı ile *mcp*'nin promotor bölgesinin de bu bazlar arasında olduğunu söylemek mümkündür

TTGTTTT motifinin promotor sırası olup olmadığının tespiti için yapılan mutasyon işlemi sonucunda promotorun aktivitesinde %25 düşüş belirlendi.

Bu çalışma sonucunda *Chilo iridescent* virüs'ün replike olabileceği yeni bir konak tespit edilmiş, ayrıca bu virüse ait *dnapol* ve *mcp* genlerinin promotor bölgeleri üzerinde ilk defa ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır.

## 6. ÖNERİLER

Tezin tartışma bölümünde de belirtildiği gibi literatürdeki bilgilere göre CIV'ye ait saflaştırılmış DNA UV ile muamele edilmiş virüs partikülü ile birleştirilmedikçe enfeksiyon oluşturmamaktadır (Cerutti vd., 1989). Bu durum aynı zamanda FV3 içinde geçerlidir. Nitekim bu durum tezin transfeksiyon aşamasında gözlemlendi. Lusiferaz geninin promotor kısmına klonlanmış olan, CIV'ye ait erken ve geç genlerin muhtemel promotor bölgeleri, lusiferaz geninin ekspresyonunu ortamda CIV partikülü olmaksızın gerçekleştiremedi. Bu durum erken genlerin aktivasyonu için virüse ait bir bileşenin gerekli olduğunu göstermektedir. Erken genlerin aktivasyonunu sağlayan virüse ait bu yapının ne olduğunun tespit edilmesi iridovirüsler ile ilgili oldukça ilginç bilgilerle sonuçlanabilir.

Bu çalışmada *mcp* ve *dnapol* genlerinin promotorlarının bulunabileceği muhtemel baz aralıkları belirlenmiştir. Daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak spesifik promotor bölgeleri tespit edilebilir.

Çalışmada *dnapol*'ün 5' kısmında tespit edilen TTGTTTT motifinin sadece bir bazında mutasyon gerçekleştirildi. Mutasyon sonucunda lusiferaz geninin ekspresyonu tamamen yok olmamakla beraber % 25 oranında azaldığı tespit edildi. Daha ayrıntılı delesyon çalışmaları ile bu motif tamamen kaldırılıp ekspresyon gücündeki düşüş gözlenmelidir.

*dnapol*'ün promotor bölgesinde tespit edilen TTGTTTT erken genler olan *helikaz* ve *rnapol*'ün yapısında da tespit edilmiştir. Bu genlerinde üzerinde promotor çalışması yaparak bu motifin bunlarda da bulunup bulunmadığı araştırılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Ahn, B.Y., Gershon, P.D. ve Moss, B., 1994. RNA-Polymerase Associated Protein RAP94 Confers Promoter Specificity for Initiating Transcription of Vaccinia Virus Early Stages, J. Biol. Chem., 269, 7552-7557.
- Bahr, U., Tidona, C.A. ve Darai, G., 1997. The DNA Sequence of *Chilo* Iridescent Virus between the Genome Coordinates 0.101 and 391; Similarities In Coding Strategy between Insect and Vertebrate Iridoviruses, Virus Genes, 15, 235-245.
- Baroudy, B.M. ve Moss, B., 1980. Purification and Characterization of a DNA-Dependent RNA-Polymerase from Vaccinia Virions, J. Biol. Chem., 255, 4372-4380.
- Cann, A.J., 1993. Principles of Molecular Virology, Academic Press, 110-115.
- Carter, J.B., 1973. The mode of Transmission of Tipula Iridescent Virus. II Route of Infection, J. Invertebr. Pathol., 21,136.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1980. Inhibition of Macromolecular Synthesis in Cells Infected with an Invertebrate Virus (Iridovirus Type 6 or CIV), Arch. Virol., 63, 297-303.
- Cerutti, M., Guerillon, J., Arella, M. ve Devauchelle, G., 1981. Replication of Type 6 Iridovirus in Various Cell Lines, C. R. Seances Acad. Sci., 292, 797-802.
- Cerutti, M., Cerutti, P. ve Devauchelle, G., 1989. Infectivity of Vesicles Prepared from *Chilo* Iridescent Virus Inner Membrane: Evidence for Recombination between Associated DNA Fragments, Virus Res., 12, 299-313.
- Chomczynski, P., 1993. A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples, Biotechniques, 15, 532-537.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C.F. ve Williams, T., 2001. A Comparison of Techniques for Detecting Invertebrate Iridescent Virus 6, J. Virol Meth., 98, 2, 109-18.
- Day, M.F. ve Mercer, E.H., 1964. Properties of an Iridescent Virus from the Beetle *Sericesthis Pruinosa*, Aust. J. Biol. Sci., 17, 892.
- D'Costa, S., Yao, H. ve Bilimoria, S., 2001. Transcription and Temporal Cascade in *Chilo* Iridescent Virus Infected Cells, Arch. Virol., 146, 2165-2178.
- Delius, H., Darai, G. ve Flusgel, R.M., 1984. DNA Analysis of Insect Iridescent Virus 6: Evidence for Circular Permutation and Terminal Redundancy, J. Virol., 49, 609-614.

- Demirbağ, Z., 1993. Comparative Replication of *Autographa Californica* Nuclear Polyhedrosis Virus in Abortive and Productive Infections of Insect Cell Lines, Phd Thesis, Texas Tech University, Texas, USA
- Devauchelle, G., Attias, J., Monnier, C., Barray, S., Cerutti, M., Guerillon, J. ve Orange-Balange, N., 1985. *Chilo* Iridescent Virus, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 116, 37-48.
- Eaton, B.T., Hyatt, A.D. ve Hengstberger, S., 1991. Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus: Purification and Classification, J. Fish Dis., 14, 157.
- Fenner, F., 1976. Second Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), Intervirology, 7, 1.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H. ve Darai, G., 1988a. Identification and Characterization of the Repetitive DNA Element in the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6, Virology, 167, 485-496.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J., Rössen-Wolff, A., Delius, H. ve Darai, G., 1988b. DNA Nucleotide Sequence Analysis of the *Pvu*II DNA Fragment L of the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6 Reveals a Complex Cluster of Multiple Tandem, Overlapping, and Interdigitated Repetitive DNA Elements, Virology, 167, 497-506.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H., Rössen-Wolff, A. ve Darai, G., (Eds.), 1990. Molecular, Kluwer, Boston/Dordrecht/ London.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A *Chilo* Iridescent Virus (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: *Pyralidae*), Appl. Entomol. Zool., 1, 69-72.
- Fukuda, T., 1971. Per Os Transmission of *Chilo* Iridescent Virus to Mosquitoes, J. Invertebr. Pathol., 18, 152-153.
- Garcia-Beato, R., Salas, M.L., Viñuela, E. ve Salas, J., 1992. Role of the Host Cell Nucleus in the Replication of African Swine Fever Virus DNA, Virology, 188, 637-649.
- Garcia-Escudero, R. ve Viñuela, E. J., 2000. Structure of African Swine Fever Virus Late Promoters: Requirement of a TATA Sequence at the Initiation Region, J. Virol., 74, 8176-8182.
- Goorha, R.D., Willis, 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. Virol., 21, 802-805.
- Goorha, R., Murti, G., Granoff, A. ve Tirey, R., 1978. Macromolecular Synthesis in Cells Infected by Frog Virus 3. VIII: The Nucleus is a Site for Frog Virus 3 DNA and RNA Synthesis, Virology, 49, 86-91.
- Goorha, R., 1979. Frog Virus 3 Requires RNA Polymerase for Its Replication, J. Virol., 37, 496-499.

- Goorha, R. ve Murti, K.G., 1982. The Genome of Frog Virus 3, An Animal DNA Virus is Circularly Permuted and Terminally Redundant, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 248-252.
- Grace, T.D.C., 1962. Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissue Grown in Vitro, Nature, 195, 788-789.
- Hama, H., 1968. On the Cross-Inoculation of *Chilo* Iridescent Virus (CIV), Japan. J. Appl. Entomol. Zool., 12, 34-39.
- Handermann, M., Schnitzler, P., Rosen-Wolff, A., Raab, K., Sonntag, K.C. ve Darai, G., 1992. Identification and Mapping of Origins of DNA Replication within the DNA Sequences of the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6, Virus Genes, 6, 19-32.
- Hernandez, O., Maldonado, G. ve Williams, T., 2000. An Epizootic of Patient Iridescent Virus Disease in Multiple Species of Blackflies in Chiapas, Mexico, Med. Vet. Entomol., 14, 458-462.
- 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, 182-96.
- Kelly, D.C., 1985. Insect Iridescent Viruses, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 116, 23-35.
- Kleespies, R.G., Tidona, C.A. ve Darai, G., 1999. Characterization of a New Iridovirus Isolated from Crickets and Investigations on the Host Range, J. Invertebr. Pathol., 73, 84-90.
- Landt, O., Grunert, H.P. ve Hahn, U., 1990. A General Method for Rapid Site Directed Mutagenesis Using the Polymerase Chain Reaction, Gene, 96, 125-128.
- Liu, H.S. ve Bilimoria, S.L., 1997. Regulation of Infected Cell-Specific Protein Synthesis in SF-IPLB-21 Cells Productively Infected with *Spodoptera frugiperda* Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus, Intervirology, 40, 50-54
- Marina, C.F., Jimenez-Arredondo, J.I., Castillo, A. ve Williams, T., 1999. Sublethal Effects of Iridovirus Disease in a Mosquito, Oecologia, 119, 383-388.
- Marks, H., Ren, X.Y., Witteveldt, J., Sandbrink, H., Vlak, J.M. ve Van Hulten, M.C.W., 2003. Molecular Genetics of White Spot Syndrome Virus, Proceedings of the 5<sup>th</sup> Symposium on Diseases In Asian Aquaculture. Walker, P.J. et al., (Eds.), Brisbane, Australia (In Press).
- Mclaughlin, R.E., Scott, H.A. ve Bell, M.R., 1972. Infection of the Boll Weevil by *Chilo* Iridescent Virus, J. Invertebr. Pathol., 19, 285-290.
- Mitsubishi, J., 1967. Infection of Leafhopper and Its Tissues Cultivated in Vitro with *Chilo* Iridescent Virus, J. Invertebr. Pathol., 9, 432-434.

- Moss, B., 1996. Poxviridae: The Viruses and Their Replication, In: Fields Virology, Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Philadelphia, 2637-2671.
- Müller, K., Tidona, C.A., ve Darai, G., 1999. Identification of a Gene Cluster within the Genome of *Chilo* Iridescent Virus Encoding Enzymes Involved in Viral DNA Replication and Processing, Virus Genes, 18, 243-264.
- Nevins, J., 1983. The Pathway of Eucaryotic mRNA Formation, Annu. Rev. Biochem., 52, 441-466.
- Ohba, M. ve Aizawa, K., 1978. Comparative Titration of *Chilo* Iridescent Virus in Vivo and in Vitro, J. Invertebr. Pathol., 32, 394-395.
- Rodríguez, J.M., Salas, M.L. ve Viñuela, E., 1996. Intermediate Class of mRNAs in African Swine Fever Virus, J. Virol., 70, 8584-8589.
- Ross, L. ve Guarino, L.A., 1997. Cycloheximide Inhibition of Delayed Early Gene Expression in Baculovirus-Infected Cells, Virology, 232, 105-113.
- Schnitzler, P., Soltau, J. B., Fischer, M., Reisner, H., Scholz, J., Delius, H. ve Darai, G., 1987. Molecular Cloning and Physical Mapping of the Genome of Insect Iridescent Virus Type 6: Further Evidence for Circular Permutation of the Viral Genome, Virology, 160, 66-74.
- Schnitzler, P., Sonntag, K.C., Muller, M., Janssen, W., Bugert, J.J., Koonin, E.V. ve Darai, G., 1994. Insect Iridescent Virus Type 6 Encodes a Polypeptide Related to the Largest Subunit of Eukaryotic RNA Polymerase II, J. Gen. Virol., 75, 1557-1567.
- Smith, K.M., 1976. Virus–Insect Relationships, Longman, London, 102–104.
- Stohwasser, R., Raab, K., Schnitzler, P., Janssen, W. ve Darai, G., 1993. Identification of the Gene Encoding the Major Capsid Protein of Insect Iridescent Virus Type 6 by Polymerase Chain Reaction, J. Gen. Virol., 74, 873-879.
- Tidona, C.A. ve Darai, G., 1997. The Complete DNA Sequence of Lymphocystis Disease Virus, Virology, 230, 207–216.
- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R. ve Darai, G., 1998. Is the Major Capsid Protein of Iridoviruses a Suitable Target for the Study of Viral Evolution?, Virus Genes, 16, 59-66.
- Turner, P.C., Mclennan, A.G., Bates, A.D. ve White, M.R.H., 1998. Molecular Biology, Bios. Scientific Publishers, Liverpool, UK, 165-213.
- Xeros, N., 1954. A Second Virus Disease of the Leatherjacket *Tipula paludosa*. Nature, 174, 562-563.
- URL-1, [www-Micro.Msb.Le.Ac.Uk/335/Kalmakoff/Iridoviruses.Html](http://www-Micro.Msb.Le.Ac.Uk/335/Kalmakoff/Iridoviruses.Html), Iridoviruses, 18.06.2003.



- URL-2, [News.uns.purdue.edu/virusstructure/](http://News.uns.purdue.edu/virusstructure/), Virus Study Reveals How Nature “Super-Size” Tiny Structures, February, 2000.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M. ve Bishop, D.H.L. (Eds.), 2000. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego.
- Venkatesan, S., Baroudy, B.M. ve Moss, B., 1981. Distinctive Nucleotide Sequences Adjacent to Multiple Initiation and Termination Sites of an Early Vaccinia Virus Gene, Cell, 125, 805-813.
- Williams, T. 1996. The Iridoviruses, Adv. Virus Res., 46, 345-412.
- Williams, T., 1998. Invertebrate Iridescent Viruses, In: The Insect Viruses, Miller, L. and Ball, A. (Eds.), Plenum Press NY, 31-68.
- Williams, R.C. ve Smith, K.M., 1957. A Crystallizable Insect Virus, Nature, 179, 119.
- Willis, D.B. ve Granoff, A., 1980. Frog Virus 3 DNA is Heavily Methylated at Cpg Sequences, Virology, 107, 250-257.
- Willis, D.B., Goorha, R. ve Granoff, A., 1984. DNA Methyl Transferase Induced by Frog Virus 3, J. Virol., 49, 86-91.
- Willis, D.B. ve Granoff, A., 1985. Trans-Activation of an Immediate-Early Frog Virus 3 Gene by a Virion Protein, J.Virol., 56, 495-501.
- Willis, D.B., 1987. DNA Sequences Required for Trans Activation of an Immediate-Early Frog Virus 3 Gene, Virology, 161, 1-7.

## 8. EKLER

Ek Tablo 1. CIV genomundaki genlerin kodlayan bölgelerinin özellikleri (Jakob vd., 2001).

Gen	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asitler	Domainler (Protein sırası içindeki aminoasid Pozisyonu)	En yüksek homolog olduğu proteinler
006L	1050-2105	352	none	putative 17 KD protein of <i>Heliothis armigera</i> entomopoxvirus (AF017791)
010R	2498-2857	120	CXXCXGXG dnaJ domain signature (36-110)	none
013L	2901-4772	624	none	exonuclease II of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (P40383)
019R	4896-5732	279	none	none
022L	5765-9277	1171	SNF2 and others N-terminal domain (59-91) DEAH-Box subfamily ATP-dependent helicases signature (213-216)	1. nucleoside-triphosphatase I of <i>Amsacta moorei</i> entomopoxvirus (P29814) 2. ORF 132L (early transcription factor subunit) of LCDV (L63545)
029R	9504-9890	129	none	none
030L	9931-11520	530	ATP/GTP binding site motif A (P-loop) (30-37)	mitochondrial DNA repair and recombination protein PIF1 (Precursor) of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P07271)
034R	11997-12398	134	none	none
037L	12470-16288	1273	ATP/GTP binding site motif A, P-loop (31-38) bipartite nuclear localization signal (115-132, 772-789) DNA polymerase family B (1137-1211; 150-1035)	DNA-Polymerase of LCDV (L63545)
041L	16380-16745	122	none	putative protein 139R of LCDV (L63545)
042R	16811-17092	94	leucine zipper pattern (14-35)	none
043L	17343-17690	116	none	none
044R	18066-18260	65	none	putative protein 089L of LCDV (L63545)
045L	18448-21843	1132	prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (845-855) DNA topoisomerase II (10-561, N-terminal region) (416-487)	topoisomerase II of <i>Paramecium bursaria</i> chlorella virus I (O41065)
049L	21936-22304	123	none	putative protein 144L of LCDV (L63545)
050L	22612-25767	1052	ATP/GTP binding site motif A (P-loop) (28-35, 44-51) DA-BOX 2nd half motif for nucleotide binding, associated with P-loop (973-1037) ATP binding proteins "active transport" family s (952-1010)	P115 protein of <i>Mycoplasma hyorhinis</i> (P41508)
056R	25855-26703	283	leucine zipper pattern (44-65)	none
060L	26742-27449	236	none	none
061R	27538-28002	155	lysosome-associate membrane glycoproteins cytop (6-37)	none
062L	28071-28607	179	none	none
065R	28749-28913	55	none	putative protein 118R of LCDV (L63545)
067R	29008-30375	456	none	none
069L	30455-31144	230	none	none
073R	31630-31830	67	none	putative protein 129R of LCDV (L63545)
075L	31678-32451	258	ATP/GTP binding site motif A, P-loop (36-41) P-loop nucleotide binding motif (31-50)	putative protein 054R (ATPase) of LCDV (L63545)
077L	32607-33545	313	bipartite nuclear localization signal (148-165)	none
082L	33937-34404	156	none	none
083L	34404-34553	50	none	putative protein 004R of LCDV (L63545)
084L	34597-35091	165	none	none
085L	35109-37985	959	ribonucleotide reductase (47-272), (611-712), (47-891)	putative protein 176L (ribonucleoside diphosphate reductase large chain) of LCDV (L63545)
095L	38530-38784	85	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) (39-72)	none
096L	38874-39395	174	Beta-Ig-H3/Fasciclin domain (36-171)	none
098R	39478-41283	602	bipartite nuclear localization signal (16-33)	none
101L	41938-42639	234	none	intron-associated endonuclease 2 of bacteriophage T4 (P07072)
104L	42838-43008	57	bipartite nuclear localization signal (29-46, 36-53)	sperm protamine of <i>Coturnix coturnix japonica</i> (Japanese quail) (P14402)
106L	43081-43251	57	bipartite nuclear localization signal (7-24, 11-28, 18-35, 29-46)	1. sperm protamine P1 of <i>Notoryctes typhlops</i> (P421143) 2. putative protein 134L of LCDV (L63545)
107L	43312-43551	80	RNA polymerases N/ 8 Kd subunit (1-61) heat-stable enterotoxins signature (9-55)	DNA-dependent RNA polymerase subunit N of <i>Sulfolobus acidocalcaricus</i> (P39472)

Ek Tablo 1'in devamı.

Gen	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asitler	Domainler (Protein sırası içindeki aminoasid Pozisyonu)	En yüksek homolog olduğu proteinler
118R	46633-48177	515	prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (149-159)	putative protein 067L of LCDV (L63545)
120L	48302-48661	120	chitin recognition or binding domain signature (72-119)	none
121R	48729-48995	89	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) (45-77)	zinc finger protein EF2 of CTV40629
122R	49041-49463	141	none	none
123R	49533-49958	142	bipartite nuclear localization signal (100-117) tyrosine specific protein phosphatases profile (57-115) dual specificity protein phosphatase profile (2-136) specificity phosphatase, catalytic domain (2-134) specific protein phosphatases active site (56-117) tyrosine specific protein phosphatases active site (79-91)	protein-tyrosine phosphatase (late protein H1) of vaccinia virus (P07239)
127L	50963-51667	235	none	none
130R	51751-52353	201	none	none
132L	52489-53205	239	zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (81-107)	none
136R	53353-53886	178	neutral zinc metallopeptidases (107-162) zinc-binding region signature (129-138)	none
137R	53930-54100	57	none	putative protein 023L of LCDV (L63545)
138R	54168-54509	114	none	none
141L	54578-54772	65	myotoxins signature (1-55) growth factor and cytokines receptors family signature (3-65)	none
140L	54867-55058	64	none	putative protein 062R of LCDV (L63545)
141B	55099-55350	84	none	none
142R	55500-56375	292	double stranded RNA-binding domain (dsRBD) profile (204-276) ribonuclease III family domain profile (32-152)	1. putative protein 137R (ribonuclease III (double-stranded RNA-specific)) of LCDV (L63545) 2. ribonuclease III of <i>Thermotoga maritima</i> (Q9X0I6)
143R	56488-57072	195	ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) (8-15)	1. putative protein 136R (thymidine kinase) of LCDV (L63545) 2. thymidine kinase of channel catfish herpesvirus (P28855) 3. hypothetical 25.4 kDa protein in SERS-DNAZ intergenic region of <i>Bacillus subtilis</i> (P37529)
145L	57102-57566	155	none	none
146R	57731-58465	245	bipartite nuclear localization signal (171-188) UvrC homology region 1 (6-84)	none
148R	58646-59887	414	ZIP transcription factor (259-289)	none
149L	59963-61960	666	none	none
155L	62006-62770	255	none	none
156R	62812-62982	57	none	putative protein 116L of LCDV (L63545)
157L	62998-63453	152	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) (111-145)	apoptosis inhibitor (IAP) of <i>Cydia pomonella granulosus virus</i> (P41436)
159L	63543-64967	475	none	none
160L	65070-65228	53	signal peptide (1-23)	sillucin (antibiotic) of <i>Rhizomucor pusillus</i> (P02885)
161L	65237-66562	442	helicases conserved C-terminal domain (317-403)	helicase (D10 protein) of bacteriophage T5 (P11107)
162R	66645-67100	152	none	none
165R	67220-68011	264	neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding region (64-113), matrixin (1-83)	Stromelysin-3 precursor (matrix metalloproteinase-11) of <i>Xenopus laevis</i> (Q11005)
169L	68050-68445	132	none	CTLA-2 $\alpha$ protein (activated T-cell protein) precursor of <i>Mus musculus</i> (P1239)
170L	68502-69239	246	none	none
172L	69352-71169	606	helicases conserved C-terminal domain (461-544), SNF2 and others N-terminal domain (36-153, 204-260, 295-363) phosphopantetheine attachment site (387-402)	global transactivator of <i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i> (P41447)
175R	71480-72031	184	zinc finger, C3HC4, RING finger (137-169) bipartite nuclear localization signal (161-178)	zinc finger protein EF2 of <i>Chilo Iridescent virus</i> (P402629)
176R	72297-75374	1026	RNA polymerase alpha subunit (216-992) cytochrome c family heme-binding site signature (62-67)	1. DNA-dependent RNA polymerase subunit $\alpha$ ' of <i>Methanococcus vannielii</i> (P41556) 2. putative protein 016L (DNA-dependent RNA polymerase largest subunit) of LCDV (L63545)

Ek Tablo 1'in devamı.

Gen	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asitler	Domainler (Protein sırası içindeki aminoasid Pozisyonu)	En yüksek homolog olduğu proteinler
179R	75567-79124	1186	tyrosine protein kinases specific active-site signature (784-796)	putative protein 195R of LCDV (L63545)
184R	79271-82183	971	ATP/GTP binding site motif A (P-loop) (521-528, 667-674)	putative protein 128L of LCDV (L63545)
192R	82239-82457	73	none	none
193R	82521-83144	208	BIR repeat profile, inhibitor of apoptosis domain (40-109), zinc finger, C3HC4 type (RING finger) (163-196)	apoptosis inhibitor (IAP) of Cydia pomonella granulosos virus (P41436)
195I	83240-83656	139	none	high mobility group protein of <i>Tetrahymena pyriformis</i> (P40625)
196R	83714-84235	174	thioredoxin-domain (16-124) thioredoxin family active site (39-57)	none
197R	84586-85383	266	tyrosine specific protein phosphatases profile (82-139) tyrosine specific protein phosphatases active site (87-139)	none
198R	85637-87052	472	none	none
200R	87186-87368	61	none	none
201R	87534-88790	419	none	none
203I	88855-89334	160	none	none
205R	89498-91342	615	none	DNA Ligase of <i>Borrelia burgdorferi</i> (O51502)
206R	91481-91936	152	none	none
208I	92246-92404	53	none	putative proteins of LCDV (L63545) 1. 086R 2. 055L
211I	95431-96600	390	none	none
212I	96736-97815	360	none	none
213R	98000-99565	522	none	none
216R	99596-100075	160	none	none
217I	100197-100394	64	none	putative protein 133L of LCDV (L63545)
219I	101461-102489	343	none	none
223I	102659-102847	63	none	putative protein 123R of LCDV (L63545)
224I	102705-104051	449	cysteine protease (281-338) eukaryotic thiol (cysteine) proteases (61-122) eukaryotic thiol (cysteine) proteases cysteine active site (93-104)	1. cathepsin B precursor (Cathepsin B1) of <i>Gallus gallus</i> (Chicken) (P43233) 2. putative protein 043R (cysteine proteinase; Cathepsin B- precursor) of LCDV (L63545)
225R	104095-104979	295	thymidylate synthase active site (144-200)	thymidylate synthase of herpesvirus ateles (P12462)
226R	105047-105334	96	cytochrome c family heme-binding site signature (60-65)	none
227I	105409-105597	63	none	none
228I	105726-106532	269	leucine zipper pattern (124-145)	hypothetical protein MJ1187 <i>Methanococcus jannaschii</i> (Q58588)
229I	106593-107921	443	none	none
232R	108021-110033	671	bipartite nuclear localization signal (274-291, 281-298, 288-305) OTU domain (392-521) DNA polymerase (viral) N-terminal domain (58-310)	IRV1 L96 protein of Tipula Iridescent Virus (TIV) (P22856)
234R	110163-110741	193	none	none
235I	110786-111580	265	SAM (and some other nucleotide) binding motif (42 -145) prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (7 -17)	hypothetical 33.8 kDa protein in TWT1-FLO5 intergenic region of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P38892)
236I	111859-112077	73	none	none
238R	112084-113403	440	none	none
240R	113666-113851	62	none	none
241I	114061-114570	170	TFIIS cysteine-rich domain signature (62-156)	none
242I	114606-114902	99	none	1. hypothetical 12.2 KD protein in VLF1-GP41 intergenic region (Q06692) autographa californica nuclear polyhedrosis virus (ACMNPV) 2. hypothetical 12.2 KD protein (ORF 82) (P45472) hypothetical orgyia pseudotsugata multicapsid polyhedrosis virus (OPMNPV) 3. hypothetical 11.3 KD protein in SOHA-MTR intergenic region <i>E. coli</i> (P45472)
244I	115128-115973	282	metallo-phosphoesterase motif (4-190)	exonuclease SBCD homolog of <i>Borrelia burgdorferi</i> (O51769)
246I	116020-116397	126	none	none
247I	116477-116827	117	none	none



Ek Tablo 1'in devamı.

Gen	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asitler	Domainler (Protein sırası içindeki aminoasid Pozisyonu)	En yüksek homolog olduğu proteinler
249R	117165-117326	54	none	none
250R	117365-117787	141	none	none
251F	117915-118553	213	ATP/GTP-binding site motif A, P-loop (21-28) thymidylate kinase signature (102-114)	thymidylate kinase of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P00572)
253E	118643-119140	166	none	none
254E	119361-120368	336	none	none
259B	120500-121396	299	bipartite nuclear localization signal (205-222)	none
261R	121519-125601	1361	phosphate transporter family (99-921)	potential repetitive protein
266E	125646-127775	710	none	none
272E	127802-128014	71	none	none
273R	128273-128680	136	none	none
274E	128758-130158	467	none	1. capsid protein of IIV-1 (P18162) major capsid protein 2. putative protein 147L (major capsid protein) of LCDV (L63545)
282R	130331-131479	383	bipartite nuclear localization signal (246-263)	putative protein 162L of LCDV (L63545)
284R	131527-131970	148	none	IAP-like protein P27 of African swine fever virus (Q65138)
285E	132053-132415	121	none	none
286E	132478-132642	55	none	putative protein 009R of LCDV (L63545)
287R	132500-133444	315	bipartite nuclear localization signal (227-244)	putative protein 108L (DNA puff II/9-2 (DNA-binding) protein precursor) of LCDV (L63545)
288R	132855-133040	62	none	putative protein 008R of LCDV (L63545)
289E	133496-134746	417	none	none
293R	134869-135324	152	none	none
295E	135397-139425	1343	bipartite nuclear localization signal (779-796)	none
300B	139519-139701	61	none	none
301E	139734-139955	74	none	none
302E	140006-141139	378	Zn-finger C2H2 (3-30) ATP/GTP-binding site motif A, P-loop (88-95)	Oocyte Zn Finger protein XLCOF15 (Fragment) <i>Xenopus laevis</i> (P10072)
305E	141207-141830	208	none	none
307E	142256-142846	197	none	putative protein 019R of LCDV (L63545)
308E	142877-143095	73	none	1. probable nonspecific lipid-transfer protein precursor (LTP) (aleurone-specific 10 KDA protein) ( <i>hordeum vulgare</i> barley) (P27275) 2. putative protein 113L of LCDV (L63545)
309E	143150-143800	217	none	none
312R	143926-144201	92	none	none
313E	144269-145342	358	none	none
315E	145433-146128	232	none	none
316E	146274-147527	418	none	none
322R	147601-147807	69	protein splicing signature (42-49)	none
329R	148473-149606	378	none	none
332E	149654-150355	234	bipartite nuclear localization signal (74-91) zinc finger, C3HC4 type (RING finger) (185-219)	apoptosis inhibitor of <i>Cydia pomonella</i> granulosis virus (CPGV) (P41436)
335E	150426-151418	331	none	none
337E	151520-152755	412	glycoprotein hormones beta chain signature 1 (119-125)	putative protein 160L of LCDV (L63545)
340R	152801-153319	173	double stranded RNA-binding domain (dsRBD) profile (30-102)	none
342R	153531-153794	88	aminoacetyl-transfer RNA synthetases class-I signature (58- 69)	none
343E	153856-155241	462	bipartite nuclear localization signal (271-288)	DNA-directed RNA-Polymerase subunit A'' of <i>Methanococcus vanniellii</i> (P14247)
346R	155331-155537	69	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) signatur (12-68)	none
347E	155729-156061	111	none	1. Augmenter of liver regeneration of <i>Rattus norvegicus</i> (Q63042) 2. Hypothetical 14.4 kDa protein B119L of African swine fever virus (Q65163)
349E	156103-156396	98	none	none
349E	156582-157001	140	TFIIIS cysteine-rich domain signature (82-140)	DNA-directed RNA-Polymerase subunit M of <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (O27369)
350E	157094-157714	207	none	none
354E	158005-158211	69	L-lactate dehydrogenase active site (18-63)	none
356E	158407-158562	52	none	putative protein 046R of LCDV (L63545)
357E	158775-159266	164	none	none
358E	159333-159788	152	none	none
359E	159901-160938	346	bipartite nuclear localization signal (168-185)	none

Ek Tablo 1'in devamı.

Gen	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asitler	Domainler (Protein sırası içindeki aminoasid Pozisyonu)	En yüksek homolog olduğu proteinler
367E	161034-162659	542	cysteine protease (373-431) eukaryotic thiol (cysteine) proteases cysteine active site (166-177) eukaryotic thiol (cysteine) proteases histidine active site (380-390)	1. cathepsin B-similar protease-precursor of <i>Trypanosoma cruzi</i> (AAD03404) 2. putative protein 043R (cysteine proteinase; Cathepsin B- precursor) of LCDV (L63545)
366E	162769-163110	114	bipartite nuclear localization signal (25-42)	none
367E	163113-163301	63	none	putative protein 165L of LCDV (L63545)
369E	163549-164793	415	5'3'-exonuclease I-domain (172-295) 5'3'-exonuclease N-domain (1-104) XPG N-terminal domain (1-107) XPG I-region (186-281)	1. Flap endonuclease 1 of <i>Homo sapiens sapiens</i> (P39748) 2. putative protein 191R (structure specific endonuclease) of LCDV (L63545)
373E	164803-165531	243	bipartite nuclear localization signal (207-224)	none
374E	165568-166062	165	none	none
376E	166108-167187	360	ribonucleotide reductases (30-343)	1. ribonucleotide reductase (small subunit) of <i>Chlamydia trachomatis</i> (O84834) 2. putative protein 027R (ribonucleoside-diphosphate reductase) of LCDV (L63545)
378E	167305-167883	193	none	none
380E	167936-169519	528	protein kinase domain profile (156-507) eukaryotic protein kinase domain (156-173) protein kinases ATP-binding region signature (162-187) soybean trypsin inhibitor (Kunitz) protease inhibitors family signature (100-116)	1. putative protein 010L (serine/theonine protein kinase) of LCDV (L63545) 2. putative protein 080R (serine/theonine protein kinase) of LCDV (L63545) 3. putative protein 088R (protein kinase) of LCDV (L63545)
385E	169866-170627	254	none	none
388E	170803-171843	347	none	ORF MSV198 (T28359), protein of the MTG-Motiv-Genfamily of <i>Melanoplus sanguinipes</i> entomopoxvirus
389E	172148-173380	411	protein kinase domain profile (126-410) bipartite nuclear localization signal (89-106) eukaryotic protein kinase domain (203-310) protein kinases ATP-binding region signature (132 -162) Serine/Threonine protein kinases active-site signature (258 -270)	1. Yb-C3R of Yaba monkey tumor virus, (BAA88975) 2. Serin-Threonin-Proteinkinase 51PK(S) of <i>Mus musculus</i> (AAC29496) 3. 30 kDa protein kinase homolog of <i>Vaccinia virus</i> (P16913)
391E	173396-174277	294	leucine zipper pattern (154-175)	none
392E	174295-174570	92	'paired box' domain signature (38-91) serine-proteases, subtilase family, aspartic acid (28-75)sugar transport proteins signature 2 (19- 87)	hypothetical 9.2 KD protein of <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (O26182)
393E	174414-175775	454	none	1. immediate-early Protein ICP-46 of Frog Virus 3 (P14358) 2. putative protein 047L of LCDV (L63545)
395E	175856-176308	151	none	none
396E	176524-179694	1057	Trp-Asp (WD) repeats signature (982-996)	potential repetitive protein
399E	178544-178933	130	none	none
401E	179880-180608	243	high-mobility group (HMG) family (55-122, 127-198)	1. high mobility group protein homolog of CIV (P40628) 2. high mobility group protein 1 of <i>Homo sapiens sapiens</i> (P09429)
404E	180729-181442	238	none	ORF MSV027 (AAC97845) Protein of the MTG-Motiv-Genfamily of <i>Melanoplus sanguinipes</i> entomopoxvirus
413E	182811-183434	208	zinc finger, C3HC4, RING finger (148-195)	Zincfinger-Protein ZEF2 of CIV (P40629)
414E	183571-184146	192	mutT domain signature (83-102) bacterial mutT protein (68-105)	1. Mutator MUTT Protein of <i>Synechocystis sp.</i> (P72658) 2. ORF G5R of African swine fever virus (CAA50807) 3. putative protein 022R (mutator mutT protein) of LCDV (L63545)
415E	184256-184981	242	none	none
420E	185306-186646	447	bipartite nuclear localization signal (288-305)	1. ORF MSV198, (NP_048269), 2. ORF MSV194, (NP_048265), Proteines of the MTG-Motiv-Genfamily of <i>Melanoplus sanguinipes</i> entomopoxvirus
423E	187341-187883	181	none	none
426E	187960-188373	138	none	Lectinhomolog of African Swine Fever Virus, (AAC28418 )
428E	188676-192254	1193	bipartite nuclear localization signal (440-457) RNA polymerase beta subunit (113-1133) prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (527-537)	1. DNA-directed RNA polymerase II 135 KDA polypeptide (RNA polymerase II subunit 2) of <i>Lycopersicon esculentum</i> (Q42877); 2. putative protein 025L (DNA-dependent RNA-Polymerase II (Subunit 2)) of LCDV (L63545)



Ek Tablo 1'in devamı.

Gen	Nükleotid Pozisyonu	Amino Asitler	Domainler (Protein sırası içindeki aminoasid Pozisyonu)	En yüksek homolog olduğu proteinler
435R	192309-192503	65	none	none
436R	192354-193268	305	bipartite nuclear localization signal (250-267)	proliferating cell nuclear antigen homolog A193L of Chlorellavirus (Q84513)
437R	193344-193538	65	none	putative protein 177R of LCDV (L63545)
438R	193647-194534	296	dUTPase (163-294)	Desoxyuridin-5'-triphosphat-nucleotidohydrolase (DUTPase) of <i>Homo sapiens sapiens</i> (P33316)
439R	194572-196182	537	prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (75-85) protein kinase domain profile (119-429)	none
441R	196413-196760	116	none	none
443R	196872-204167	2432	gram-positive cocci surface proteins 'anchoring' hexapeptide (155-160, 848-853) leucine zipper pattern (319-340)	potential repetitive protein; Submaxillar Apomucin of swine (13288 aa) (AAC62527)
444R	197129-197290	54	prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (9-19) N-4 cytosine-specific DNA methylase signature (1-43)	none
445R	200135-200338	68	asparaginase /glutaminase active site (9-61)	Repetitive ORF-group
446R	201089-201292	68	none	Repetitive ORF-group: CIV ORF 445L
447R	201332-201514	61	none	Repetitive ORF-group: CIV ORF 445L
448R	201554-201757	68	none	Repetitive ORF-group: CIV ORF 445L
449R	203165-203368	68	asparaginase / glutaminase active site (9-60)	Repetitive ORF-group: CIV ORF 445L
450R	204007-204228	74	none	hypothetical 8.1 KD protein in the MRH-SOC intergenic region of Bakteriophage T4 (P20706)
457R	204360-204545	62	none	none
458R	204634-205047	138	thioredoxin family active site (22-66) thioredoxin-domain (10-138)	1. glutathionperoxidase-Homolog YKL026C of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , (P36014) 2. putative protein 081R (thioredoxin 2) of LCDV (L63545)
454R	205154-205705	184	RNA polymerases H / 23 Kd subunit (106-184)	DNA-dependent RNA-Polymerase II (Subunit 5) of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Q09191)
457R	205777-206658	294	none	none
458R	207044-208528	495	none	none
460R	208588-209247	220	none	none
464R	209678-209872	65	none	putative protein 026L of LCDV (L63545)
465R	210105-210254	50	none	putative proteins of LCDV (L63545) 1. 142R 2. 045L
466R	210309-210578	90	glutamine synthetase putative ATP-binding region (1-56)	none
467R	210660-212168	503	none	none
468R	212244-889	376	none	none

## ÖZGEÇMİŞ

1974 Erzurum'da doğdu. İlkokulu Trabzon'da Dumlupınar İlkokulunda, orta ve liseyi Trabzon Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 1992-1993 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1993-1996 yılları arasında Özel Koç Vakfı tarafından burs ile ödüllendirildi. 1996 yılında Biyoloji Bölümünden Biyolog unvanı ile mezun oldu. Aynı yılda Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. “*Bacillus thuringiensis*'e ait *cryIVA* ve *cryIVD* genlerinin Baculovirüs ekspresyon vektör sisteminde ekspresyonu” adlı çalışma ile yüksek lisansını, 1998 yılında tamamladı ve yine aynı yılda Doktora eğitimine başladı. 2000 - 2002 yılları arasında TÜBİTAK'tan yurt içi bursu aldı. 2002 yılında TÜBİTAK'ın yurt dışı NATO-A2 bursunu kazanarak 6 aylık süre ile Wageningen Üniversitesine (Hollanda, Wageningen), Prof. Dr. Just M. Vlak'ın laboratuvarına, doktora tezi ile ilgili çalışmalar yapmak üzere gitti. 6 aylık TÜBİTAK bursuna ek olarak 1 ayda Wageningen Üniversitesi tarafından desteklendi. 2004 Ocak ayında başlamak üzere Wageningen Üniversitesinin “Fellowship Programme of the Netherlands Ministry of Agriculture” adlı burs programından 6 aylık burs kazandı.