

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CHILo İRİDESCENT VİRÜS* MUHTEMEL APOPTOSİS İNHİBİTOR GENLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İkbal Agah İNCE**

**ARALIK 2007  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CHILO İRİDESCENT VİRÜS* MUHTEMEL APOPTOSİS İNHİBİTÖR GENLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

**İkbal Agah İNCE**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce  
“Doktor (Biyoloji)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.11.2007  
Tezin Savunma Tarihi : 07.12.2007**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fahri UÇAR  
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**Trabzon 2007**

## ÖNSÖZ

“*Chilo iridescent viriüs* (CIV) muhtemel apoptosis inhibitör genlerinin araştırılması ve fonksiyonel analizi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Bu tez *Chilo iridescent viriüs* üzerinde yapılan ilk fonksiyonel gen analizi çalışmasıdır. Bu kapsamda apoptosis inhibitör gen ailesine ait bir üyenin *İridoviridae* familyasında belirlenerek fonksiyonel analizi gerçekleştirilmiştir. CIV *iap* olarak adlandırılan bu gen *İridoviridae* familyasında belirlenen ilk *iap* genidir. Bu çalışmanın bu alanda yapılacak yeni çalışmalara temel oluşturacağı inancımı 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. Fahri UÇAR’a ve Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü ve Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerine ve mesai arkadaşlarıma, tezin bir kısmının gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarından istifade etmemi sağlayan Wageningen Üniversitesi (Hollanda), Viroloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Just M. VLAK’a, Doç. Dr. M. Monique Van OERS’e ve Dr. Marcel WESTENBERG’e teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimim süresince gerçekleştirdiğim çalışmalardaki desteklerinden dolayı 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.

İkbal Agah İNCE

Trabzon 2007

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET .....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLOLAR DİZİNİ .....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Apoptosis .....	2
1.2.1 Morfoloji.....	2
1.2.2 Kaspazlar .....	3
1.2.3 Virüslerin Apoptosise Karşı Geliştirdiği Mekanizmalar .....	6
1.3. Bakülovirüsler ve Apoptosis İnhibitör Genleri .....	7
1.3.1 P35 .....	8
1.3.2 IAP (Apoptosis inhibitör proteini) .....	8
1.4. Böcek Hücrelerinde Apoptotik Kontrol .....	12
1.5. İridovirüsler.....	13
1.5.1 İridovirüslerin Keşfi .....	13
1.5.2 <i>İridoviridae</i> Familyasının Oluşturulması .....	13
1.5.3 <i>İridoviridae</i> Familyasının Özellikleri.....	14
1.5.4 İridovirüslerde Genom Özellikleri .....	16
1.5.5 İridovirüslerde Replikasyon.....	17
1.5.6. İridovirüslerde Gen İfadesi ve Regülasyonu.....	18
1.5.7. İridovirüslerin Üretimi ve Sayımı .....	20
1.5.8. <i>Chilo Iridescent Virüs (CIV)</i> .....	21
1.6 Çalışmanın Amacı .....	23

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1.	Hücrelerin ve Virüsün Temini .....	24
2.2.	Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini .....	24
2.3.	<i>Chilo Iridescent Virüs</i> 'ün (CIV) <i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründe Replikasyonu .....	25
2.4.	<i>Chilo Iridescent Virüs</i> (CIV)'e Ait Muhtemel Apoptosis İnhibitör Genlerinin Biyoinformatik Analizi.....	25
2.5.	CIV <i>iap</i> Geninin Transkriptomik Analizi.....	26
2.5.1.	Enfekte Olmuş Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu .....	26
2.5.2.	Ters Transkripsiyon (RT-PCR).....	27
2.6.	CIV <i>iap</i> Geninin Anatomik Analizi .....	27
2.6.1.	CIV <i>iap</i> Geninin Translasyona Uğramayan 5` Bölgesinin (5`-UTR) Çoğaltılması 28	
2.6.2.	CIV <i>iap</i> Geninin Translasyona Uğramayan 3` Bölgesinin (3` UTR) Çoğaltılması. 31	
2.6.3.	CIV <i>iap</i> Geninin Translasyona Uğramayan 5` ve 3` Bölgelerinin Klonlanması.....	32
2.6.4.	CIV <i>iap</i> Geninin Proteine Dönüşmeyen 5' ve 3` Bölgelerini İhtiva Eden Klonların Seçilmesi .....	33
2.7.	CIV <i>iap</i> Geninin Fonksiyonel Analizi.....	34
2.7.1.	Geçici Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması.....	35
2.7.2.	Genin Amplifikasyonu (PCR) ve Geçici Gen İfadesi Vektörüne Klonlanması .....	36
2.7.3.	Rekombinant Plazmitlerin Kontrolü .....	39
2.8.	CIV <i>iap</i> Ekspresyonunun <i>In vivo</i> Etkilerinin Belirlenmesi .....	40
2.8.1.	Hücre Kültürü.....	40
2.8.2.	Böcek Hücrelerinin Transfeksiyonu.....	40
2.8.3.	Apoptosisin Uyarılması .....	40
2.8.4.	Hoechst Boyaması.....	41
2.8.5.	Böcek Hücrelerinden DNA Eldesi .....	41
2.8.6.	<i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Hücrelerinin Rekombinant Virüs ile Transfeksiyonu 42	
2.8.7.	İstatistiksel Analiz .....	42
2.9.	CIV <i>iap</i> Geninin Viral Enfeksiyondaki Rolünün Tespiti .....	43
2.9.1.	<i>In vitro</i> dsRNA Sentezi.....	44
2.9.2.	siRNA Sentezi.....	45
2.10.	Bakülovirüs Enfeksiyonunda CIV IAP Proteinin Rolü.....	46

3.	BULGULAR.....	47
3.1.	<i>Chilo Iridescent Virüs</i> 'ün (CIV) <i>Bombyx mori</i> (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründe Replikasyonu .....	47
3.2.	<i>Chilo Iridescent Virüs</i> 'ün (CIV) Muhtemel Apoptosis İnhibitör Genlerinin Biyoinformatik Analizi.....	48
3.3.	CIV <i>iap</i> Geninin Transkriptomik Analizi.....	49
3.4.	CIV <i>iap</i> Geninin Anatomik Analizi .....	50
3.5.	CIV <i>iap</i> Geninin Fonksiyonel Analizi.....	51
3.6.	CIV <i>iap</i> Geninin RNAi Yöntemiyle Susturulması.....	53
3.7.	Bakülovirüs Enfeksiyonunda CIVIAP Proteininin Rolü.....	58
4.	TARTIŞMA .....	60
5.	SONUÇLAR .....	64
6.	ÖNERİLER.....	66
7.	KAYNAKLAR .....	67
8.	EKLER .....	75

ÖZGEÇMİŞ

## ÖZET

Programlanmış hücre ölümü böcek hücrelerinin viral enfeksiyonlara karşı geliştirdiği başlıca savunma mekanizmalarından biridir. Virüslerin konak hücrede etkin bir enfeksiyon oluşturabilmesi, konak hücrelerin viral enfeksiyona karşı yanıt oluşturduğu apoptosis mekanizmasının baskılanabilmesiyle doğrudan ilişkilidir. *Chilo iridescent virüs* (CIV) genomunun analizi sonrasında üç açık okuma zinciri (ORF)'nin baculovirus *Cydia pomonella* granülovirüs genomunda bulunan apoptosis inhibitör genlerine (*iap*) yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bunlar sırasıyla 152, 208 ve 234 amino asitlik proteinleri kodlayan 157L, 193R ve 332L ORF'leridirler. Bu proteinler *Cydia pomonella* granülovirüs IAP-3 proteiniyle homolojiye sahiptir. ORF 193R tarafından kodlanan proteinin amino ucunda baküloviral inhibitör motifi (BIR) ve karboksi ucunda da RING finger motifi belirlenmiştir. CIV genomu içerisinde belirlenen baküloviral inhibitör tekrar, *Iridoviridae* familyası içinde şu ana kadar tüm genom analizi tamamlanan 12 üye içerisinde ilk ve tek baküloviral inhibitör motifidir (BIR). RT-PCR analiziyle genin transkriptomik analizi, transkripsiyon başlama noktası ve 5`UTR bölgesi tespit edilmiştir. İnhibitörler varlığında gerçekleştirilen enfeksiyonlarla da genin transkripsiyon sınıfı belirlenmiştir. SPC-BM-36 ve Sf21 hücrelerinde baküloviral en erken promotor *iel* kontrolünde genin geçici ifadesi sağlanarak aktinomisin D ile teşvik edilen apoptosisin baskılanması üzerine genin etkinliği belirlenmiştir. CIV`nin genetik viral 193R mutanını RNAi tekniği kullanılarak oluşturulduktan sonra gen aktivitesinin doğal enfeksiyondaki durumu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, biyoinformatik analizler sonucunda apoptosis inhibitör geni olduğu düşünülen ORF 193R`nın “en erken” gen grubunda ifade edildiği, transkripsiyonun enfeksiyon sonrası 0-36. saatler arasında gerçekleştiği, transkripsiyon başlangıç noktasının -18. pozisyonundaki adenin (A) bazı olduğu ve genin fonksiyonel bir apoptosis inhibitör proteini kodladığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Chilo iridescent virüs*, Apoptosis inhibitörleri, RNA interferens, Fonksiyonel genomiks

## SUMMARY

### **Functional Analysis of a Putative Inhibitor Genes of Apoptosis (IAP) Encoded by *Chilo Iridescent Virus***

Programmed cell death or apoptosis is a major defense mechanism used by insects in response to viral infections. Viruses can only successfully infect the host if they inhibit this apoptosis. The genome of *Chilo iridescent virus* (CIV) has three ORFs with homology to baculovirus inhibitor of apoptosis (*iap*) genes. The proteins encoded by the 157L, 193R, and 332L genes contain 152, 208 and 234 amino acids, respectively, and shares homology to the IAP-3 protein of *Cydia pomonella* granulovirus. The protein encoded by ORF 193R contains a BIR motif (baculoviral *iap* repeat) in the amino-terminal segment and a carboxy-terminal RING finger motif. The presence of a BIR domain in a CIV open reading frame is a unique feature among *Iridoviridae*. Transcriptomic analysis of the gene by RT-PCR allowed us to determine the transcription start point and 5' UTR region of the gene. Transcription class was determined in infection of *Bombyx mori* cells in the presence of inhibitors of DNA or protein synthesis and showed that CIV *iap* is an immediate-early gene.

Transcription of the CIV *iap* gene initiated 18 nt upstream of the translational start site. When this putative CIV *iap* was transiently expressed in SPC-BM-36 and Sf21 cells under control of an early baculovirus promoter (*ie1*), it blocked apoptosis induced by actinomycin-D. RNA interference was used to knockdown the expression of 193R during CIV infection in SPC-BM-36 cells. The conclusion from these results is that CIV ORF 193R encodes a functional IAP protein.

**Key Words:** *Chilo iridescent virus*, inhibitor of apoptosis, RNA interference, Functional genomics.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1.	Tanımlanan kaspazlarının filogenetik ilişkileri ve kaspaz-3 proteininin moleküler yapısı .....	4
Şekil 1.2.	Başlatıcı kaspazların uyarılmasını sağlayan mekanizmalar.....	5
Şekil 1.3.	IAP proteinleri ve işlevsel bölgeleri .....	9
Şekil 1.4.	Op-IAP3'nin çalışma modeli. ....	11
Şekil 1.5.	Sf21 hücre hattında apoptosis mekanizması. ....	12
Şekil 1.6.	İridovirüs enfeksiyonu .....	14
Şekil 1.7.	İridovirüs ile enfekte olmuş Sf21 hücrelerinde virüsün sitoplazmik görünümü. ....	15
Şekil 1.8.	İridovirüslerde kapsid simetrisi ve virüs morfolojisi .....	15
Şekil 1.9.	İridovirüs genomunun "Terminal Redundansi" özelliği.....	16
Şekil 1.10.	Frog virüs 3 (FV3) DNA'sının replikasyon modeli .....	17
Şekil 1.11.	Model bir genin anatomik yapısı .....	18
Şekil 1.12.	İridovirüslerde transkripsiyonun modeli .....	19
Şekil 1.13.	<i>Chilo iridescent virüs</i> 'ün genom haritası.....	22
Şekil 2.1.	5` ACE analizi .....	29
Şekil 2.2.	3` ACE analizi .....	31
Şekil 2.3.	Geçici gen ifadesi vektörünün klonlanması.....	38
Şekil 2.4.	SPC-BM-36 ve Sf21 hücre hatlarının rekombinant plazmitlerle transfeksiyonu ve apoptosisin uyarılması .....	42
Şekil 2.5.	<i>In vitro</i> dsRNA üretimini sağlayan vektör .....	44
Şekil 3.1.	<i>Chilo iridescent virüs</i> 'ün <i>Bombyx mori</i> hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etkiler .....	47
Şekil 3.2.	<i>Chilo iridescent virüs</i> 'ün <i>Bombyx mori</i> hücrelerinde oluşturduğu enfeksiyonda apoptotik etkilerin DNA ladder analizi ile tespiti .....	48
Şekil 3.3.	CIVIAP proteininin işlevsel bölgelerinin bilinen bazı viral IAP proteinleriyle karşılaştırılması.....	49
Şekil 3.4.	CIV <i>iap</i> transkriplerinin RT-PCR analizi. ....	50
Şekil 3.5.	CIV <i>iap</i> transkriplerinin 5` UTR bölgesinin belirlenmesi .....	51
Şekil 3.6.	CIV <i>iap</i> geninin SPC-BM-36 ve Sf21 hücre hatlarında geçici ifadesi ve apoptosisin uyarılması.....	52

Şekil 3.7.	RNAi sisteminin SPC-BM-36 hücrelerinde etkinliğinin kontrolü .....	54
Şekil 3.8.	CIV enfeksiyonunda CIV <i>iap</i> geninin dsRNA kullanılarak susturulması ve SPC-BM-36 hücreleri üzerinde etkilerinin incelenmesi .....	56
Şekil 3.9.	CIV enfeksiyonunda CIV <i>iap</i> geninin siRNA kullanılarak susturulması ve SPC-BM-36 hücreleri üzerinde etkilerinin incelenmesi .....	57
Şekil 3.10.	CIV <i>iap</i> geninin dsRNA ile susturulmasının apoptosis sürecine etkisi .....	58
Şekil 3.11.	CIVIAP proteinin bakülovirüs sistemindeki rolü .....	59

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1.1. Bakülovirüslerde belirlenen apoptosis inhibitör genleri.....	7
Tablo 2.1. CIV muhtemel apoptosis inhibitör genleri.....	25
Tablo 2.2. CIV <i>iap</i> geninin susturulması için tasarlanan siRNA sıraları.....	46

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3`-ACE	: cDNA'nın 3` uçlarının rastgele çoğaltılması
3`-UTR	: Translasyona uğramayan 3` bölge
5`-ACE	: cDNA'nın 5` uçlarının rastgele çoğaltılması
5`-UTR	: Translasyona uğramayan 5` bölge
Act-D	: Aktinomisin D
Ara-C	: Sitozin $\beta$ -D-arabino-furanozit
cDNA	: Mesajcı ribonükleik asitten sentezlenmiş deoksiribonükleik asit
CIV	: <i>Chilo iridescent virüs</i>
Cyc	: Sikloheksimit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>dnapol</i>	: DNA polimeraz geni
DSMZ	: Alman mikroorganizma ve hücre kültür koleksiyonu
FBS	: Fetal bovine serum
FV3	: Frog virüs 3
<i>iap</i>	: apoptosis inhibitor protein geni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
ssRNA	: Tek zincirli ribonükleik asit
UV	: Ultraviyole

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Böcek virüsleri, çeşitli böceklerden izole edilmiş ve o böceklerde hastalık oluşturan veya böceklerin ölümüne sebep olan biyolojik varlıklardır. Böcek virüslerinin etkili ve hedefi sınırlı biyolojik kontrol ürünleri olarak bilinmeleri, önemli proteinlerin üretildiği gen ekspresyon vektör sistemlerini oluşturmaları, insan sağlığını tehdit eden virüslerin enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılmasında model ve gen tedavisinde gen transfer vektörü olarak kullanılmaları bilim adamlarının böcek virüslerini çalışmalarında önemli etkenler olmuştur. Özellikle günümüzde, hızla artan hastalıklara karşı kullanılacak ilaçların geliştirilmesinde, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik, viral ve fungal genlerin, virüse ait gen ekspresyon sisteminde ifade edilmesinde virüsler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Jarvis., 2003; Ikonomou ve ark., 2003; Stanbridge ve ark., 2003). Dünyanın birçok ülkesinde böcek virüsleri üzerinde yoğun biyoteknolojik araştırmalar yapılırken ve birçok biyoteknolojik ürün kullanıma sunulurken, maalesef ülkemiz bu konuda oldukça geri kalmıştır.

Apoptosis (programlanmış hücre ölümü) çok hücreli organizmalar tarafından virüs enfeksiyonlarına karşı savunma mekanizması olarak kullanılmaktadır. Apoptosis olayı sonucunda virüs tarafından enfekte edilen hücrelerin ölümü nedeniyle oluşan virüs miktarında oldukça büyük oranda bir düşüş sağlanmaktadır. Birçok virüs konak hücrelerin bu savunma mekanizmasına karşı koyabilen ve replikasyonunu garanti altına almalarını sağlayan apoptosis inhibitör genlerine (*iap*) sahiptir. Son yıllarda anti apoptotik genler üzerinde yoğunlaşan çalışmalar sayesinde, apoptosis mekanizmasının düzenlenmesinde etkili olan olayları anlamamız mümkün olmaktadır.

Bakülovirüslerde, *p35* ve *iap* (inhibitör of apoptosis) olmak üzere iki sınıf apoptosis inhibitör geni tespit edilmiştir. *p35* geninin oldukça az bakülovirüs türünde belirlenmesine rağmen, *iap* ailesine ait üyeler şu ana kadar dizi analizi gerçekleştirilen tüm bakülovirüslerde ve diğer birçok organizma gruplarında (böcekler, memeliler) belirlenmiştir. Bu genlerin belli başlı kaspazları baskıladığı ve apoptosisi durdurduğu bilinmektedir.

Apoptosis mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılan sistemlerden biri de önemli bir böcek virüsü olan bakülovirüslerin kullanıldığı mekanizmadır. Bu çalışmada gerçekleştirilen ön araştırmalar sonucunda, *Chilo iridescent virüs*'de belirlenen muhtemel apoptosis inhibitör genlerinin, bilinen ilk apoptosis inhibitör geni olan bakülovirüs *Cydia pomonella* gravülovirüs *iap* genine yüksek oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu nedenle, araştırmada fonksiyonel analizi gerçekleştirilen genin işleyiş mekanizmasını aydınlatmak için bakülovirüs *iap* genlerinin işlevsel analizlerinde kullanılan sistemler en uygun sistem olarak belirlenmiştir.

*Chilo iridescent virüs* (CIV) *Íridoviridae* familyasının *Íridovirus* cinsine ait bir böcek virüsüdür. CIV aynı zamanda “*Böcek iridescent virüs tip-6*” olarak da bilinir. Ekonomik öneme sahip böceklerde enfeksiyona neden olan CIV, *Íridovirus* cinsinin tip türüdür. CIV Japonya'da Fukaya ve Nasu (1966) tarafından bir lepidopter olan *Chilo suppressalis* (Asya pirinç deleni) böceğinden izole edilmiştir. Bu tür ülkemizde özellikle çay, pamuk ve fındıkta zarara neden olan böceklere karşı geliştirilebilir potansiyel biyokontrol ajanlarının başında gelmektedir.

## 1.2. Apoptosis

### 1.2.1. Morfoloji

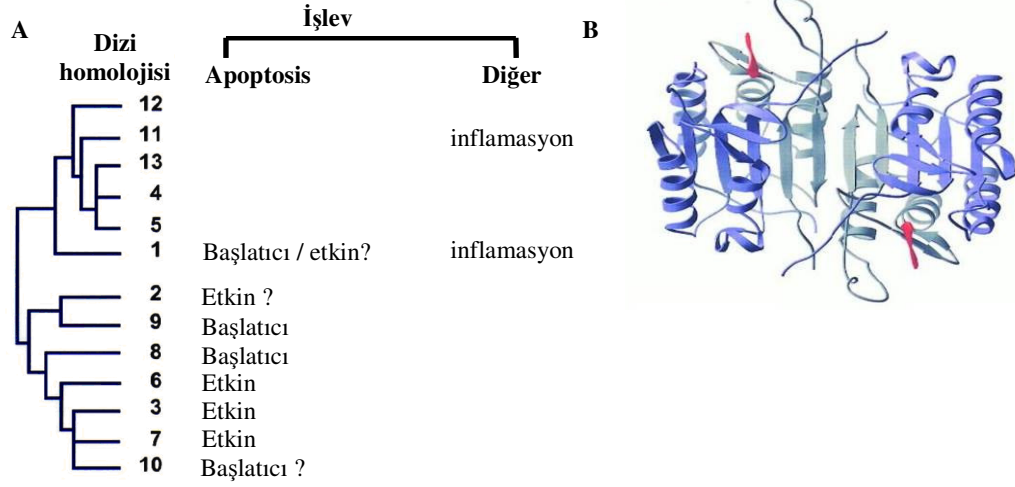
Apoptosis (programlanmış hücre ölümü) hücrenin iç veya dış sinyaller aracılığıyla ölüme yönlendiği olarak tanımlanmaktadır. Çok hücreli organizmalarda bu olay birçok fizyolojik ve patolojik olayların bir arada gerçekleşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Apoptosis'in; gelişim, doku homostazinin sağlanması ve savunma mekanizması (örneğin antiviral savunma), istenmeyen hasarlı veya hastalıklı hücrelerin dokulardan uzaklaştırılması gibi birçok farklı amaçla birçok canlı tarafından kullanıldığı belirlenmiştir (Kerr ve ark., 1972; Vaux ve Korsmeyer, 1999). Apoptosis, kromatin yoğunlaşması, fosfotidilserin birikmesi, sitoplazmada büzülme, hücre zarında gözeneklenme, kaspaz aktivasyonu, apoptotik yapıların oluşması ve fagositoz gibi bazı karakteristik morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahiptir (Walker ve ark., 1988). Hücre zarı gözeneklenmesi sürecinde, zar bütünlüğünü kaybeden organelerin yapısı değişir ve mikrovillus gibi bazı özel organel yapıları kaybolur, kromatin çekirdeğin kenarlarına doğru yoğunlaşır ve DNA endonükleazlar tarafından parçalanır, sonuçta oluşan apoptotik yapılar çekirdek zarına

yakın kısımlarda toplanır (Wyllie, 1980) ve sitoplazmik zarda gözeneklenme başlar. Sonrasında hücre, sitoplâzma, DNA parçaları ve organelleri içeren farklı boyutlardaki apoptotik yapılara parçalanır. Sonuçta bu apoptotik yapıların yüzeylerinde fagosit tanıma molekülleri üretildiği için, makrofajlar tarafından bu yapılar fagositoza uğratılır (Fadok ve ark., 1992).

### 1.2.2. Kaspazlar

DNA hasarı, konak hücre genlerinin ifadesinin durması, viral DNA replikasyonu ve translasyonu, sinyal moleküllerinin bağlanması, adezyon kaybı veya oksijen yetersizliği gibi faktörler apoptosisi teşvik edebilmektedir. Bu sinyaller hücrede oldukça karmaşık olayları başlatan sinyallerdir. Bu olaylar sonunda yukarıda açıklanan olaylar gerçekleşir ve hücre ölüme gider. Apoptosis sürecinde en önemli role sahip moleküller “CASPASE” (Cysteine Aspartate-Specific Proteases) adı verilen “Sistein Aspartat Özgün Proteaz” ailesidir (Cohen, 1997).

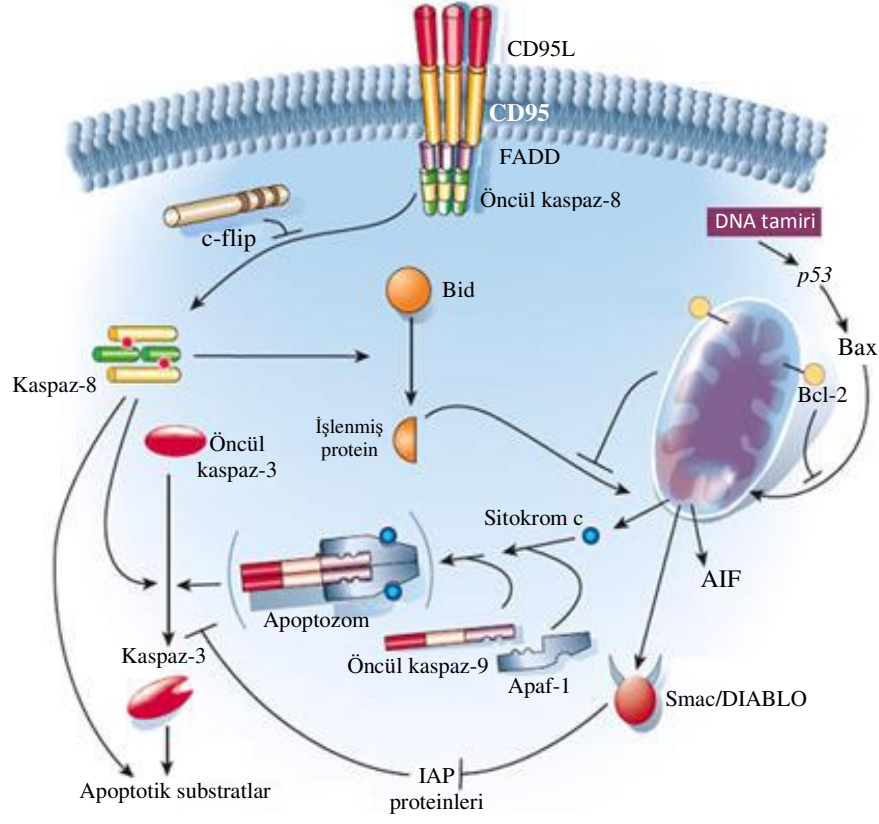
Tanımlanan ilk kaspaz, Nematod *Caenorhabditis elegans*'da hücre ölümünü yönlendirdiği belirlenen ICE'dir (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme). Bu genin memelilerde benzeri CED-3'tür (Yuan ve ark., 1993). ICE, kaspaz-1 olarak adlandırılmaktadır. Kaspaz ailesinin üyelerinin programlanmış hücre ölümünde ve enfeksiyonlarda farklı rollere sahip olduğu bilinmektedir. Şekil 1.1.A'da 13 memeli kaspazının önerilen rolleri filogenetik ağaç şeklinde, Şekil 1.1.B'de ise kaspaz-3 proteininin kristal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Tanımlanan kaspazlarının filogenetik ilişkileri ve kaspaz-3 proteininin moleküler yapısı. Kaspazlarının filogenetik ilişkileri (A). Kaspaz-3`ün kristal yapısı (B) (Thornberry ve Lazebnik, 1998).

Kaspazlar başlatıcı ve etkin kaspazlar olarak gruplandırılmaktadır. Başlatıcı kaspazların uyarılmasını sağlayan en az iki farklı mekanizma vardır. Mitokondriyal yol (içsel yol) ve reseptör bağımlı yol (dışsal yol). Bu yollar Hengartner (2000) tarafından Şekil 1.2`de gösterildiği gibi özetlenmiştir. Mitokondriyal yol hücrelerde içsel sinyallerle uyarılmaktadır. Buradaki anahtar olgu zar geçirgenliğinin düzenlenmesidir. Bax alt ailesine ait üyeler mitokondriyal zarda gözeneklerin oluşumunu teşvik eder. Bu olay normal koşullarda *Bcl2* tarafından baskılanmaktadır. Gözenek oluşumunu takiben mitokondri zarının geçirgenliği artar ve sitoplazmaya sitokrom C salınır. Sitokrom C, APAF iskelet proteini ve öncül kaspaz-9 arasında apoptozom kompleksinin oluşumunda kofaktör olarak görev yapmaktadır. Bu yapı üzerinde kaspaz-9`un multimerizasyonu, kaspaz-9`dan öncül işlevsel bölgenin ayrılması ve kaspaz-9`un aktivasyonuna sebep olur.





Şekil 1.2. Başlatıcı kaspazların uyarılmasını sağlayan mekanizmalar (Hengartner, 2000).

Reseptörle bağımlı yol apoptosis sürecini daha etkili bir şekilde teşvik etmektedir. Hücre dışı sinyaller uygun reseptör tarafından alınarak hücre içerisinde ilgili bölgelerde yapısal ve biyokimyasal değişikliklere sebep olur. Adaptör molekül bu yeni yapıya bağlanır ve öncül kaspaz-8 (veya 10) trimerizasyonunu teşvik ederek, kendi kendine parçalanma ve aktivasyon teşvik edilir. Bu aşamadan sonra etkin kaspaz teşvik (mitokondri hedeflenmektedir) edilir. BID proteininin parçalanmasıyla BAX alt ailesine ait üyeler uyarılır ve mitokondri geçirgenliğinin artışı sağlanır. Başlatıcı kaspazların uyarılmasıyla kaspaz-3, 6 ve 7 gibi etkin kaspazların aktivasyonu gerçekleşir. Bu olaylar birçok farklı yolla apoptosisin gerçekleşmesini sağlar. Bu olayda birçok düzenleyici faktör yer alırken hücredeki işlevleri henüz netlik kazanmamıştır. Yukarıda açıklanan yollar dışında farklı yollarında bulunduğu düşünülmektedir.

### 1.2.3. Virüslerin Apoptosise Karşı Geliştirdiği Mekanizmalar

Virüsler hücre içi parazitler olduklarından kendi replikasyonlarını sürdürebilmeleri için, hücreleri istila etmek zorundadırlar. Apoptosis, virüs istilasını sınırlandırmak ve viral replikasyonu engellemek için konak hücrenin geliştirdiği yollardan biridir. Viral enfeksiyonların çoğu, konak hücrenin virüs replikasyonunu engellemek için oluşturduğu apoptosis mekanizmasını teşvik etmektedir (Hay ve Kannourakis, 2002). Virüslerde de apoptotik yolları baskılayan ürünleri sentezleyen genler bulunmaktadır. Bu durum özellikle, herpes virüs, poksvirüs veya bakülovirüsler gibi büyük genomu sahip virüslerde karşılaşılan bir olgudur.

Kovpoksvirüs tarafından kodlanan CrmA (The cytokine response modifier A), tanımlanan ilk kaspaz inhibitörüdür (Ray ve ark., 1992). CrmA, kaspaz-1 ve 8'i baskılayarak hem apoptotik hem de enfeksiyon yollarını durdurmaktadır. Vaccinia virüs de SPI-2 geni (Dobbelstein ve Shenk, 1996) ve herpes virüs de MHV68 proteinin (Virgin ve ark., 1997) CrmA homologu olduğu belirlenmiştir. Herpes simpleks virüs US3 proteininin kaspaz-3 aktivasyonunu Bcl-2 ailesine ait üyeleri baskılayarak durdurduğu belirlenmiştir (Leopardi ve ark., 1997; Jerome, ve ark., 1999; Cartier ve ark., 2003). Ayrıca karideste enfeksiyon yapan WSSV`de (Wild Spot Syndrome Virus) apoptosis inhibitör geni (ORF390) belirlenmiştir (Wang ve ark., 2004).

Bakülovirüslerde apoptosisi baskılayan *p35* ve *iap* (inhibitor of apoptosis) genleri belirlenmiştir (Tablo 1.1). *p35* geninin birçok kaspaz mekanizmasına, *iap* genlerinin ise hücre döngüsüne ve sitokinez mekanizmasına doğrudan etkili olarak apoptosis sürecini baskıladığı belirlenmiştir (Clem, 2001). Bakülovirüslerde, *iap* gen ürünlerinin viral enfeksiyon geçiren konak hücrelerin ölümünü engellediği belirlenmiştir (Quinn, 1999).

Anti apoptotik genler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, apoptosis yolları ve düzenlenmesinin anlaşılmasında oldukça faydalı bilgiler elde edilmesini sağlamıştır. Bakülovirüslerin, apoptosisin aydınlatılmasında ideal bir sistem olduğu belirlenmiştir (Clem, 2001).

Tablo 1.1. Bakülovirüslerde belirlenen apoptosis inhibitör genleri (Hay ve Kannourakis 2002).

İnhibitör protein	Etki mekanizması	Apoptotik Sinyal	Kaynaklar
P35	Kaspaz inhibisyonu 1, 3, 6, 8 veya 10	Staurosporin ve hücre dışı potasyum	Bertin ve ark. (1996) Clem ve ark. (1991) Viswanath ve ark. (2000) Zhou ve ark. (1998)
IAP	Oksidatif stres ile teşvik edilen apoptosisi inhibe eder	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sah ve ark. (1999)
	Kaspaz inhibisyonu 3, 6 ve 7	Aktinomisin D	Crook ve ark. (1993) Deveraux ve ark. (1999)

### 1.3. Bakülovirüsler ve Apoptosis İnhibitör Genleri

Bakülovirüsler, 25 x 250 nm büyüklüğünde olup, 90-200 kbp, halkasal-kapalı, çift zincir, süper sarmal DNA ihtiva ederler (Arif, 1986). Virüs DNA'sı, hücre zarı benzeri ve karmaşık yapıya sahip bir zarf tarafından çevrili nükleokapsid içine paketlenmiştir (Fraser, 1987). Bakülovirüsler, genellikle eklembacaklılar grubunda çoğunlukla Lepidoptera ordosuna dahil böcekleri enfekte eder. Hücre içi virüsler, polihedra veya granüla olarak adlandırılan proteinsi yapılar içerisine gömülürler (Blissard ve Rohrmann, 1990). Bakülovirüs familyası, inklüzyon yapıların şekillerine göre Nükleopolihedrovirüs (NPV) ve Granülosis virüs (GV) olmak üzere iki alt cinse ayrılır. Ayrıca filogenetik analizler sonucunda diptera NPV olarak yeni bir grup önerilmektedir (Alfonso ve ark., 2001; Blissard ve ark., 2000) (Ek-Şekil 1).

Bakülovirüslerin konak seçiciliğinin yüksek olması ve konağı öldürücü etkisi nedeniyle zararlı böcek türleriyle mücadelede sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Örnek; pamuk üretiminde zararlılara karşı, Sun, 2005). Ayrıca bakülovirüs gen ifadesi sistemleri ökaryotik proteinlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve ark., 1983). Bakülovirüslerin konak hücrelerdeki apoptosis mekanizmasını kontrol eden (baskılayan) genlere sahip olduğu ilk olarak Clem ve arkadaşları tarafından (1991) ortaya konulmuştur. Bu virüslerin biyolojilerinin ve anti apoptotik genlerinin işlevleri üzerine yapılan çalışmalar, apoptosis mekanizmasının aydınlatılmasına büyük katkılar sağlayacaktır.

### 1.3.1. P35

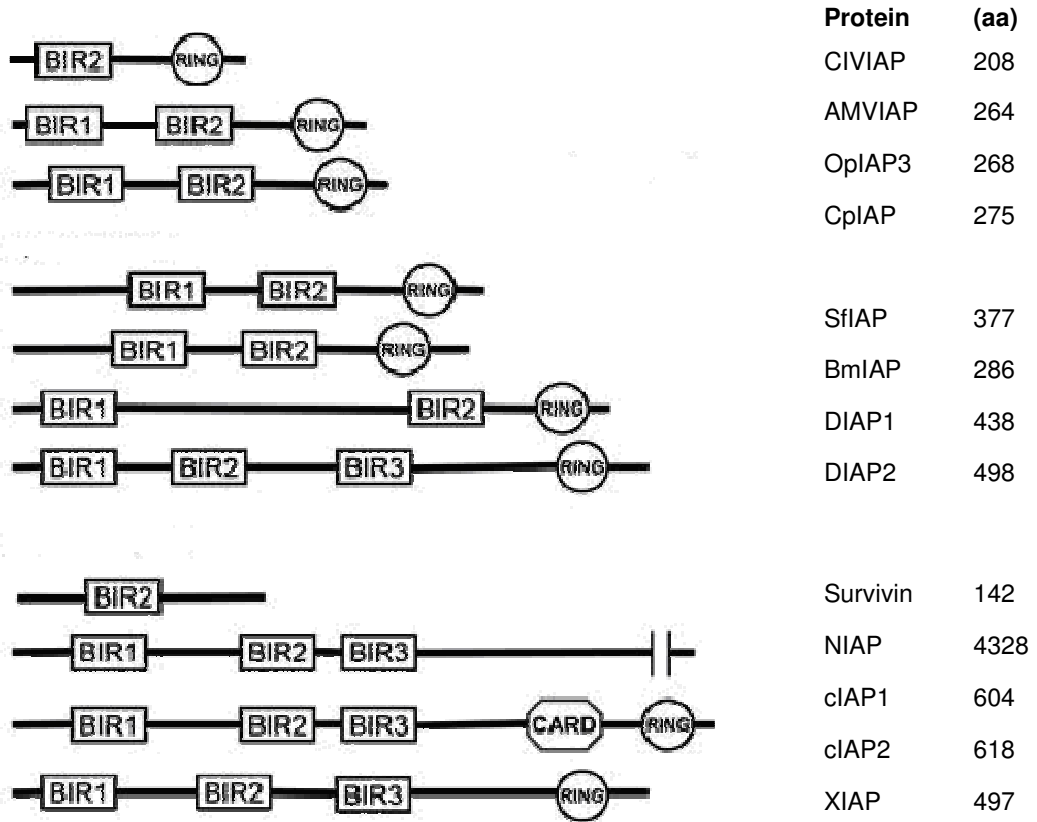
1987 yılında ilk *p35* geni *Autographa californica* multikapsit nükleopolihedrovirüs de (AcMNPV) bulunmuştur. Bu gene ait transkriptler enfeksiyondan iki saat sonra (en erken gen; IE geni) tespit edilebilmektedir. Bu gen 35 kDa büyüklüğünde bir polipeptidi kodlamaktadır (Friesen ve Miller, 1987). Birkaç yıl sonra da *p35* geninin güçlü bir kaspaz inhibitörü proteini kodladığı belirlenmiştir (Clem ve ark., 1991). Sadece çok az bakülovirüste tespit edilen *p35* gen ürününün şu ana kadar herhangi bir hücresel homologu belirlenmemiştir ve oldukça az sayıda bakülovirüste bu gen tespit edilmiştir. AcMNPV gibi BmNPV ve SpliNPV'nin de *p35* gen ürünü homologlarını bulundurduğu tespit edilmiştir. P35, substrat kompetitorü olarak doğrudan kaspazları baskılayabilmektedir. P35 proteinleri kaspazlar ile kararlı kompleks yapılar oluşturarak baskılayıcı etkilerini göstermektedir (Bump ve ark., 1995). P35, kaspazların özgün bir inhibitörüdür. Diğer proteazlar üzerinde inhibisyon etkisi gözlenmez. P35 proteininin, kaspaz-1, 3, 7, 8 ve 10 ile *in vitro* olarak etkileştiği tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 1997). Bu sonuç P35 proteininin farklı organizmalarda apoptosisi etkin bir şekilde nasıl baskılayabildiğinin en iyi ispatlarından biri olmuştur. Günümüzdeki genel kanaat böcek hücrelerinde P35 proteininin etkin kaspazların aktivasyonunu baskıladığı yönündedir.

### 1.3.2. IAP

*iap* geni (inhibitor of apoptosis) Crook ve arkadaşları (1993) tarafından bakülovirüs familyasından *Cydia pomonella* granülovirüsde (CpGV) keşfedilmiştir. Günümüzde *iap* gen ailesi dizi benzerlikleri dikkate alınarak beş sınıf (*iap1-5*) altında incelenmektedir (Maguire ve ark., 2000 ve Luque ve ark., 2001) (Ek-Şekil 2). *p35* geninden farklı olarak *iap* geni şu ana kadar dizi analizi yapılan hemen hemen tüm bakülovirüslerde belirlenmiştir. *iap* geninin hücresel homologları bazı böcekler ve memelilerde de belirlenmiştir. Bu bulgu viral *iap* genlerinin, virüslere konaklarından gelmiş olabileceğini göstermektedir.

IAP, metalloprotein yapıdadır. Amino (N) ucunda bulunan bakülovirüs IAP tekrarı (BIR) ve karboksi (C) ucundaki RING bölgesinin varlığıyla tanımlanmaktadır. Bu bölgelerin varlığının apoptosisin baskılanmasında etkili olduğu belirlenmiştir (Birnbbaum et al., 1994). BIR işlevsel bölgesi (domain) yaklaşık 40 aminoasitlik, çinko

parmak gibi bazı yüksek oranda korunmuş dizileri bulunduran bir bölgedir, RING parmak motifi ( $C_3HC_4$  parmak motifi) içerdiği korunmuş sistein ve histidin dizilerine bağlı olarak yaklaşık 35 amino asitten oluşmaktadır. Şekil 1.3`de bazı viral ve memeli IAP proteinleri gösterilmektedir. Viral IAP proteinlerinin çoğu iki BIR işlevsel bölgesi ve bir RING parmak işlevsel bölgesine sahipken memeli IAP proteinlerinde üç BIR işlevsel bölgesi ve bir RING parmak işlevsel bölgesi bulunmaktadır (Deveraux ve Reed, 1999). Bu proteinlerde ayrıca CARD işlevsel bölgesi gibi bazı bölgelerde bulunmaktadır (CARD = caspase-recruitment domain).

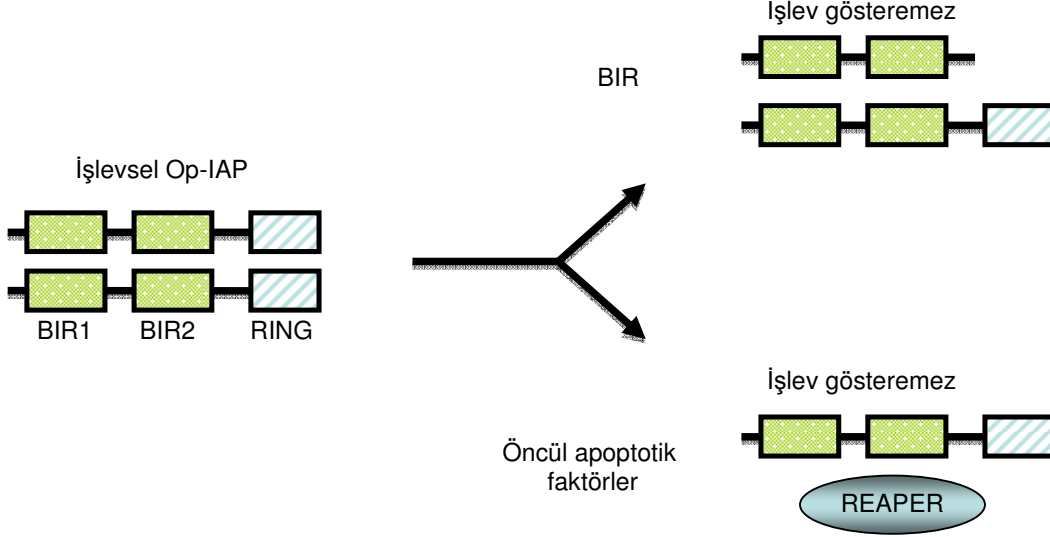


Şekil 1.3. IAP proteinleri ve işlevsel bölgeleri. Baküloviral IAP Tekrarı (BIR), RING ve CARD işlevsel bölgeleri gösterilmektedir. IAP proteinlerini kodlayan genlerin bulunduğu organizmalar: CIVIAP: *Chilo iridescent virüs*. OpIAP: *Orgyia pseudotsugata* MNPV. CpIAP: *Cydia pomonella* GV. AcIAP: *Autographa californica* MNPV. XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Survivin: insan, DpIAP1 ve 2: *Drosophila*, SfiAP: *Spodoptera frugiperda*, BmIAP: *Bombyx mori*

BIR ve RING motifleri IAP proteinlerinin çok çeşitli proteinlere bağlanmasını sağlar. Bu proteinler arasında tümör nekrozis sinyal kompleksine ait bileşenler, kaspazlar ve diğer öncül ölümcül proteinler bulunmaktadır. Hücrel IAP proteinlerinin işlevinin yukarı bölgede kaspaz-9 ve aşağı bölgede kaspaz-3, 6 ve 7 baskılaması olduğu ve apoptosis sürecinin ortaya çıkması için Smac/DIABLO gibi ön-ölümcül proteinler tarafından kontrol edilmesinin gerektiği bilinmektedir (Şekil 1.2). Farklı IAP proteinlerinin farklı hedef proteinler üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle IAP ailesine ait proteinlerin farklı görevleri bulunmaktadır. Viral IAP (P35 hariç) proteinleri çoğunlukla özgündür. Örneğin, bazı durumlarda bir hücre hattında apoptosisi baskılayan bir IAP proteini diğer bir hücre hattında etkinlik gösterememektedir. Bu özgünlük BIR ve RING işlevsel bölgelerindeki küçük varyasyonların IAP proteininin doğru hedef protein üzerine etkili olup olamayacağını belirleyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca tüm IAP proteinlerinin işlevsel olmadığı günümüzde bilinmektedir. Örneğin; Ac-IAP1, Bruce, pIAP (Şekil 1.3), bakülovirüslerde şu ana kadar tespit edilen IAP4 ve IAP5 genleri, nematod ve mayalardaki IAP genlerinin apoptosisi baskılama etkisi olup olmadığı mevcut tekniklerle belirlenememiştir. Bir virüste birden fazla *iap* geni bulunabilmektedir. Bu genlerinin tümü apoptosiz sürecinin baskılanmasında etkin olması gerekli değildir. Bazı IAP proteinlerinin enfeksiyonda apoptosiz baskılanması dışında da bazı işlevsel rolleri bulunduğu ileri sürülmektedir. Hücrel IAP proteinlerinin hücre bölünmesinin kontrolü ve birçok sinyal yolunda üstlendiği görevlerin belirlenmesi bu öneriyi desteklemiştir (Salvesen ve Duckett, 2002). Bu yüzden IAP proteinleri bazı kaynaklarda BIRP olarak belirtilmektedir (BIR-containing Proteins).

En detaylı çalışılmış olan viral IAP proteini *Orgyia pseudosugata* NPV IAP proteini (OpIAP3) (Seshagiri ve Miller 1997). OpIAP3 öncül kaspaz aktivasyonunu baskılar. Bu özelliğiyle doğrudan kaspaz inhibitörü olan P35 proteininden farklılık göstermektedir. OpIAP3 geninin işlevsel gen bölgelerini oluşturan parçalarla (BIR, RING) gerçekleştirilen deneyler sonucunda (Truncation Experiment) BIR işlevsel bölgesinin yabancı tip OpIAP3`ün apoptosiz baskılama kapasitesinde etkili olabileceği, RING parmak işlevsel bölgesinin ise etkili olmadığı belirlenmiştir (Hozak ve ark., 2000). Bu sonuç BIR ile yönlendirilen oligomerizasyonun OpIAP3 işlevinde etkili olduğunu hipotezini ortaya çıkarmıştır (Şekil 1.4). Bazı pro-apoptotik faktörlerin (*Drosophila*, Reaper ve Hid gibi) hücrel IAP proteinleriyle etkileşerek inaktif bir yapı oluşturabileceği düşünülmektedir. Viral IAP proteinlerinin enfeksiyon sırasında aşırı ifadesi öncül apoptotik faktörlerin

üstesinden gelerek hücrenin hayatta kalma sürecini uzatmaktadır. Bu modelde öncül-ölümcül proteinler hücresel IAP'ların anti kaspaz aktivitesini ortaya çıkarmasını engelleyerek işlev yaptığını göstermektedir. Kaspaz inaktivasyonunda etkili olan mekanizma halen aydınlatılamamıştır. Fakat BIR ile yönlendirilen oligomerizasyonun gerekli olduğu düşünülmektedir.



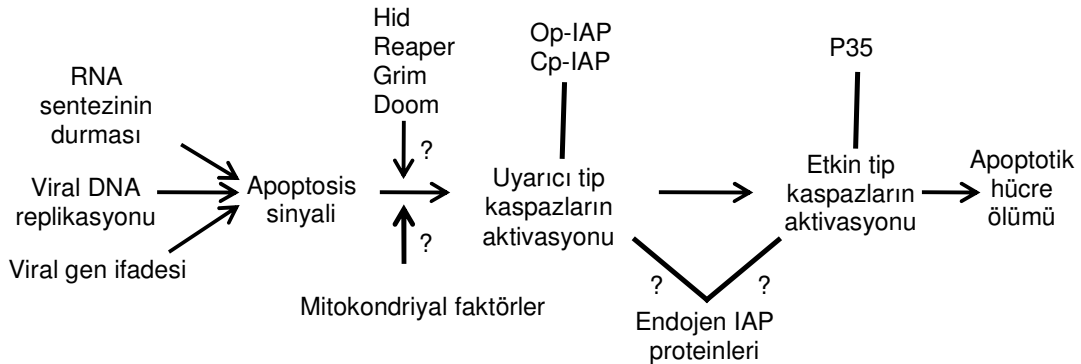
Şekil 1.4. OpIAP3'ün çalışma modeli. BIR işlevsel protein bölgesi iki IAP proteinin dimer oluşturarak öncül kaspazlara yönelmesini sağlar. Öncül apoptotik faktörler BIR işlevsel protein bölgesine bağlanarak hücresel IAP proteinlerinin fonksiyonlarını gerçekleştirmelerini engelleyebilir. Yüksek düzeyde üretildiği zaman, viral IAP proteinleri bu öncül apoptotik faktörlerden miktar olarak fazla olacağı için bu sayede apoptosis baskılanabilmektedir (Hozak ve ark., 2000).

Green ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmalar Op-IAP3'ün işlevsel bir E3 ubiquitin ligaz olduğunu göstermiştir. Bu işlev için RING parmak işlevsel bölgesine ihtiyaç duyulmaktadır. Aşırı ifade olmuş öncül apoptotik *Drosophila* HID proteinin ubiquitinasyonu, degradasyonunda gerekli olmamasına rağmen HID'in inaktivasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca Op-IAP3'ün kendi kendine ubiquitinasyon aktivitesine sahip olduğu belirlenmiş fakat işlevi aydınlatılamamıştır (Green ve ark., 2004).

#### 1.4. Böcek Hücrelerinde Apoptotik Kontrol

Hücrede çeşitli sinyaller apoptosisi teşvik edebilir. Yalnızca virüsün hücreye bağlanması yeterli bir sinyal değildir. Çünkü klorokuine ile virüs girişinin baskılanması apoptosisi engellemektedir (LaCount ve Friesen, 1997). Afidikolin ile muamele edilen hücrelerde  $\Delta p35$ -AcMNPV ile apoptosiz gözlenmemektedir. Afidikolin, konak hücrede RNA sentezi, viral DNA replikasyonu ve geç genlerin ifadesinin baskılanmasını engeller (Clem ve Miller, 1994). Viral enfeksiyon sonucu ortaya çıkan apoptotik sinyalin, konak hücrede transkripsiyon ve translasyonunun, viral DNA replikasyonunun ve ya geç genlerin ifadesinin durmasının veya bu olayların birlikte meydana gelmesiyle ortaya çıktığını göstermektedir. Şekil 1.5'de *Spodoptera frugiperda* Sf21 hücre hattında apoptosiz düzenlenmesi gösterilmektedir. *Drosophila* Hid, Reaper ve Grim homologları gibi düzenleyici faktörler ve Bcl2 ailesine ait mitokondriyal faktörlerin apoptosiz kontrolündeki rolleri henüz net olarak anlaşılamamıştır.

Bazı öncül ölümcül proteinlerle içsel kaspaz baskılayıcılarının etkileşimi (IAP gibi) kaspaz reaksiyonlarının başlayıp başlamayacağını tayin ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle bu etkileşimler üzerinde araştırmalar halen devam etmektedir. Viral IAP proteinlerinin uyarıcı kaspazların aktivasyonunu baskılayarak işlev gösterdiği düşünülmektedir. P35'in ise doğrudan birçok etkin kaspazı baskılayarak işlev gösterdiği düşünülmektedir.



Şekil 1.5. Sf21 hücre hattında apoptosiz mekanizması. Bazı viral uyarıcılar kaspazları uyarabilir bu da etkin kaspazların aktivasyonunu sağlar. P35'in etkin kaspazları baskılamasında etkili olurken, IAP proteinleri uyarıcı kaspazların aktivasyonunu baskılamaktadır. Endojen IAP proteinlerinin işlevleri ise henüz aydınlatılamamıştır (Clem, 2001).



## 1.5. İridovirüsler

### 1.5.1. 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 epidermisin hemen altında parlak mavi bir renk olduğunu gözlemiştir. Rivers bu larvalardan bol miktarda toplayarak Nick Xeros adlı başka bir araştırmacıya vermiş ve Xeros bu larvalardan ilk iridovirüsü (*Tipula paludosa* iridovirus; IV1) izole etmiştir. Böylece, Xeros tarafından 1954 yılında iridovirüsler ile ilgili ilk yayın Nature dergisinde “*Tipula paludosa* larvasında ikinci bir virüs hastalığı” başlığı ile gerçekleştirilmiştir (Xeros, 1954). 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 zararlıların bulunması, bu virüslerin potansiyel biyolojik kontrol materyalleri olarak kullanılacaklarını düşündürmüştür. Ayrıca iridovirüsler, çoğunluğunun böcek larvalarında yüksek oranda üretilibilmeleri ve birçok izolatında hücre kültürüne uygulanabilir olması bakımından laboratuvar çalışmaları açısından da birçok avantaja sahiptirler.

### 1.5.2. İridovirüslerin Sistematığı

*İridoviridae* familyası, çok sayıda omurgalı ve omurgasız konaklardan izole edilen, konak sitoplazmasında replike olan, “ikozahedral” yapılı ve çift zincir DNA genomlu virüslerden oluşan bir familya olarak 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 ve ark., 2000) (Ek-Tablo 1; Ek-Şekil 3). Omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar *Iridovirus* (Örnek tür: *Chilo iridescent virüs*) ve *Chloriridovirus* (örnek tür: *Mosquito iridescent virüs*) cinsleri altında gruplandırılmıştır. 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 vardır. 8 türün izole edildiği izopodlar ve dafnitler başlıcalarıdır. Omurgalıları enfekte eden izolatlarda *Lymphocystivirus* (örnek tür: Flounder virüs) ve *Ranavirus* (örnek tür: Frog virüs 3) cinsleri altında gruplandırılmıştır. İridovirüsler ile ilgili çalışmaların çoğunluğu Frog virüs 3 (FV3) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

### 1.5.3. *İridoviridae* Familyasının Özellikleri

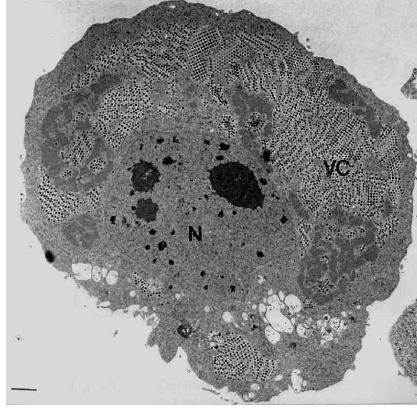
*İridoviridae* kelimesi bu familyaya ait, omurgasız konaklardan izole edilen virüslerin çoğunluğunun ağır olarak enfekte ettikleri böceklerde oluşturdukları mavi-yeşil karışımı renk dolayısı ile kullanılmıştır. Bu virüsler ile ağır olarak enfekte olmuş böceklerde mavi-yeşil karışımı, ışık vurdukça parlayan 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 söz konusu değildir (Williams, 1996).

Şekil 1.6 A`da CIV enfeksiyonu sonucunda son barsak bölgesinin maviye dönüşmüş *Costelytra zealandica* larvası görülmektedir. Bu çalışma sırasında da ağır *Chilo iridescent virüs* enfeksiyonu nedeni ile tüm vücudu mavi-yeşil renge dönüşmüş *Galleria mellonella* larvasında bu durum gözlemlendi (Şekil 1.6 B). 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 beyazlaşmaktadır.



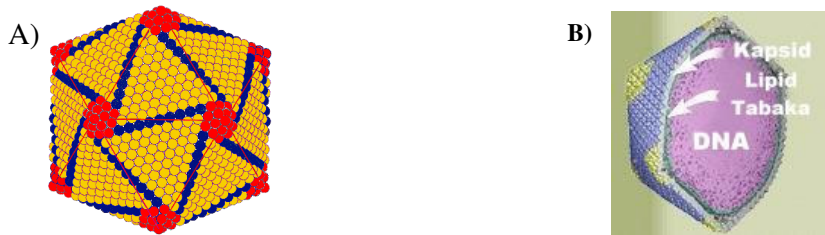
Şekil 1.6. İridovirüs enfeksiyonu. (A) *Costelytra zealandica* larvasında son bağırsak bölgesi maviye dönüşmüş. (B) *Galleria mellonella* ağır enfeksiyonun sebep olduğu mavi-yeşil vücut rengi

İridovirüslerde viriyon çapı 120-300 nm arasında değişmektedir. Bununla birlikte, viriyon çapı 350 nm'ye ulaşanlar da mevcuttur. İridovirüsler nükleopolihedrovirüsler (NPVs), granulo virüsler (GVs), sitoplazmik polihedrovirüsler (CPVs) ve entomopoksvirüsler den (EPVs) farklı olarak koruyucu bir protein matriks içine gömülü değildir (Williams, 1998). Viriyonu oluşturan yapıların birleşme işlemi konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir ve yeni virüsler hücrenin sitoplazmasında toplanır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. İridovirüs ile enfekte olmuş Sf21 hücrelerinde virüsün sitoplazmik görünümü. N: Nükleus, VC: Virojenik stroma (URL-1, 2003).

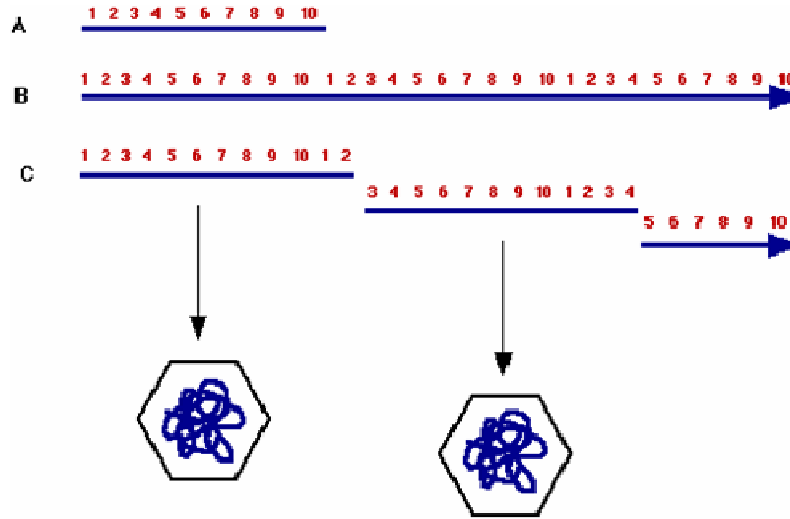
İridovirüsler ikozahedral simetriye sahiptir ve virüsün yapısını sırası ile en içte proteinler ile kompleks oluşturmuş DNA, bunları çevreleyen yaklaşık 4 nm kalınlığında lipid tabaka ve bu tabakayı da çevreleyen protein yapıdaki kapsid tabakası oluşturmaktadır (Şekil 1.8). Kapsid proteini 50 kDa civarında 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 1.8. İridovirüslerde kapsid simetrisi ve morfolojisi. a) kapsid simetrisi, b) ayrıntılı yapı (URL-2, 2000).

### 1.5.4. İridovirüslerde Genom Özellikleri

İridovirüsler 140-303 kbp büyüklüğünde lineer çift zincirli DNA genomuna sahiptirler (Van Regenmortel ve ark., 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 1.9). Bu özellik ökaryotik virüsler arasında sadece iridovirüslerde mevcuttur. Replikasyon sırasında viral DNA'nın kopyaları (A) ebeveyn 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. Bu duruma "uç kısımların tekrarı (terminal redundansi)" adı verilir. 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 ve ark., 1991). Omurgasız iridovirüslerde ise bu durum mevcut değildir.

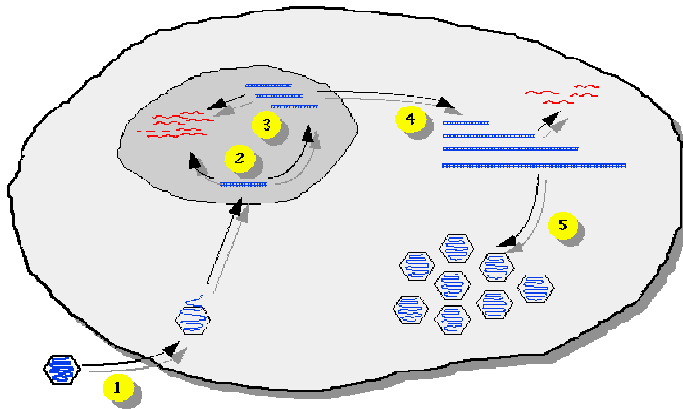


Şekil 1.9. İridovirüs genomunun "Terminal Redundansi" özelliği (URL-1, 2003).

### 1.5.5. 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 (Poksvirüs) 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 mikroskobu 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 ve ark., 1977).

FV3 DNA'sı için replikasyon modeli Şekil 1.10'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu şekile 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 polimeraz II'sini kullanarak transkripsiyon başlatılmaktadır. Ebeveyn DNA kullanılarak virüs DNA'sının kopyası oluşturulur (2, 3). Yeni oluşan DNA sitoplazmaya geçer ve sitoplazmada konkatamer oluşumu gerçekleşir (4). Oluşan konkatamerler virüs kapsid içerisine paketlenir (5). Viriyonların hücreden ayrılması ise tomurcuklanma yöntemi ile veya hücrenin parçalanması ile gerçekleşir.

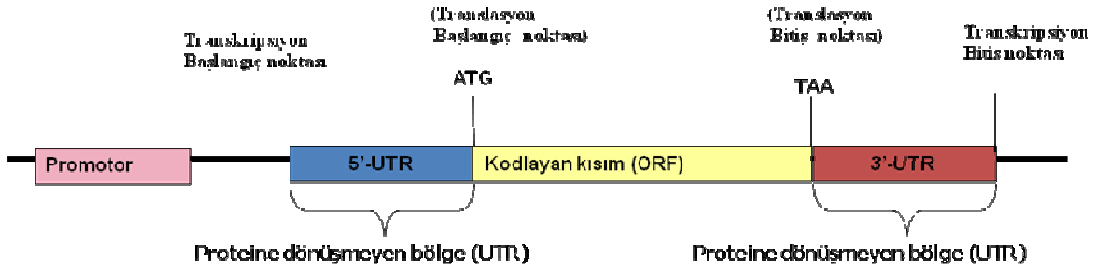


Şekil 1.10. Frog virüs 3 (FV3) DNA'sının replikasyon modeli (URL-1, 2003).

### 1.5.6. 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 yukarı ve aşağı kısımlarında translasyona uğramayan bölgeler (5'-UTR, 3'-UTR) ve translasyon başlangıç noktası olan ATG'nin yukarısında da promotor bölgesi bulunur (Şekil 1.11).

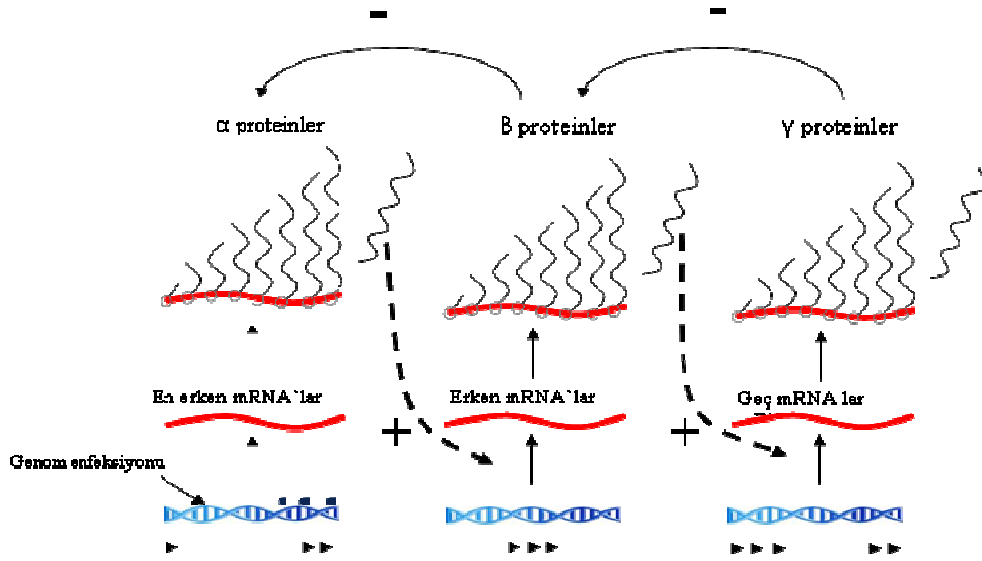
Gen ifadesi, genlerin oluşturduğu genetik bilginin DNA'dan RNA moleküllerine ve daha sonra RNA moleküllerinden protein moleküllerine aktarılması ile başlar. Tek bir DNA zincirinin bir kısmının kalıp olarak kullanılarak RNA polimeraz enziminin polimerizasyonu sonucu RNA molekülleri sentezlenir. RNA zincirinin sentezinin başlaması, zincirin uzaması ve zincir sentezinin sona ermesi olaylarının hepsine birden "transkripsiyon" denilir.



Şekil 1.11. 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 Poksvirüsler gibi kendi RNA polimerazlarına sahip oldukları düşünülmekteydi. Ancak daha sonra FV3 replikasyonunun, konak hücrenin nükleusunun varlığına bağlı olduğu görüldü (Goorha ve ark., 1978). Replikasyonun ikinci aşamasında gerekli olan proteinlerin ilk aşamada sentezlenmesi (Goorha ve ark., 1977), konak polimeraz II'nin viral transkripsiyonun erken safhalarında rol oynadığını göstermektedir (Goorha ve ark., 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 1.12). Her sınıfın ürünleri bir sonraki sınıfın ürünlerini önemli bir şekilde etkilemektedir. En erken ve erken grubu genler DNA sentezinden önce sentezlenir. Fakat en erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duymaz iken, erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duyar. Geç grubu genler ise hem protein sentezine hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duyar.



Şekil 1.12. İridovirüslerde transkripsiyonun modeli (URL-1, 2003).

Saflaştırılmış FV3 DNA'sı hücreye verildiğinde enfeksiyonu başlatamamaktadır. Ancak viriyon bileşenlerinin saflaştırılmış viral DNA ile birlikte hücreye verilmesi durumunda enfeksiyonun oluşması, virüsün replikasyonu için viriyona ait bir bileşenin olması gerektiğini göstermektedir (Willis ve Granoff, 1985). UV veya sıcaklık ile inaktive olmuş virüslerin hücrelerde enfeksiyona neden olmadıkları ancak her ikisinin birlikte hücreye verilmeleri durumunda enfeksiyon oluşturabildikleri görülmüştür. Bu durumda yine UV ile inaktive olmuş virüs partikülünün, sıcaklık ile inaktive olmuş virüsteki DNA'yı aktive etmek için gerekli olan polipeptidleri sağladığını düşündürmektedir. FV3 viriyon yapısı içerisinde DNA bağımlı RNA polimeraza sahip değildir. Dolayısıyla konak RNA polimeraz II si viral RNA'nın transkripsiyonu için gereklidir (Goorha ve ark., 1978; Goorha, 1979).

Çoğu iridovirüs mRNA'ları poli A kuyruğuna sahip değildir. Şimdiye kadar poli A kuyruğu sadece, TIV'ın 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 ve ark., 1994; Bahr ve ark., 1997; Tidona ve Darai, 1997).

Çoğu ökaryotik virüslerden farklı olarak FV3 genomu yüksek oranda metillenmiştir. Nükleusta oluşan yeni DNA metillenmez. Metilasyon DNA'nın sitoplazmaya geçişinden sonra viral DNA metil transferaz tarafından gerçekleştirilir (Willis ve ark., 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*, *Asfaviridae* ve *Iridoviridae* familyaları büyük sitoplazmik DNA virüsleri olmalarına rağmen replikasyon ve transkripsiyon stratejileri bakımından farklılık gösterir. Poksvirüsler tamamıyla sitoplazmada replike olurken ASFV ve iridovirüslerde ilk olarak nükleusta gerçekleşen bir viral DNA replikasyon safhasının olduğu gösterilmiştir. Poksvirüslerin 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.

### 1.5.7. 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 iridovirüs partikülü *Tipula oleraceae* larvasında  $2.5 \times 10^{12}$  (IV1), *Galleria mellonella* pupasında  $2 \times 10^{12}$  (IV2) virüs partikülü oluşturduğu tahmin edilmektedir (Carter, 1973; Day ve Mercer, 1964).



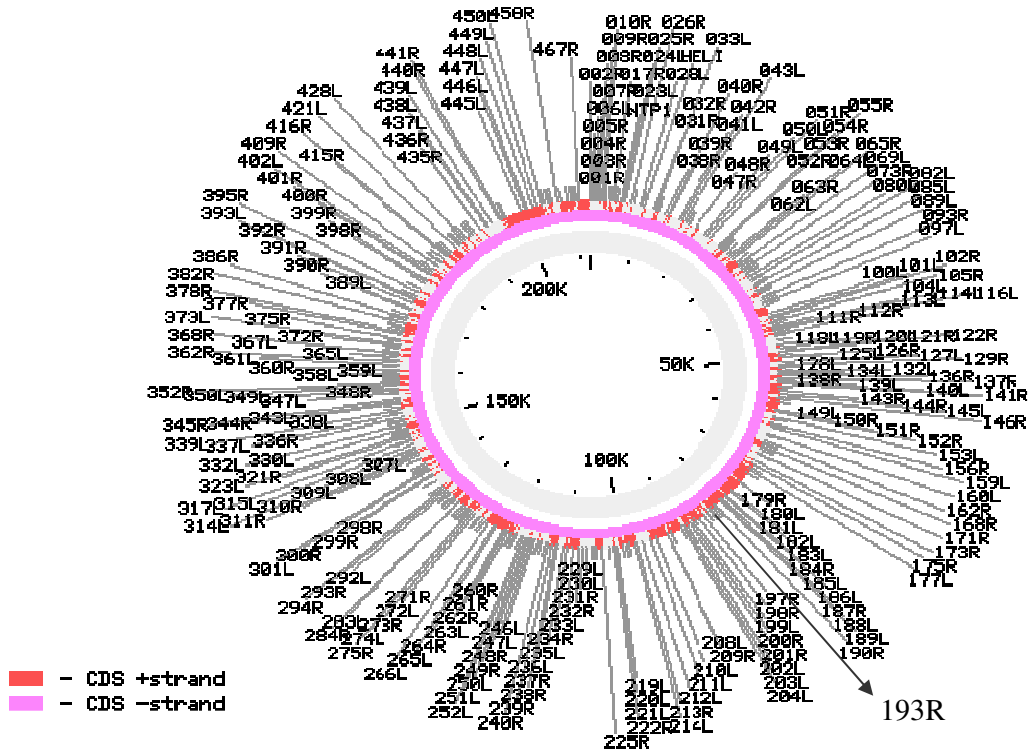
İridovirüslerin sayımı, plak deneyi, bioassayler, elektron mikroskobu ile doğrudan sayım, optik yoğunluk ve enzim bağlı immünosorbent deneyleri (ELISA) ile yapılabilmektedir. 260 nm`deki 1 absorbans değeri  $10^5$  plak oluşturan ünite değerine karşılık gelmektedir (Williams, 1998).

### 1.5.8. *Chilo Iridescent Virüs (CIV)*

*Chilo iridescent virüs (CIV)* İridoviridae familyasının İridovirus cinsine ait bir böcek virüsüdür. CIV aynı zamanda “*Böcek iridescent virüs tip-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 ve ark., 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 ve ark., 1999; Hernandez ve ark., 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; lahana kurdu) bulunmaktadır. CIV`nin replikasyonunun tespit edildiği çok çeşitli hücre kültürleri mevcuttur (Constantino, ve ark., 2001). Bunlar *Choristoneura fumiferana*, *Drosophila melanogaster*, *Pierris rapae*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatilis*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella* ve *Aedes albopictus* hücreleridir. Fakat virüsün üretimi için hücre kültürleri tercih edilmemektedir. Bunun nedeni CIV`nin üretimi için verimli hücre kültürleri olmamaları nedeniyle.

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 ve ark., 1984; Schnitzler ve ark., 1987; Fischer ve ark., 1990). Şimdiye kadar CIV ile ilgili viriyon yapısı, viral proteinlerin enzimatik aktiviteleri (Cerutti ve Devauchelle, 1980; Cerutti ve ark., 1981), 6

adet replikasyon orijininin pozisyonu ve genomdaki tekrar eden DNA elementlerinin varlığı (Fischer ve ark., 1988; Handerman ve ark., 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 ve ark., 1993; Tidona ve ark., 1998; Müller ve ark., 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 yapılan bir çalışmada 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 genin kodlandığı tespit edilmiştir (Şekil 1.13, Ek-Şekil 4). Son zamanlarda yayınlanan çalışmaların ilkinde CIV viriyon özütünün hücre kültüründe apoptosisi teşvik ettiği belirlenmiştir (Paul ve ark., 2007). Literatürde belirlenen en son çalışma da İridovirüs genomunda kodon kullanma eğilimi ve baz kompozisyonundaki sınırlılık üzerine gerçekleştirilmiştir (Tsai ve ark., 2007).



Şekil 1.13. *Chilo iridescent virus* genomu

## 1.6. Çalışmanın Amacı

Bu tezde *Iridoviridae* familyasına ait *iridovirüs* cinsi üyesi olan *Chilo iridescent virüs* (CIV) üzerinde moleküler çalışmalar planlanmıştır. Bu virüse ait genom haritasının 2001 yılında belirlenmesi sonucunda virüsün moleküler biyolojisinin anlaşılması için gerekli bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışma son yıllarda virüslerde bulunan ve konak hücrenin viral enfeksiyonunu sınırlandırmak için kullandığı apoptosis mekanizmasını baskıladığı belirlenen apoptosis inhibitör genleri (*iap*) ile ilgili olarak hazırlanmıştır. Bu genler hakkında giriş kısmında detaylı bilgi verilmiştir. Bu bağlamda CIV genomunda belirlenen üç farklı ORF'in, 157L (152 amino asit), 193R (208 amino asit) ve 332L'nin (234 amino asit) apoptosis inhibitör genleri olabileceği ileri sürülmüştür. Çalışmanın başlangıç aşamasında yapılan *in silico* analizler sonucunda bu ORF'lerden yalnızca 193R'nin BIR işlevsel bölgesine sahip olduğu ve muhtemel apoptosis inhibitör geni olabileceği belirlenmiştir. Bu bulgu *iridoviridae* familyasına ait şu ana kadar dizi analizleri tamamlanan üyeler arasında ilk olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada bakülovirüslerde bulunan BIR işlevsel bölgelerinin *Iridoviridae* familyasında bulunan bir gende ne işleve sahip olduğu, bu genin fonksiyonel analizi gerçekleştirilerek genin işlevsel olup olmadığı ve transkripsiyonel özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Transkripsiyonel analizi RT-PCR kullanılarak, fonksiyonel analizleri geçici gen ifade eden vektörler oluşturularak ve RNAi teknikleri kullanılarak test edilecektir. Ayrıca bu genin CIV replikasyonunda etkili olup olmadığı RNAi yöntemi kullanılarak belirlenecektir. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler apoptosis sürecinde hücrelerin genomunda karakteristik olarak gözlenen parçalanma sonucunda oluşan özgün DNA görüntüsünün belirlenmesiyle desteklenecektir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini

*Bombyx mori* (SPC-BM-36) hücre kültürü “Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültür Koleksiyonu (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-DSMZ)” kuruluşundan temin edildi. Hücreler 27 °C` de %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ihtiva eden Grace`nin böcek besiyerine %1`lik NaCl eklenerek hazırlanan TN-MFH besiyeride büyütüldü.

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

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

Virüsün çoğaltılması için konak olarak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları kullanıldı. Larvalar virüsle, 30 G1/2 iğne kalınlığına sahip enjektör ile enjeksiyon yoluyla 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, virüsün saflaştırılması esnasında sırasıyla 490×g, 960×g ve 1.250×g`de 10`ar dakika 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 sükröz çözeltisi üzerine bırakılarak 15.300×g`de 30 dakika 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 ve ark., 2001).

### 2.3. *Chilo iridescent virüs*'ün (CIV) *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Böcek Hücre Kültüründe Replikasyonu

CIV genomiks çalışmalarının gerçekleştirilmesinde SPC-BM-36 hücre hattının uygun sistemlerden biri olduğunun belirlenmesinden sonra virüsün *Bombyx mori* hücrelerinde ki enfeksiyon süreci gözlenmiştir. Bu hücre kültüründe CIV'nın enfeksiyon sürecindeki en önemli gözlem enfeksiyonun 1. gününde gözlenen veziküllerdir. Bu veziküllerin hücrelerdeki rolünün anlaşılması için ilk adım olarak bu çalışmada bu veziküllerin apoptotik veziküller olup olmadığını anlaşılması hedeflenmiştir. Apoptosise giren hücrelerin DNA'ları parçalanarak özgün DNA görüntüleri oluşturmaktadır. Bu amaçla apoptosise giren hücrelerin göstermiş olduğu özgün DNA görüntüsü belirlendi.

### 2.4. *Chilo Iridentent Virüs*'ün (CIV) Muhtemel Apoptosis İnhibitör Genlerinin Biyoinformatik Analizi

CIV'de kaspazların aktivasyonunu (Seshagiri ve Miller, 1997) durdurabilen apoptosis inhibitörlerinin (IAP) varlığı *in silico* olarak belirlendi (Jakob ve ark., 2001). Apoptosis inhibitör proteinlerinin (IAP) varlığı BIR (baculovirus inhibitor repeat) ve C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> Zinc/RING finger motiflerinin varlığıyla karakterize edildi.

Fonksiyonel bölgelerin tespitinde Blast analizi (Entrez Pubmed) kullanıldı ve işlevsel bölge veya bölgelere sahip olan proteinler diğer bilinen IAP proteinleriyle MegAlign (DNASTAR) programındaki Clustal algoritması kullanılarak karşılaştırıldı. CIV genomunun analizi sonrasında değişik büyüklüklerde muhtemel üç apoptosis inhibitör gen 157L (152 aminoasit), 193R (208 amino asit) ve 332L (234 amino asit) önerilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 CIV muhtemel apoptosis inhibitör genleri (Jacob ve ark., 2001).

ORF	Genomdaki yeri	Aminoasit sayısı	İşlevsel gen bölgeleri ve protein üzerindeki yeri	Homoloji	Özdeşlik-Benzerlik
157L	62998-63453	152	C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> tip (RING) (111-145)		17.5-22.9
193R	82521-83144	208	BIR motifi (40-109), C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> tip (RING) (163-196)	<i>Cydia pomonella</i> granülovirüs	19.5-33.7
332L	149654-10355	234	İki kısımlı nükleer lokalizasyon sinyali (74-91), C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> tip (RING) (185-219)	apoptosis inhibitör (IAP)	18.1-40.6

Bu genler *Cydia pomonella* granulovirüs (CpGV) apoptosis inhibitör genine % 17,5 ile 19,5 oranlarında özdeşlik ve aminoasit düzeyinde %22,9 ile %40,6 oranlarında benzerlik göstermektedir. CpGV apoptosis inhibitör proteininin fonksiyonel bir IAP proteini kodladığı bilinmektedir (Birnbaum ve ark., 1994). Ayrıca CIV dizi analizi sonucunda elde edilen veriler üç açık okuma zincirinin şu ana kadar belirlenen apoptosis inhibitör genlerine oldukça az homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

## 2.5. CIV *iap* Geninin Transkriptomik Analizi

SPC-BM-36 hücrelerindeki CIV *iap* replikasyonunu transkripsiyonel olarak belirlemek için CIV ile enfekte olmuş hücrelerden enfeksiyondan sonra 12. saatte RNA izolasyonu yapıldı (Chomczynski, 1993). İzole edilen RNA özel primerler kullanılarak ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizine tabi tutuldu. Bu sırada *iap* geninin ifade edildiği sınıfı da tayin edebilmek için SPC-BM-36 hücreleri, DNA (Ara-C) ve protein sentezi (Siklohekzimit) inhibitörleri ile muamele edilerek CIV ile enfeksiyonu gerçekleştirildi. Bu şekilde muamele edilmiş hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen RNA RT-PCR analizine tabi tutuldu.

### 2.5.1. Enfekte Olmuş Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu

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 siklohekzimit (Cyc) 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 kullanılarak firma tarafından tavsiye edilen yönteme 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 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerlerine 0,2 ml kloroform ilave edildi. Nazikçe alt üst edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Karışım 12.000×g`de, 4 °C`de 15 dakika 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 dakika bekletildikten sonra 12.000×g`de

4 °C`de 10 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve çökelti 1 ml %70`lik etanol ilave edilerek yıkandı. 7.500×g`de 4°C`de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA çökeltisi havada 10 -15 dakika 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 kullanılıncaya kadar saklandı.

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

### 2.5.2. Ters Transkripsiyon (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 III revers transkriptaz, 10 ünite RNAsin ve 12,5 µM *iap* için özel primerlerden konuldu. Reaksiyon 20 µl`lik hacim içinde 37°C`de 1 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen cDNA`ların 2`şer µl`si gene özgü RT-Reverse-CIV *iap* ve RT-Forward-CIV *iap* R (Ek Tablo 2) 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 Go *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde 50 µl`lik hacimde gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu 94°C`de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından, 25 döngü halinde 94°C`de 1 dakika, 50°C`de 30 saniye ve 72°C`de 40 saniye bekletilerek gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1`lik agaroz jelde elektroforez edildi. Ayrıca iki farklı 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.

### 2.6. CIV *iap* Geninin Anatomik Analizi

Belirlenen CIV *iap* geninin anatomik analizini yapmak için genin 5`ve 3` UTR bölgeleri RNA transkriptleri üzerinden ACE tekniği kullanılarak belirlendi.

### 2.6.1. CIV *iap* Geninin Translasyona Uğramayan 5` Bölgesinin (5`-UTR) Çoğaltılması

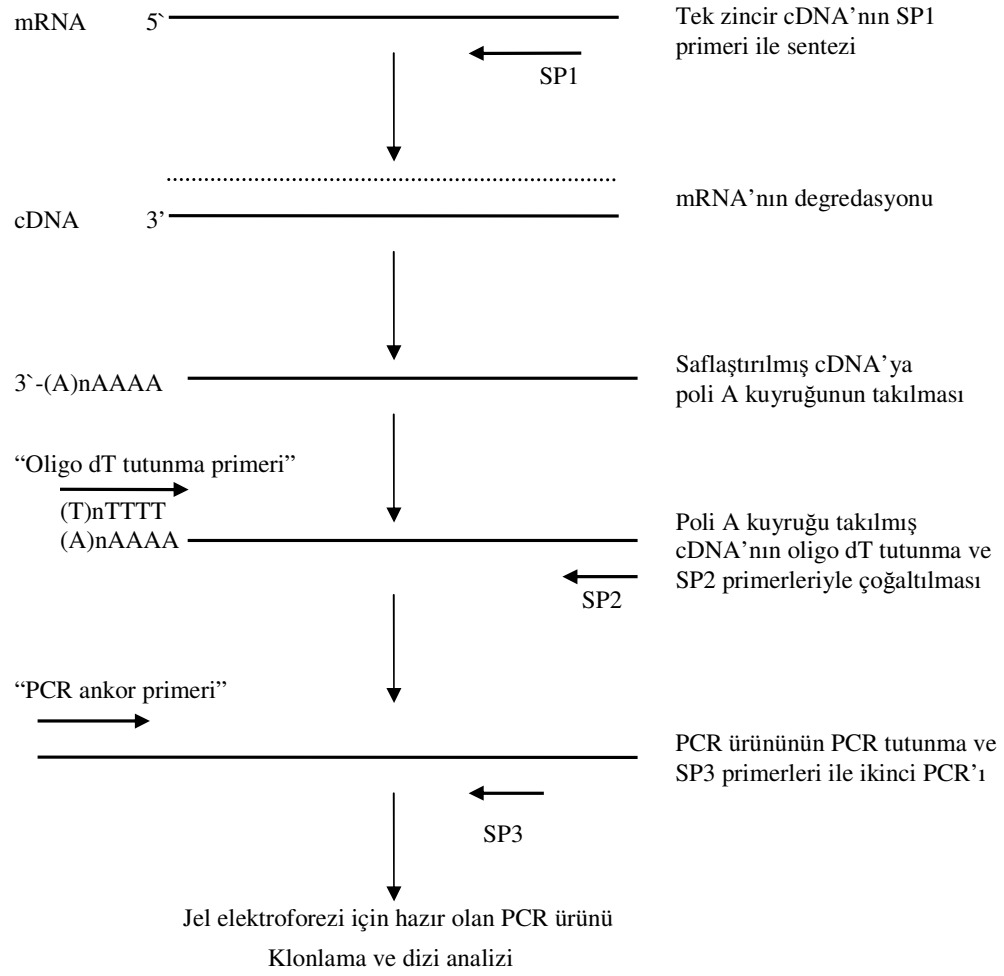
CIV *iap* geninin transkripsiyon başlangıç noktasını tespit edebilmek için deney şartları 5`-ACE kitindeki (Roche) kullanma yöntemine göre oluşturuldu. Şekil 2.1`de 5`-ACE analizi toplu halde şematik olarak anlatılmaktadır.

5`ACE analizinin ilk aşamasında toplam RNA`dan, gene özgü primer CIV *iap* SP1 (Ek Tablo 2) kullanılarak tek zincir cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her gen için ayrı birer tüpe aşağıdaki karışım eklendi.

cDNA sentez tamponu	; 4 µl
Deoksiribonükleotit karışımı	; 2 µl
Gene özgün SP1 primeri	; 1 µl (12 µM)
Toplam RNA	; 3 µl (2 µg)
Superscript III Revers transkriptaz	; 1 µl
H <sub>2</sub> O	; 9 µl

Karışımın 55°C`de 60 dakika ve 65°C`de de 10 dakika bekletilmesi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA, “High Pure PCR Product Purification Kit`i (Roche)” kullanılarak temizlendi. Buna göre 20 µl hacimdeki cDNA`nın üzerine 100 µl bağlanma 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 13.000xg`de 1 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde cDNA, tampon ve enzim gibi kimyasallardan temizlendi.





Şekil 2.1. 5' ACE analizi

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

cDNA	; 19 µl
Reaksiyon tamponu	; 2,5 µl
2 mM dATP	; 2,5 µl

Karışım 94°C'de 3 dakika bekletildikten sonra hemen buz üzerine alındı. Üzerine 1 µl terminal transferaz (10 ünite/µl) ilave edilip karıştırıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından enzimi inaktive etmek için 70°C'de 10 dakika bekletildi.

Bu şekilde “poli A” kuyruğu takılmış cDNA gene özgü primerler CIV *iap* SP2 ve CIV *iap* SP3 (Ek Tablo 2) kullanılarak birbirini takip eden iki ayrı PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Birinci PCR reaksiyonunda her bir tüpe aşağıda verilen oranlarda PCR karışımı hazırlandı.

“Poli A” kuyruğu takılmış cDNA	; 5 µl
Oligo dT-tutunma primeri	; 1 µl
Gene özgün SP2 primeri	; 1 µl (12 µM)
Deoksiribonükleotit karışımı	; 1 µl
<i>Go Taq</i> DNA polimeraz	; 0,5 µl
Reaksiyon tamponu	; 10 µl
H <sub>2</sub> O	; 31,5 µl

PCR reaksiyonu 94°C`de 2 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 25 döngü halinde 94 °C`de 1 dakika, 45°C`de 30 dakika ve 72°C`de 40 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

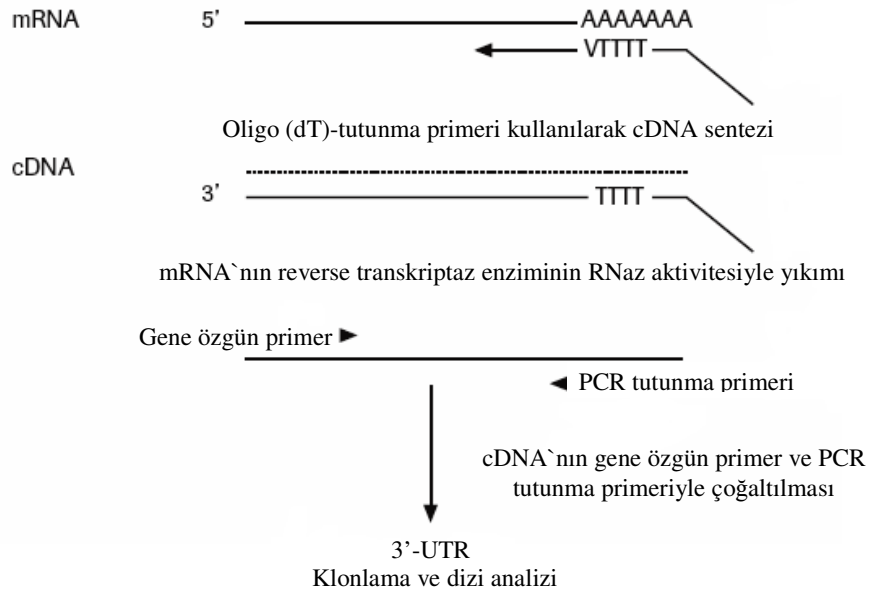
İkinci PCR reaksiyonunda ise yine her bir tüpe aşağıda verilen oranlarda PCR karışımı hazırlandı.

Birinci PCR ürünü	; 5 µl
PCR-tutunma primeri	; 1 µl
Gene özgün SP3 primeri	; 1 µl (12 µM)
Deoksiribonükleotit karışımı	; 1 µl
<i>Go Taq</i> DNA polimeraz	; 0,5 µl
Reaksiyon tamponu	; 10 µl
H <sub>2</sub> O	; 31,5 µl

İkinci PCR reaksiyonu yukardaki karışım hazırlanarak aynı programla tekrarlandı. PCR ürünü %1`lik agaroz jelde elektroforez edildi.

### 2.6.2. CIV *iap* Geninin Translasyona Uğramayan 3` Bölgesinin (3` UTR) Çoğaltılması

CIV *iap* geninin transkripsiyonunun sonlandığı noktanın belirlenmesi için 3` ACE tekniği kullanıldı. Deney şekil 2.2`de şematik olarak özetlenmiştir. Analizin ilk basamağında toplam RNA`dan oligo d(T) tutunma primeri kullanılarak (Ek Tablo 2) cDNA sentezi gerçekleştirildi. Fakat bu aşama öncesinde 3` bölgesinde poli A içermediği bilinen CIV RNA`larına poli A kuyruğu takıldı. cDNA sentezini takip eden aşamada PCR tutunma ve gene özgü primer kullanılarak 5` ACE analizinde kullanılan yöntemle PCR gerçekleştirildi.



Şekil 2.2 3` ACE analizi

cDNA sentez tamponu	; 4 µl
Deoksiribonükleotit karışımı	; 2 µl
Gene özgün SP1 primeri	; 1 µl (12 µM)
Toplam RNA	; 3 µl (2 µg)
Superscript III Revers Transkriptaz	; 1 µl
H <sub>2</sub> O	; 9 µl

Elde edilen PCR ürünleri pGEM-T easy (Promega) vektörüne klonlanarak dizi analizi gerçekleştirildi.

### 2.6.3. CIV iap Geninin Translasyona Uğramayan 5` ve 3` Bölgelerinin Klonlanması

Yukarıda anlatıldığı gibi oluşturulan PCR ürünleri % 1`lik agaroz jelde elektroforez edildikten sonra oluşan bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüplerine alındı ve ürünün jelden temizlenmesi illustra™ GFX Gel Band Purification kiti (GE Healthcare) ve kitin içinde bulunan kullanma yöntemi takip edilerek gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 10 mg jel parçası için 10 µl jel çözme tamponu kullanıldı. Karışım 60°C`de yaklaşık 15 dakika jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. Bu süre sonunda bağlama tamponu ve jel karışımı GFX kolonlara aktararak 12.000×g`de 30 saniye santrifüj edildi ve sıvı atıldı. Kolon 1 kez 500 µl yıkama taponuyla yıkandı. Kolon, sonrasında temiz bir ependorf tüpüne alınarak uygun 10-50 µl elüsyon tamponu kolona homojen yayılacak şekilde eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra santifugasyonla kolondan DNA süzüldü. İzole edilen DNA`nın saflığı ve konsantrasyonu % 1,5`lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEM-T easy vektörüne 3:1 oranında (0,3 µg DNA fragmenti : 0,1 µg pGEM-T easy) hazırlanarak ligasyon gerçekleştirildi. Reaksiyon; 1 µl pGEM-T easy vektörü, 5 µl 2×ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 3 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 10 µl`lik hacim içinde gerçekleştirildi. Ligasyon karışımı 16°C`de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α hücrelerine elektrotransformasyonla aktararak koloni seçimleri gerçekleştirildi. Bu transformasyonda kullanılan elektrokompentent *E. coli* DH5α hücreleri aşağıdaki protokole uygun olarak hazırlandı. Klonların seçimi ve dizin analizleri (Macrogen, KOREA) gerçekleştirildi.

Petriye ekilmiş *E. coli* DH5α hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C`de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C`de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4°C`de 4.000×rpm hızında 5 dakika 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 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10`luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompetent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl`lik hacimlerde) ve -80 °C`de kullanılıncaya kadar saklandı.

Genlerin translasyona uğramayan DNA zincirlerinin klonlandığı plazmitleri hücreye aktarmak için elektrokompotent *E.coli* DH5α hücreleri kullanıldı. Kompetent *E.coli* DH5α hücrelerinin bulunduğu tüpler buz üzerine alındı ve bu hücrelerin üzerlerine 1-3 µl ligasyon karışımından konuldu ve karıştırıldı. Karışım elektroporasyon küvetlerine aktarıldı ve küvetler elektroporator cihazına (BioRad) yerleştirildi. Küvetler cihazda 200 ohm (Ω), 1,5-2K ve 25mF`de 3-4 saniye bekletildi. Ardından küvetin içeriği 1 ml LB broth besiyerine transfer edildi ve 37°C`de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler 6.000×rpm`de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hücreler 200 µl LB Broth 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.

#### **2.6.4. CIV *iap* Geninin Proteine Dönüşmeyen 5' ve 3` Bölgelerini İhtiva Eden Klonların Seçilmesi**

İzole edilen klonlardan plazmit DNA`larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Yukarıda belirlenen klonlardan oluşturulan gece kültürleri 14.000×g`de 2 dakika 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 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %100`lük etanol ilave edilerek 14.000×g`de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti % 70`lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH<sub>2</sub>O`da çözüldü.

İzole edilen plazmit DNA'ların CIV *iap* genine ait DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA, 0,5 µl *EcoRI*, 1,5 µl enzime ait 10X 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 karışım % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

CIV *iap* için doğru olduğu gözlenen klonların 3'er tanesi tespit edildi. Bu klonlardan kit (High Pure Plasmid İsolation Kit, Roche) 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 dakika bekletildikten sonra üzerine 350 µl bağlanma tamponu ilave edildi. Tekrar oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 10 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kitle 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 dakika 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. Dizi analizi için genellikle M13 F ve M13 R ve ya SP6 ve T7 primer çiftleri kullanıldı.

## 2.7. CIV *iap* Geninin Fonksiyonel Analizi

CIV *iap* geninin işlevsel bir apoptosis inhibitör geni olup olmadığının ortaya çıkarılması için CIV *iap* geninin geçici olarak ifadesini sağlayan vektörün oluşturulması, bu vektörlerin farklı hücre hatlarında test edilmesi, genin doğal konağında RNAi tekniğiyle deneysel mutant oluşturularak CIV enfeksiyonundaki rolünün tespit edildi. CIVIAP proteininin bakülovirüs sisteminde etkinliği belirlendi.

### 2.7.1. Geçici Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

CIV *iap* geninin ve işaret geniyle (*gfp*) birlikte ifadesinin sağlanabilmesi için her iki gen en erken genlerden elde edilen güçlü promotorların önüne klonlandı. En erken yapısal promotorlar olarak Bakulovirüs *ie1* (CIV *iap* geni için) ve *ie2* (*gfp* işaret geni için) promotorları kullanıldı. *Ac-p35* ve *Op-iap3* genleri de kontrol olarak kullanılmak üzere aynı sistemle klonlandı. Klonlanacak genler Phusion DNA-polymeraz (Finnzymes) kullanılarak çoğaltıldı. Her bir PCR reaksiyonu için gerekli enzim bölgelerini içeren primerler tasarlandı (Ek Tablo 2). *iap* genlerinin pFast Bac vektörüne klonlanabilmeleri için uçlarında *SpeI* ve *PstI* kesim bölgeleri içermektedir (Şekil 2.3). Phusion DNA polimeraz enzimiyle çoğaltılan küt uçlu PCR ürünlerine A kuyruğu takılarak pGEM-T easy vektörüne klonlandı. Pozitif klonlar *SpeI/PstI* ile kesilerek vektörün içerisinden çıkarılan gen pFastBac Dual vektörüne klonlandı.

Geçici gen ifadesinin gerçekleştirilmesi için tasarlanan vektör pFastBac Dual vektörünün üzerinde bazı değişiklikler yapılarak oluşturuldu. pFastBac Dual vektörüne OpMNPV *ie-1* promotoru ve *hr5* enhansır bölgesi pAcIEHr3 plazmitinde bulunan *XmaI/BglII* kesim bölgelerinden yararlanılarak aktarılmıştır (Jarvis ve ark., 1996). Bu aktarımda pFastBac Dual vektöründeki *p10* ve *polyhedrin* promotorları delesyona uğramıştır. Diğer kısma da OpMNPV *ie-2* promotorunun kontrolünde *XhoI* kesim bölgesi içeren EGFP fragmanı klonlanmıştır. *gfp(ie2)* fragmenti, pEGFP plazmitinden (Clontech) *gfp`nin* pIB/V5-His (Invitrogen) vektörüne *BamHI/XbaI* parçası olarak klonlanmıştır. Bu parça, IE2-FW 5`-TTC **TCG AGT** CAT GAT GAT AAA CAA TGT ATG GTG-3` ve GFP-RV 5`-TTT **CTC GAG** GTC GAC CCG CTT TAC TTG TAC AGC-`3 primerleriyle (altı çizili bölgeler *XhoI* kesim bölgesini göstermektedir) füzyon DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir. Bu sayede geçici gen ifadesini sağlayan pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)* vektörü elde edildi.

pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)-CIViap* plazmiti *SpeI/PstI* kesim bölgeleri içeren CIV *iap* geninin pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)* plazmidine klonlanmasıyla elde edilmiştir. Bu amaçla CIV *iap* geni phusion DNA polimeraz enzimi kullanılarak CIViap-FWI 5`-TTA **CTA GTA** TGG ATA CAT GTG GAA TTT ATA-3` ve CIViap-RVI 5`-TTC **TGC AGT** TAT ATA AAA AGA TTG TTA ATT TTG AT-3` (altı çizili bölgeler sırasıyla *SpeI* ve *PstI* kesim bölgelerini temsil etmektedir) genomik CIV DNA kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen plazmite pFBCIViap ismi verilmiştir. Pozitif kontrol

olarak hazırlanan pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)-Opiap3* plazmiti OpMNPV *iap3* geninin pHSOpiap plazmitinden elde edilen *Eco47III/PstI* kesim bölgelerinden yararlanılarak pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)* vektöründeki *StuI-PstI* kesim bölgelerinin bulunduğu bölgeye klonlanmasıyla elde edilmiştir (Clem & Miller, 1994) Elde edilen plazmite pFBOpiap3 adı verildi. Diğer bir pozitif kontrol olan pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)-p35*, AcMNPV *p35* geninin MW321 5`-TTA **ACT AGT** ATG TGT GTA ATT TTT CCG GTA-3` ve MW322 5`-AAT **CTG CAG** TTA TTT AAT TGT GTT TAA TAT TAC ATT TTT G-3` primerleri, phusion DNA polimeraz enzimi ve kalıp DNA olarak AcMNPV-E2 DNA`sı kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir (altı çizili bölgeler sırasıyla *NotI/PstI* kesim bölgesini göstermektedir). PCR ürünü ilk olarak pGEM-T easy vektörüne *NotI/PstI* kesim bölgeleri kullanılarak klonlandı. Bu vektörden pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)* plazmitine *StuI/PstI* kesim bölgeleri aracılığıyla klonlanarak elde edilen plazmit pFBp35 olarak adlandırıldı (Şekil 2.3). Negatif kontrol olarak pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)* plazmiti kullanıldı (pFBempty).

### 2.7.2. Genin Amplifikasyonu (PCR) ve Geçici Gen İfadesi Vektörüne Klonlanması

PrimerSelect (DNASTAR) programı kullanılarak 193R genine özgü primerler *PstI/SpeI* kesim bölgelerini içerecek şekilde oluşturuldu. Genin çoğaltılmasında hata olmasını engellemek için hata düzeltme aktivitesine sahip phusion DNA Polimeraz (Finnzymes) kullanıldı. PCR karışımı;

Kalıp DNA	; 1µL
5× Phusion tamponu	; 10 µL
10mM dNTP karışımı	; 1 µL
10 µM CIViap-FW	; 1 µL
10 µM CIViap-RV	; 1 µL
Phusion DNA polimeraz	; 0,25 µL
H <sub>2</sub> O	; 35,75 µL



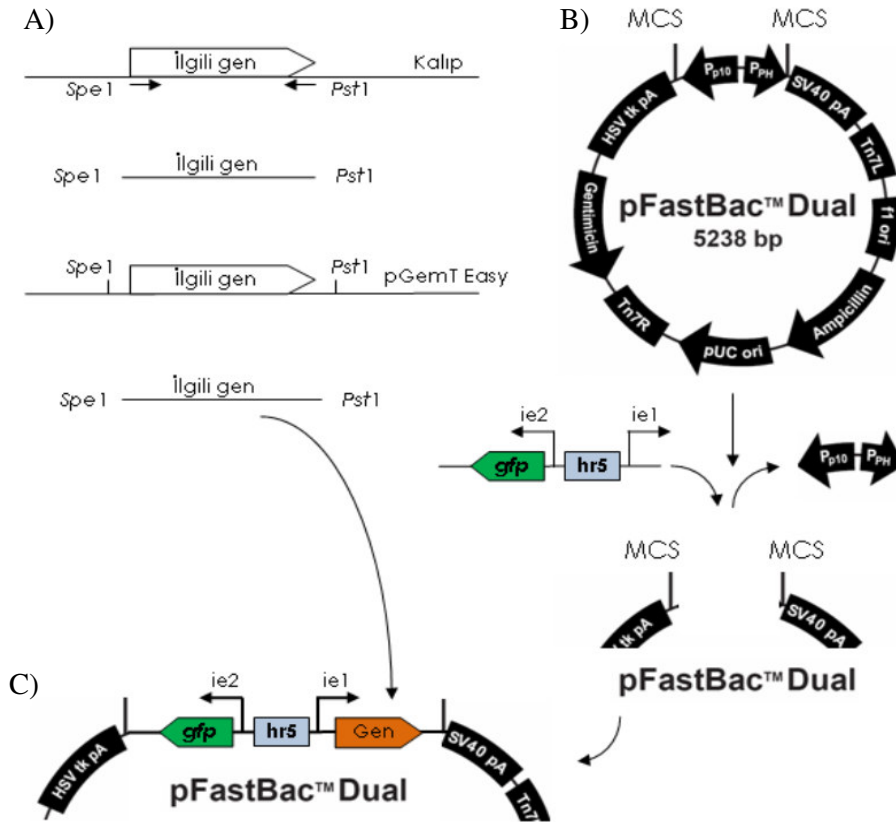
Reaksiyon toplam 50 µL olarak hazırlandı. Primerler için yapışma sıcaklığı  $T_m=4 \times (C+G) + 2 \times (T+A) - 5$  formülüne göre hesaplandı. Yapışma sıcaklığı 5 döngü sonra 60°C yükseltildi. Sentez basamağı 20 saniye olarak programlandı. Sentez süresi genin uzunluğuna göre ayarlandı. PCR reaksiyonu, 2 dakika 98°C'de başlangıç denatürasyonu ardından, 5 döngü halinde zincirlerin ayrılması için 10 saniye 98°C'de, primerin bağlanması için 45 saniye 55°C'de ve sentez için 30 saniye 72°C uygulandı ve 35 döngü halinde zincirlerin ayrılması için 10 saniye 98°C, primerin bağlanması için 45 saniye 60°C ve sentez için 30 saniye 72°C uygulandı ve son sentez aşaması 7 dakika 72°C olarak tamamlandı. PCR ürünü, Illustra™ GFX Gel Purification kiti (GE Healthcare) kullanılarak izole edildi ve % 1'lik agaroz jelde DNA'nın nisbi konsantrasyonu belirlendi.

pGEM-T easy vektörü (Promega) T kuyrukları bulunduran lineer bir yapıdadır. Bu timin kuyrukları A kuyruğu bulunduran DNA ürünleriyle ligasyonu kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle DNA ürünlerinin her iki 3' ucuna A kuyruğu eklendi. Reaksiyon karışımı; 7 µL DNA, 1 µL 10× Taq tamponu, 0,6 µL MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL 10mM dNTP karışımı ve 0,4 µL Taq polimeraz içermektedir. Bu reaksiyon karışımı 72°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ligasyonu takiben ürün *E.coli* DH5α hücrelerine aktarıldı. Klonlar klasik yöntemlerle belirlenip doğrulandı. Dizi analiziyle doğrulan klonlardan plazmit izolasyonu yapılarak hedef gen izole edildi. Yine eş zamanlı olarak vektör plazmiti de aynı enzimlerle kesilerek ligasyon için hazırlandı. Kesilen vektör ligasyon öncesinde yeniden halkasal hale gelmesini engellemek için CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) ile muamele edilerek izole edildi. Bu enzim lineer durumdaki vektörün 5' uçlarındaki fosfatları uzaklaştırmaktadır. Reaksiyon karışımı 8 µL DNA, 1 µL Alkalen fosfataz 10X tamponu ve 1 µL Alkalen fosfataz (AP) enzimi içermektedir. Bu karışım 1 saat 37°C'de inkübe edildi.

DNA bantları UV transilüminatör ile gözlenerek steril bistüri yardımıyla kesilerek ependorf tüplerine konuldu. Jelden DNA saflaştırmada GE Healthcare ve Roche firmalarına ait yüksek saflıkta PCR ürünü saflaştırma kitleri kullanıldı. Vektör ve hedef genin bu işlemlerden sonra DNA yoğunluğu agaroz jelde marker bantlarının bilinen yoğunluklarıyla karşılaştırarak tahmin edildi. Ligasyonda 1 vektör : 5 hedef gen olarak gerçekleştirildi. Bu oranlar hesaplandıktan sonra 5X ligasyon tamponundan 2 µL, 1 µL T4 DNA ligaz ve 1 µL 15 mM ATP toplam hacim 10 µL olacak şekilde hazırlandı. pGEM-T easy kiti (Promega) ligasyonda kullanılırsa karışımda 3 µL A uyuğu takılmış gen, 1 µL vektör, 5 µL 2X ligasyon tamponu ve 1 µL ligaz kullanıldı. Reaksiyon karışımı 16°C'de 15 saat inkübe edildi.

Elektroporasyon için ligasyon ürününden 1  $\mu$ L alınarak 50  $\mu$ L kompetent hücre ile karıştırıldı. Cihazın sabit ayarları kullanılarak transformasyon yapıldı ve bu işlemin hemen ardından hücreler mümkün olduğunca kısa surede 1 mL LB besiyeri ile alınarak 37 °C'de 45 – 60 dakika inkübe edildi. Hücreler 5000 $\times$ rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve pellet tüpte kalan yaklaşık 0,1 mL besiyeriyle çözülerek antibiyotik içeren LB Agar petrilere ekildi. Plazmit izolasyonu 2.4.2. Bölümde açıklandığı gibi gerçekleştirildi.

Yüksek konsantrasyonda ve saflıkta kontrol veya hedef geni içeren plazmitlerin izolasyonu için hücreler 100 mL antibiyotikli LB besiyerinde büyütüldü. Plazmit DNA JetSTAR 2.0 plazmit saflaştırma kiti (Genomed) kullanılarak kit protokolüne göre izole edildi.



Şekil 2.3. Geçici gen ifadesi vektörünün klonlanması. A; Hedef genin PCR basamağı ve genin uçlarına *SpeI/PstI* kesim bölgelerinin eklenmesi. B; pFastBac vektöründen *p10* ve *polihedrin* promotorunun uzaklaştırılarak yerine OpMNPV *ie-2* promotorunun kontrolünde *gfp* ve OpMNPV *ie-1* promotoruyla *hr5* enhansır bölgesinin klonlanması. C; Hedef genin OpMNPV *ie-1* promotorunun önüne klonlanması

### 2.7.3. Rekombinant Plazmitlerin Kontrolü

Hazırlanan tüm plazmitler restriksiyon analizi, koloni PCR ve dizi analiziyle kontrol edilerek doğrulandı. Bu amaçla ilk olarak klonlardan elde edilen plazmitler tipik bir kesim reaksiyonu protokolu uygulanarak kontrol edildi.

Plazmit DNA	; 3-5 $\mu$ L
Restriksiyon enzimi	; 1 $\mu$ L
Tampon (10X)	; 1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	; 5-3 $\mu$ L

Toplam hacim 10  $\mu$ L olacak şekilde steril dH<sub>2</sub>O/RNaz eklendi. Sonrasında karışım uygun sıcaklıkta 1-2 saat inkübe edildi. Eğer BSA gerekliyse karışımın 1/10'u oranında BSA ilave edilmelidir.

İkinci olarak da koloni PCR kullanılarak klonların doğruluğu kontrol edildi. Bu reaksiyon klasik PCR koşullarında *Taq* polimeraz (Promega) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımında 5  $\mu$ L 10X *Taq* tamponu, 1  $\mu$ L 10mM dNTP karışımı, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ M primer 1, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ M primer 2 ve 1  $\mu$ L *Taq* polimeraz toplam hacim 50  $\mu$ L olacak şekilde hazırlandı.

Kalıp DNA olarak koloni direk olarak kullanıldı. Bu işlemde kürdan veya pipet ucu koloniye dokundurularak bir miktar bakteri alındı ve 18  $\mu$ L steril su içinde bu bakteri çözüldü ve 95°C'de 5 dakika bu karışım bekletildi 8000 $\times$ rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant kalıp DNA olarak kullanıldı.

Primer bağlanma sıcaklığı yukarıda belirtilen formüle göre belirlendi. *Taq* polimeraz enzimi Phusion polimeraz enziminden yavaş olması nedeniyle sentez süresi 40 saniye olarak programlandı.

PCR reaksiyonu, 5 dakika 94°C'de başlangıç denatürasyonu ardından, genin çoğaltılması için zincirlerin ayrılması için 30 saniye 94°C, primerin bağlanması için 45 saniye 55°C sentez için 40 saniye 72°C'lık program 35 döngü ve son sentez aşaması 7 dakika 72°C olarak uygulandı.

## 2.8. CIV iap Ekspresyonunun *İn vivo* Etkilerinin Belirlenmesi

### 2.8.1. Hücre Kültürü

Bu çalışma için CIV`nin replikasyonunun ve plazmit transfeksiyonunun en yüksek verimde sağlanabildiği hücre hatları kullanıldı (Şekil 3.1). Hücreler 25 cm<sup>2</sup> flasklarda 4 mL Grace`nın böcek besiyeriyle (Grace, 1962) %1 fetal bovine serum (FBS) kullanılarak kültür edildi. Bu çalışmada SPC-BM-36 (*Bombyx mori*), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) ve TniH5 (*Trichoplusia ni*, sonuçlar verilmemiştir) kullanıldı. Hücreler 28°C de 4 mL kültürde tüm flask içinde 1×10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde inkübe edildi.

### 2.8.2. Böcek Hücrelerinin Transfeksiyonu

Petri kaplarına (35 mm) 2×10<sup>6</sup> hücre 2 mL FBS içermeyen Grace`nın böcek besiyeri kullanılarak ekildi ve 1 gece 28°C de büyütüldü. Hoechst boyaması yapılması planlanan petrilere hücreler ekilmeden önce küçük boy steril lameller yerleştirildi. Transfeksiyon karışımı hazırlanması için polistren tüpler kullanıldı. Polistren tüplerin dip kısmına SPC-BM-36 hücre hattı için 10 µL lipofectin (invitrogen), Sf21 ve TniH5 hücre hatları için 10µL Cellfectin (invitrogen) 10 µg plazmit DNA (2.7.2`de açıklanan rekombinant plazmitlerin) biçeren 40 µL steril bidistile suyla nazikçe karıştırılarak konuldu. Bu karışım oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi ve her 15 dakikada bir nazikçe karıştırıldı. İnkubasyon sonrasında 500 µL Grace`s Insect besiyeri ilave edildi. Petri kaplarındaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve hazırlanan transfeksiyon karışımı damla damla petrilere aktarıldı. Hücreler 1 saat 27°C de 2,5 hızda karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 500 µL “Grace`s insect besiyeri” ilave edilerek hücreler 3 saat 27°C de inkübe edildi. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra %10 FBS içeren besiyeri eklenerek bir kaç gün hücrelerin gelişmesi için 27°C de inkübe edildi.

### 2.8.3. Apoptosisin Uyarılması

Bu çalışmada 35 mm`lik petri kaplarında, 2 mL besiyeri içerisinde, 1×10<sup>6</sup> hücre tek tabaka olacak şekilde gece boyunca inkübasyon yapıldıktan sonra kullanıldı. Aktinomisin D (Sigma) stok solüsyonu DMSO içerisinde son yoğunluğu 2,5 mg/mL olacak şekilde

hazırlandı. Çalışma solüsyonu 0,5 mg/mL olarak hazırlandı. SPC-BM-36, Sf21 ve TniH5 hücrelerinde uygun aktinomisin D yoğunlukları ve apoptosisi teşvik süreleri yapılan farklı yoğunlukların test edilmesiyle belirlendi. Apoptosis SPC-BM-36 hücre hattında 0,5 µg/mL 6 saat, Sf21 hücre hattında 2 µg/mL 5 saat ve TniH5 hücrelerinde 1 µg/mL 10 saat şeklinde teşvik edilmiştir.

#### **2.8.4. Hoechst Boyaması**

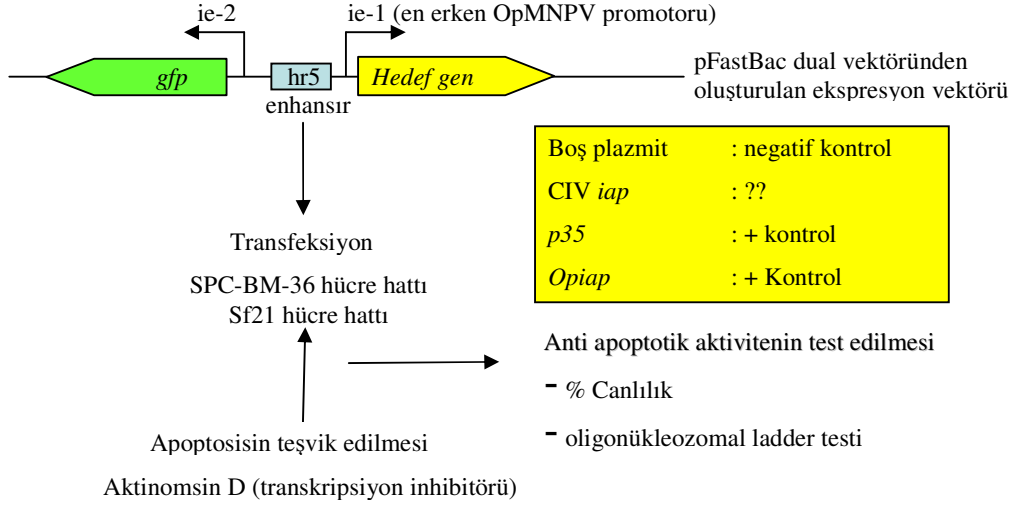
Hücrelerdeki apoptosisin belirlenmesinde kullanılan boyama yöntemidir. Hoechst boyası çekirdeği boyar ve hücrelerde çekirdek DNA'sındaki parçalanmasının gözlenmesini sağlar. Bu amaçla, tabanına steril lamel yerleştirilen 35 mm çapındaki petrielerde 2 mL besiyeri içerisinde hücreler büyütüldü. Deney gruplarında apoptosisin gözlenmesinde stok 1 mM Hoechst boyasından (bisBenzimide H33342 trihydrochloride, Sigma) hazırlanan boyadan besiyerine son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde ilave edildi. Hücreler 37°C 1 saat inkube edildikten sonra lamel alınarak preparat hazırlandı ve DAPI filtresiyle incelendi. Apoptosise uğrayan hücrelerin çekirdekleri DAPI filtresiyle mavi renkte parçalanmış şekilde görülür.

#### **2.8.5. Böcek Hücre Kültürlerinden DNA Eldesi**

Hücrelerde apoptosisin gözlenmesi için kullanılmaktadır. Apoptosise uğrayan hücrelerden izole edilen DNA parçalanmış şekilde özgün bant yapısına sahiptir. Hücreler flask tabanından nazikçe alınarak tüplere aktarıldı. İki kez 1 mL soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama sırasında santrifugasyon işlemi 5000×rpm'de 5 dakika olarak yapıldı. Son basamakta süpernatant uzaklaştırılarak pellet 0,5 mL TENS (0,1 M Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% Sarkosyl) ile süspanse edilerek 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışıma son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde proteinaz K ilave edilerek 56°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra iki kez fenol saflaştırması yapıldı. Bir defa da Kloroform/izoamil alkol saflaştırması yapılarak DNA çöktürülmesi işlemine geçildi. Bu işlemde 5M NaCl son yoğunluğu 200 mM olacak şekilde ve 2 hacimde soğuk %100 EtOH eklendi ve -80°C 20 dakika veya -20°C'de gece boyu bekletildikten sonra DNA yüksek hızda 20 dakika çöktürüldü. %70'lık EtOH ile yıkandıktan sonra kurutularak TE tamponu içerisinde çözüldü.

### 2.8.6. *Bombyx mori* (SPC-BM-36) Hücrelerinin Rekombinant Plazmitlerle Transfeksiyonu

Deney 35 mm`lik hücre kültür kaplarında gerçekleştirildi. SPC-BM-36 hücreleri bir gece önceden hücre kültür kaplarına her kaptaki  $1 \times 10^6$  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 pFastBac Dual plazmiti (2 µg), cellfectin (10 µl) (İnvitrogen) ve katkı maddeleri ihtiva etmeyen besiyeri (500 µl) karışımı bırakılarak plazmitin hücelere transfeksiyonu gerçekleştirildi.



Şekil 2.4. SPC-BM-36 ve Sf21 hücre hatlarının rekombinant plazmitlerle transfeksiyonu ve apoptosinin uyarılması

### 2.8.6. İstatistiksel Analiz

Geçici gen ifadesi sağlayan sistemde elde edilen sonuçları Excel (Microsoft) programının istatistik özellikleri kullanılarak değerlendirildi. Standart sapma ( $\sigma$ ) 'STDEV' seçeneğinden yararlanılarak aşağıdaki formüle (1) göre hesaplandı.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2} \quad (1)$$

Bu formülde;

N; Örnek sayısı

$x_i$ ; i örneğinin değeri

$\mu$ ; ortalama

Standart hata aşağıda verilen förmüle(2) göre hesaplandı.

$$\text{Standart Hata} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (2)$$

Apoptotik hücrelerin sayısındaki azalmanın hesaplanması, apoptosisin teşvik edilmesinden önce *gfp* ifade eden hücrelerin apoptosisin teşvik edilmesinden sonraki *gfp* ifade eden hücrelerin sayısına oranının kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Bu oranların arasındaki istatistiksel farklılıklar, excel programındaki TTEST seçeneği kullanılarak değerlendirildi.  $P < 0,05$  değeri istatistiksel olarak önem sınırı olarak belirlendi.

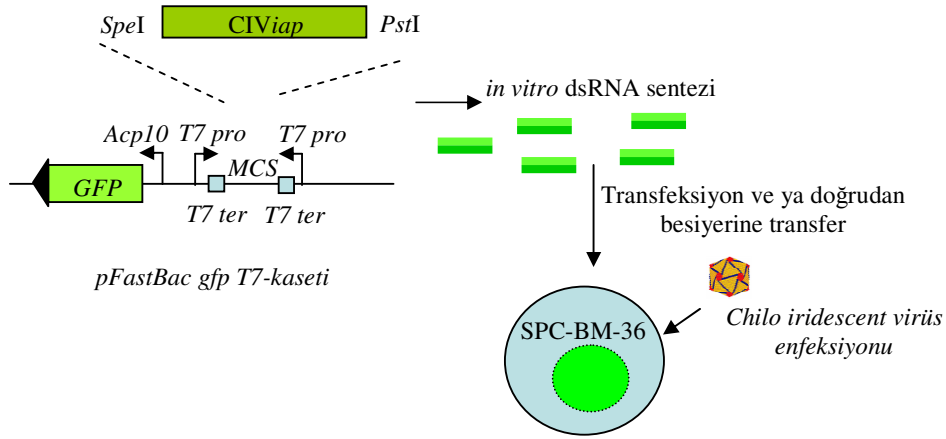
## 2.9. CIV *iap* Geninin Viral Enfeksiyondaki Rolünün Tespiti

CIV *iap* geninin konak hücrenin apoptosis sürecini baskıladığı yani virüsün fonksiyonel olarak aktif bir *iap* genine sahip olduğunun anlaşılmasından sonra genin susturulması, böylece viral replikasyon için gerekli bir gen olup olmadığının ve ayrıca konak hücrede enfeksiyon sonrasında gerçekleşecek değişimlerin gözlenmesi amaçlandı. Bu amaçla dsRNA susturulması yöntemi denenmesine karar verildi. Gene özgü *in vitro* dsRNA sentezi yapmak için yeni bir plazmit klonlandı. Bu sayede *in vitro* dsRNA sentezi gerçekleştirildi. Bu vektörün yapısı Şekil 2.5`de genel olarak gösterilmektedir.

### 2.9.1. *In vitro* dsRNA Sentezi

dsRNA üretimi için oluşturulan vektör her iki yönde T7 promotörü ve T7 sonlandırıcı bölgeleri bulunduracak şekilde tasarlandı. pFastBac Dual vektörünün ikinci çoklu klonlama bölgesi (MCS) MW186 5`-CCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CCC

CAA GGG GTT ATG CTA GTT ATT GCT CAG CGG ATC CCG GTC CGA AGC GCG CGG AAT TC-3` ve MW187 5`-CCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CCC CAA GGG GTT ATG CTA GTT ATT GCT CAG CGG AAG CTT GTC GAG ACT GCA GGC TCT AG-3` primerleri kullanılarak çoğaltıldı (altı çizili bölgeler T7 sonlandırıcı bölgesinin kısmı bir parçasıdır). PCR ürünü MW188 5`- **TTC CTA GGT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCA AAA AAC CCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CCC CAA GG**-3` primeri kullanılarak tekrar PCR gerçekleştirildi (italik kısım *AvrII* kesim bölgesini, koyu punto ile gösterilen bölge T7 promotorunu, altı çizili bölge T7 promotorunun geri kalan parçasını temsil etmektedir). PCR ürünü pFB-*gfp*(p10) delta *polh* vektörünün *AvrII* kesim bölgesine klonlandı. Sonuç olarak vektördeki polihedrin promotoru ve bitişiğindeki çoklu klonlama bölgesinin *Bst*1107I/*Hpa*I fragmenti olarak delesyonu gerçekleştir sonrasında *Xma*I bölgesine GFP insersiyonu gerçekleştir (red shifted GFP=smRS-GFP). CIV *iap* PCR ürünü iki yönlü T7 promotorunun arasındaki çoklu klonlama bölgesine *Spe*I/*Pst*I kesim bölgeleri aracılığıyla klonlanarak pFB *gfp*(p10)-T7/CIV*iap* elde edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *In vitro* dsRNA üretimini sağlayan vektör

Bu oluşturulan plazmit dsRNA sentezinde kullanıldı. “T7 Ribomax Express RNAi sistemi” kullanılarak *in vitro* dsRNA sentezi gerçekleştirildi. Bu amaçla hazırlanan plazmitler RNaz ile muamele edildi ve plazmit karışımındaki muhtemel RNaz aktivitesi baskılandı. RNaz`dan arındırılan plazmitler karışımdan fenol kloroform yöntemi kullanılarak izole edildi. İzole edilen plzmitler *in vitro* dsRNA sentezinde T7 Ribomax Express RNAi sisteminin protokolüne uygun şekilde dsRNA sentezlendi. Bu reaksiyon 20



$\mu$ l toplam hacimde gerçekleştirildi. Plazmit DNA`dan toplam reaksiyonda plazmitin içerdiği hedef genden  $1\mu$ g içerecek miktar  $\mu$ l olarak hesaplanarak reaksiyonda kullanıldı.

Reaksiyonda;

Ribomax Express T7 2X tamponu	; 10 $\mu$ l
T7 RNA polimeraz	; 1 $\mu$ l
RNAsin	; 1 $\mu$ l
Nükleaz içermeyen ddH <sub>2</sub> O	; toplam hacim 20 $\mu$ l`ye tamamlanır.

Reaksiyon karışımı sırasıyla 37°C`de 30 dakika, 42°C 15-20 dakika ve 70°C`de 10 dakika inkübe edildikten sonra yavaşça oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakıldı. Bu aşama dsRNA sentez aşamasıdır. Bu aşamayı takiben reaksiyon karışımındaki kalıp DNA (Plazmit DNA) ve ssRNA`lar uzaklaştırıldı. dsRNA bu aşamalardan sonra çözelti içerisinde saflaştırıldı. Deneysel aşamada farklı konsantrasyonlarda (0  $\mu$ g, 10  $\mu$ g ve 50  $\mu$ g) dsRNA 35 mm`lik flasklarda  $1\times 10^6$  SPC-BM-36 hücresine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra CIV enfeksiyonu gerçekleştirildi.

### 2.9.2. siRNA Sentezi

CIV *iap* gen sırasında özgün hedef bölgelere bağlanabilecek iki siRNA ve bu yöntemle deneysel sistemde genin hangi verimlilikte susturulabildiğinin belirlenmesi içinde *gfp* gen sırasına özgün iki siRNA tasarlandı (Tablo 2.2). Tasarlanan siRNA dizileri Eurogentec firması tarafından sentezlendi. Negatif kontrol olarak mock transfeksiyon ve mock enfeksiyon veya mock transfeksiyon ve enfeksiyon gerçekleştirildi. Farklı konsantrasyonlarda (0  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g ve 10  $\mu$ g) CIV *iap* siRNA-1 ve siRNA-2 veya kontrol olarak *gfp* siRNA-1 ve siRNA-2, 35 mm`lik flasklarda  $1\times 10^6$  SPC-BM-36 hücresine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra CIV enfeksiyonu gerçekleştirildi.

Susturmanın verimliliği markır gene (*gfp*) özgü tasarlanan siRNA`ların kullanılmasıyla test edildi. *gfp* siRNA`larının GFP ifadesini verimli olarak baskıladığı belirlenmiştir. Bununla birlikte aynı sistemde kontrol olarak CIV *iap* siRNA`larının

kullanılması sonucunda GFP ifadesi üzerinde önemli etkisi gözlenmedi. Örnekler UV mikroskopunda DAPI filtresi kullanılarak incelendi.

Tablo 2.2. CIV *iap* geninin susturulması için tasarlanan siRNA sıraları

Gen	siRNA dizisi	hedef bölge*
CIV <i>iap</i>	5' - GACAUGUCCAAUUUGUAAAAdTdT - 3' 3' - dTdTCUGUACAGGUUAAACAUUU - 5'	561-581
	5' - GAUCAGAUAAUCCAUUUGAdTdT - 3' 3' - dTdTCUAGUCUAUUAGGUAAACU - 5'	245-265
<i>egfp</i>	5' - CGGAAAACUUACCCUAAAAdTdT - 3' 3' - dTdTGCCUUUUGAAUGGGAAUUU - 5'	105-125
	5' - GCAGACCAUUAUCAACAAAAdTdT - 3' 3' - dTdTCGUCUGGUAUAGUUGUUU - 5'	523-543

\*CIV *iap* (NP149656) ve *gfp* (U70496) siRNA'larının GenBank verilerine belirlenen hedef bölgeler.

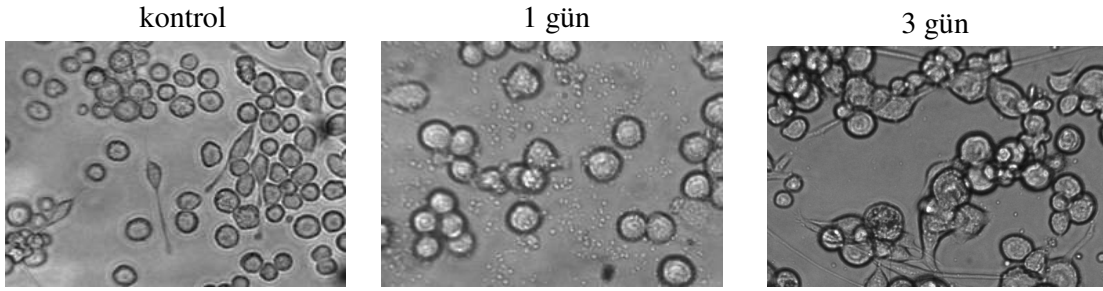
## 2.10. Bakülovirüs Enfeksiyonunda CIV IAP Proteinin Rolü

Apoptosis inhibitör proteinlerinin işlevlerinin test edilmesinde uygulanan etkin yöntemlerden biride apoptosis inhibitör genleri çıkarılmış virüslerde ilgili genin klon olarak veya proteinin virüsünün replike olabileceği ortamda ifadesi sağlanarak gözlenmesidir. Bu amaçla, CIVIAP proteininin bakülovirüs IAP proteinlerine gösterdiği yüksek homoloji nedeniyle bu proteinin AcMNPV'nin model olarak kullanıldığı bir sistemde etkinliğinin araştırılması hedeflendi. CIVIAP ifadesi hücre kültüründe pFB *gfp(ie2)-hr5-(ie1)CIViap* plazmitinin ifadesiyle gerçekleştirildi. CIV *iap* genini ifade eden bu plazmitin transfeksiyonu takiben rekombinant AcMNPV [ $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*)] enfeksiyonu gerçekleştirilerek virüsün replikasyonu gözlemlendi. Mikroskopik analizle AcMNPV polihedraları gözlemlendi. AcMNPV polhedrin proteinine özgü antikor kullanılarak yapılan Western analiziyle sonuçlar kontrol edildi.

### 3. BULGULAR

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

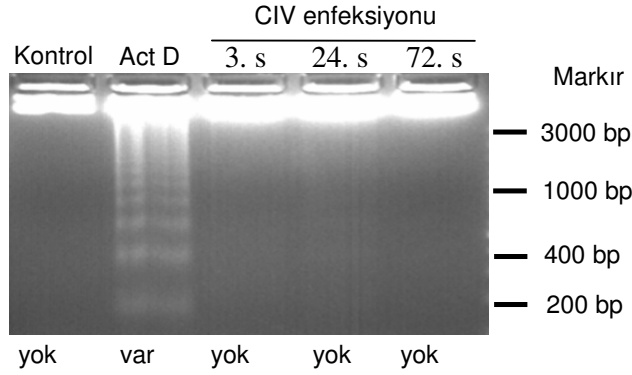
CIV'nin *Bombyx mori* hücrelerinde ki enfektivitesini belirlemek amacıyla yapılan deneyde, enfeksiyonu takip eden 24. saatte hücrelerin çevresindeki besiyerinde dağınık halde bulunan bazı veziküllerin oluşumu gözlemlendi. Bu veziküller apoptotik yapılara benzerlik göstermektedir (Nalçacıoğlu, ve ark., 2003, 2007). *Bombyx mori* hücrelerinde kontrolden farklı olarak gözlenen bu değişiklikler, CIV'nin bu hücrelerde enfeksiyon oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Chilo iridescent virüs*'ün (CIV) *Bombyx mori* hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etkiler. Kontrol; Enfekte olmamış SPC-BM-36 hücreleri. Günler enfeksiyondan sonra geçen zamanları göstermektedir. Büyütme, 200X

CIV'nin SPC-BM-36 hücrelerinde replikasyonu ile ilgili yapılan gözlemler sonucunda enfeksiyonun 24. saatinde gözlenen veziküllerin apoptotik yapı olup olmadığı belirlendi. Apoptosis giren hücrelerin DNA'ları parçalanarak özgün DNA profilleri oluşturduğu bilinmektedir. Bu amaçla apoptosis giren hücrelerin göstermiş olduğu özgün DNA profili belirlendi (Şekil 3.2) ve CIV enfeksiyonunun belirli dönemlerinde hücrelerden elde edilen genomik DNA analiz edildi.

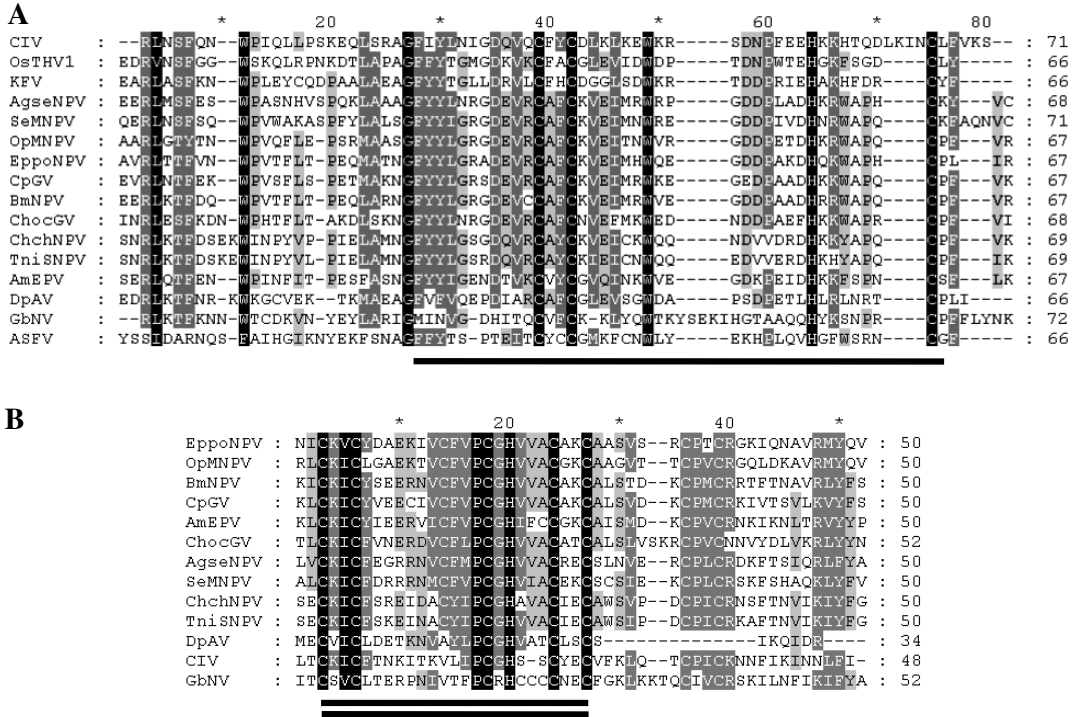
Deney sonucuna göre enfeksiyondan sonra 3 saat, 1. gün ve 3. gün sonunda CIV enfeksiyonunun konak hücrelerde apoptosis neden olmadığı ve viral patogenezin başarılı olduğu belirlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Chilo iridescent virüs*'ün (CIV) *Bombyx mori* SPC-BM-36 hücrelerinde oluşturduğu enfeksiyonda apoptotik etkilerin DNA ladder analizi ile tespiti. Kontrol; Enfekte olmamış SPC-BM-36 hücreleri, Act-D; pozitif kontrol olarak apoptosisin uyarıldığı SPC-BM-36 hücreleri, 3. s; Enfeksiyondan sonra 3. saat, 24. s; Enfeksiyondan sonra 1. gün, 72. s; Enfeksiyondan sonra 3. gün

### 3.2. *Chilo iridescent virüs*'ün (CIV) Muhtemel Apoptosis İnhibitör Genlerinin Biyoinformatik Analizi

Fonksiyonel proteinleri kodlayan apoptosis inhibitör genlerinin en azından bir adet BIR işlevsel bölgesiyle birlikte RING bölgesine sahip olduğu bilinmektedir. Dizi analizi sonucunda muhtemel apoptosis geni olarak önerilen üç gene ait amino asit dizileriyle farklı viral IAP proteinleri arasındaki ilişkiler ve ORF'lerdeki işlevsel bölgeler analiz edildi. BIR ve RING işlevsel gen bölgelerinin tespitinde MegAlign (DNASTAR) programındaki Clustal algoritması kullanıldı. Sonuç olarak CIV genomunda belirtilen üç genden yalnızca birinin (193R) fonksiyonel IAP proteini kodlayan gen olabileceği düşünüldü. Bu gen, farklı virüs gruplarında belirlenen *iap* genlerinin amino asit dizileriyle karşılaştırıldı (Şekil 2.2). Bu karşılaştırma sonucunda bakülovirüs (NPV I, NPV II, GV), nudivirüs, entomopoks virüs, herpes virüs, pikorna benzeri virüs, ascovirüs ve asfavirüslerde belirlenen *iap* genleriyle olan filogenetik ilişkisi tespit edildi.

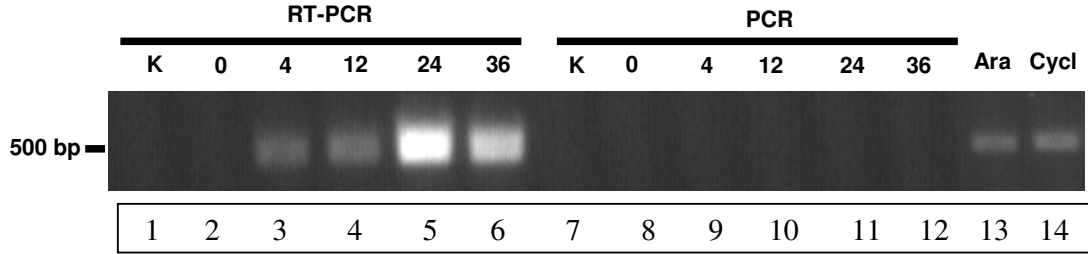


Şekil 3.3. CIVIAP proteininin işlevsel bölgelerinin bilinen bazı viral IAP proteinleriyle karşılaştırılması. (A) BIR işlevsel bölgesi. (B) RING işlevsel bölgesi. Siyah renkle belirtilen özdeş amino asitleri. Koyu gri renkle belirtilen amino asitler korunmuş amino asitleri ve açık gri renkle belirtilen benzer amino asitleri temsil etmektedir. BIR motifi;  $GX_{9-11}CX_2CX_{8-10}E/DX_5HX_{3-6}C$  (Altı çizili olarak gösterilmiştir). RING işlevsel bölgesi C3HC4 motifiyle (Altı çift çizgili olarak gösterilmektedir) temsil edilmektedir. IAP işlevsel bölgeleri karşılaştırılan genlerin bulunduğu organizmalar, CIVIAP; *Chilo iridescent virüs*. OsHV-1; *Ostreid Herpesvirüs 1*. KFV; *Kelp fly virüs*. AgseIAP; *Agrotis segetum NPV*. SeMNPV; *Spodoptera exigua MNPV*. OpIAP; *Orgyia pseudotsugata MNPV*. EppoNPV; *Epiphyas postvittana NPV*. CpIAP; *Cydia pomonella GV*. BmNPV; *Bombyx mori NPV*. ChocNPV; *Choristoneura occidentalis NPV*. ChchNPV; *Chrysodeixis chalcites NPV*, TniSNPV; *Trichoplusia ni*. AmEPV; *Amsacta moorei entomopoks virüs*, DpAV; *Diadromus pulchellus ascovirüs 4a*. GbnV; *Gryllus bimaculatus nudivirüs*. ASFV; *African Swine fever virüs*

### 3.3. CIV iap Geninin Transkriptomik Analizi

CIV iap geninin transkriplerinin *Bombyx mori* hücrelerinde varlığının RT-PCR ile tespiti sonucunda genin transkriptleri SPC-BM-36 hücrelerinde 0 – 36. saatler arasında test edildi. 4. saatten itibaren 36. saate kadar gene özgün transkriptler belirlendi. DNA (Ara-C) ve protein sentezi (Sikloheksimit) inhibitörleri kullanılarak yapılan enfeksiyonlarda,

CIV *iap* transkripti tespit edildi. Sonuç olarak bu bilgiler ışığında CIV *iap* geninin en erken gen grubuna ait bir gen olduğu belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. CIV *iap* transkriplerinin RT-PCR analizi. 1) CIV ile enfekte olmuş *Bombyx mori* hücrelerinden izole edilen total RNA'nın gene özgün primerler kullanılarak yapılmış PCR analizi. K; Kontrol; Enfekte olmamış hücre hattı, 2-6; RT PCR analizi (Enfeksiyon sonrası geçen süre, saat), 8-12; PCR analizi (Enfeksiyon sonrası geçen süre, saat), 13; 24. saatte Ara-C mevcudiyetinde, 14; 24. saatte sikloheksimit mevcudiyetinde CIV ile enfekte olmuş *Bombyx mori* hücrelerinden izole edilen toplam RNA'nın gene özgün primerler kullanılarak yapılmış RT-PCR analizi

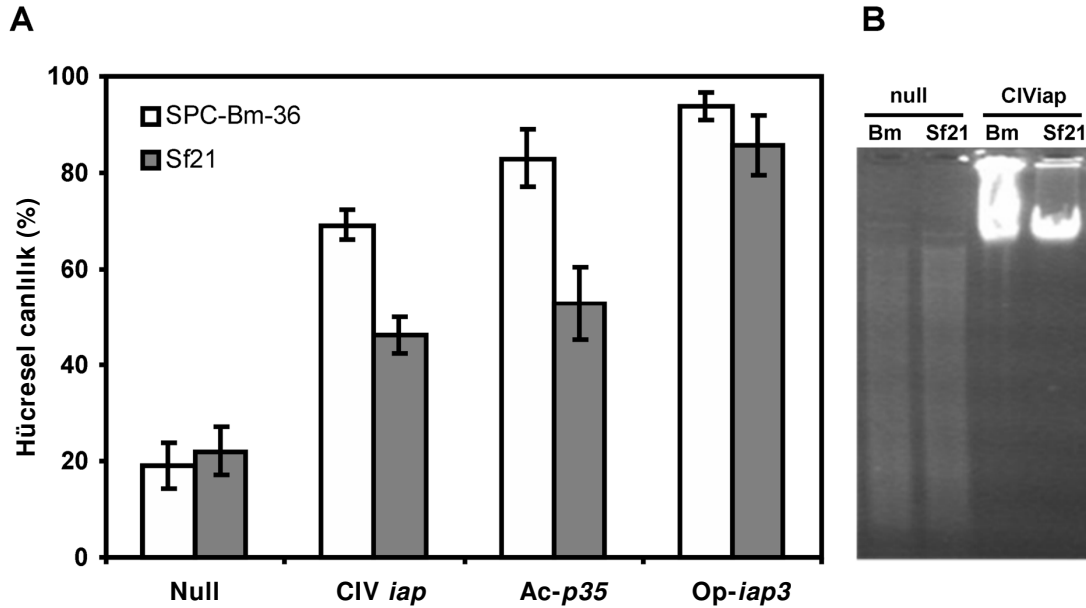
### 3.4. CIV *iap* Geninin Anatmik Analizi

CIV *iap* geninin transkripsiyon başlangıç noktası 5`-ACE analiziyle belirlenerek genin mRNA'sında ki proteine dönüşmeyen kısımlarının baz dizisi tespit edildi. CIV *iap* için elde edilen klonların dizin analizi sonuçları bu genin transkripsiyon başlangıç noktasının, translasyon başlangıç noktası +1 olarak alındığında, -18. pozisyonadaki A bazı olduğunu göstermektedir (Şekil 3.5).

Yapılan 3`UTR analizi sonucunda 52 bp uzunluğunda bir bölge belirlendi. Fakat yapılan aligment analizleri sonucunda CIV genomunda devamlı bu bölge olarak tespit edilemedi. Ayrıca bazı İridovirüslerde olduğu gibi 3` UTR bölgesinde poli A kuyruğu tespit edilmemiştir.



Bu deneyde plazmitlerin transfeksiyonu sonrasında bulundurduğu markır gen *gfp* vasıtasıyla rekombinat plazmitlerin hücelere aktarılıp aktarılmadıkları ve hangi oranda bu olayın gerçekleştiği belirlendi. *gfp* ifade eden hüceler sayısal olarak belirlendikten sonra ActD ile apoptosis bu hücelerde uyarıldı. Negatif kontrol olarak hazırlanan hücelerde apoptosis gözlemlendikten sonra pozitif kontroller ve CIV *iap* geninin ifade edildiği hücelerdeki *gfp* ifade edebilen sağlıklı hüceler belirlenerek apoptosisin uyarılmasından önceki rakamlarla oransal olarak karşılaştırılarak apoptosis inhibitör geni içeren hücelerde apoptosisin baskılanıp baskılanmadığı belirlendi. Her iki hüce hattında da CIV *iap* geninin negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırılması sonucunda apoptosis sürecini baskıladığı belirlendi. CIV *iap* ve *Ac-p35* geninin apoptosis sürecini baskılamada yakın bir etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.6A). Genomik düzeyde apoptosisin belirlenmesi için hücelerden genom izolasyonu yapıldı ve DNA'daki parçalanma belirlendi. Bu deney sonucu da geçici gen ifadesi deneyinin sonucunu desteklemiştir (Şekil 3.6B).



Şekil 3.6. CIV *iap* geninin SPC-BM-36 ve Sf21 hüce hatlarında geçici ifadesi ve apoptosisin uyarılması. A; CIV *iap* geninin geçici ifadesi, B; Hücesel DNA görüntüsünün belirlenmesi. Null; Negatif kontrol, CIV *iap*; *Chilo iridescent virüs*, *Ac-p35* ve *Op-iap3*; Bakülovirüs apoptosis inhibitör genleri



### 3.6. CIV *iap* Geninin RNAi Yöntemiyle Susturulması

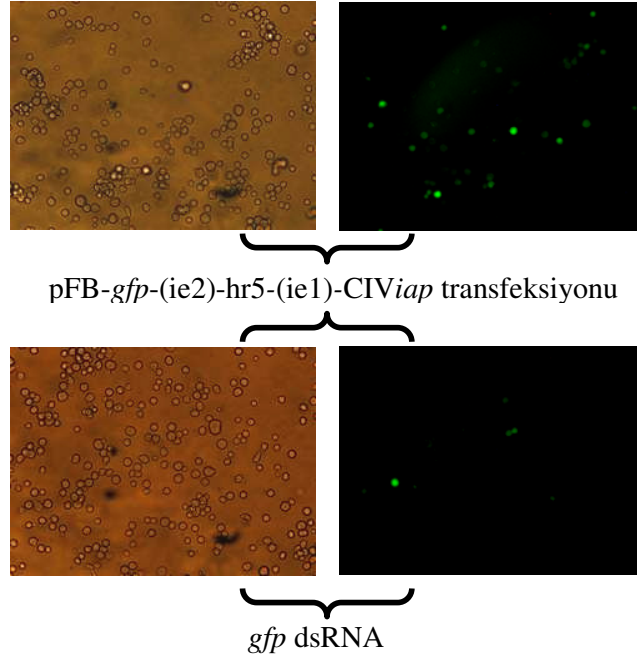
CIV *iap* geninin geçici ifadesi sonucunda apoptosis sürecinin baskılandığının anlaşılmasından sonra genin virüsün doğal enfeksiyon sürecindeki rolünün anlaşılması ve replikasyon sürecinde gerekli bir gen olup olmadığının anlaşılması için RNA susturma tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğin tercih edilmesinin nedeni CIV`de rekombinat virüs oluşturmada karşılaşılan zorluklardır.

Bu amaçla gene özgü sentezlenen dsRNA ve siRNA`lar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar kısmında *in vitro* dsRNA sentezinin detayları verilmiştir. Ayrıca hedef gen için iki farklı siRNA duplesi (Ek Tablo 3) Eurogentec firması tarafından sentezlenmiştir. dsRNA ve siRNA`ların SPC-BM-36 hücrelerine olabilecek olumsuz etkilerinin veya RNA duplekslerinin transfeksiyonunun RNAi`yi baskılaması ihtimalının anlaşılması için hücrelere dsRNA ve siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilerek hücreler gözlemlendi. RNAi sisteminin bu hücrelerde etkin bir şekilde çalışıp çalışmadığının anlaşılması için *gfp*`ye özgü sentezlenen dsRNA (Şekil 3.7A) ve siRNA`lar (Şekil 3.7B) test edildi.

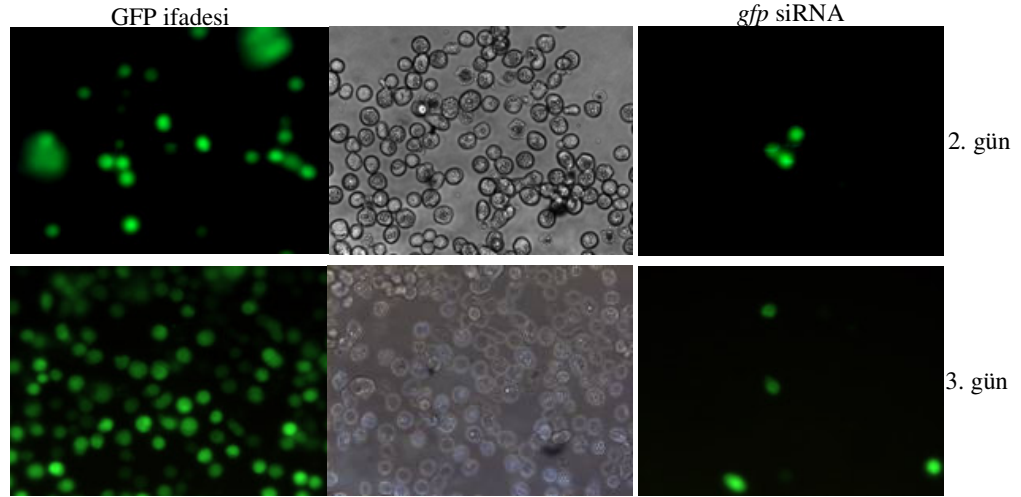
Bu amaçla CIV *iap* geninin geçici ifadesini sağlayan vektör (pFB-CIV*iap*) ve *gfp* dsRNA SPC-BM-36 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Sonuçta bu vektörün transferi sonucunda oluşan GFP sinyali hücrelerde oldukça az gözlemlendi. siRNA etkisi de aynı yolla test edildi ve susturmanın başarıyla gerçekleştirilebildiği belirlendi.

Sonuç olarak RNAi sisteminin SPC-BM-36 hücrelerinde etkili bir şekilde gen ifadesini baskılayabildiği ve bu sistemde RNAi`nin baskılanmadığı belirlendi.

(A)

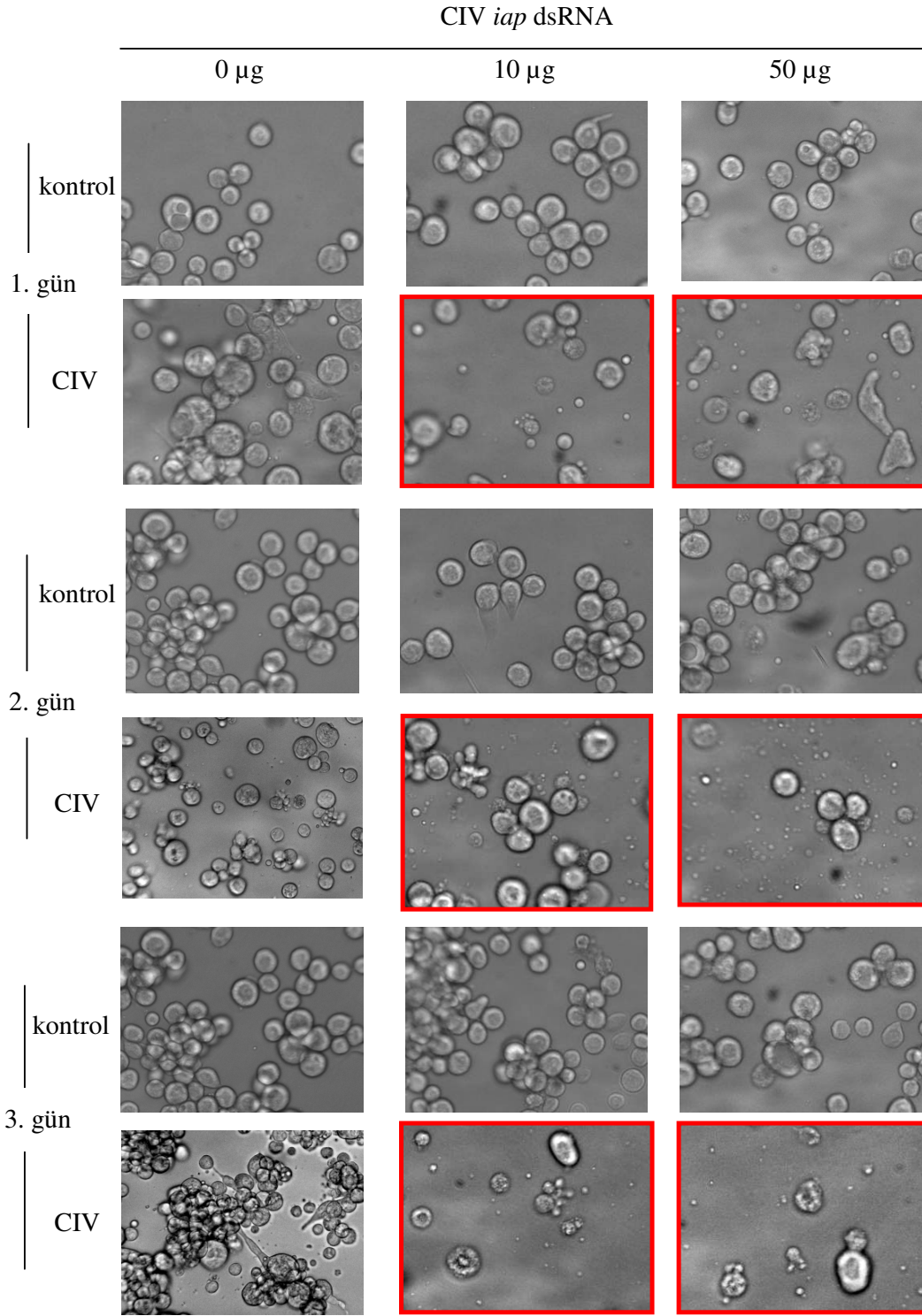


(B)

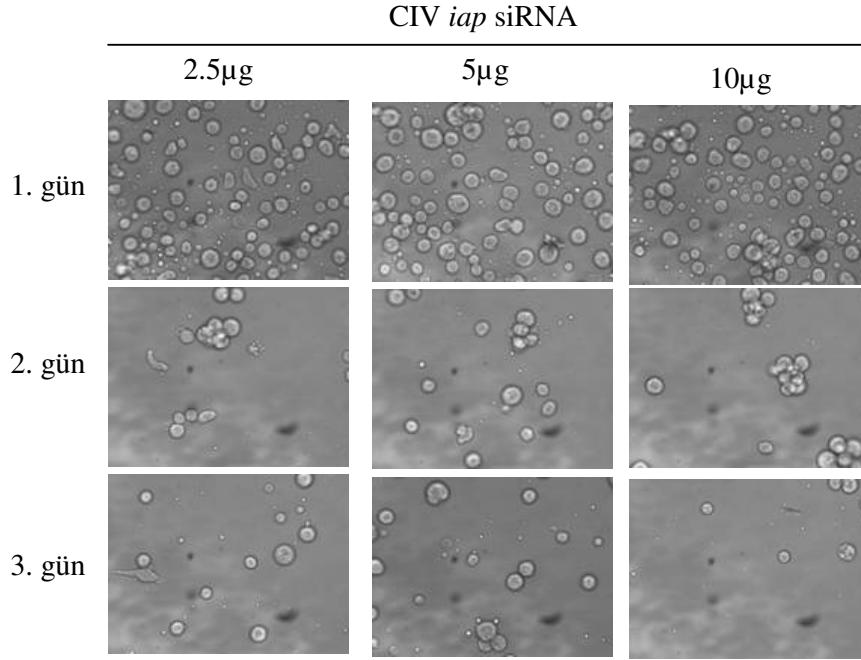


Şekil 3.7. RNAi sisteminin SPC-BM-36 hücrelerinde etkinliğinin kontrolü. A; *gfp* dsRNA'nin pFB-*gfp*-(ie2)-hr5-(ie1)-CIViap transfekte edilen SPC-BM-36 hücreleri üzerine GFP ekspresyonuna etkisi, B; *egfp* siRNA-1 ve *egfp* siRNA-2 ile transfekte edilen Sf21 hücrelerinde EGFP ekspresyonuna etkisi



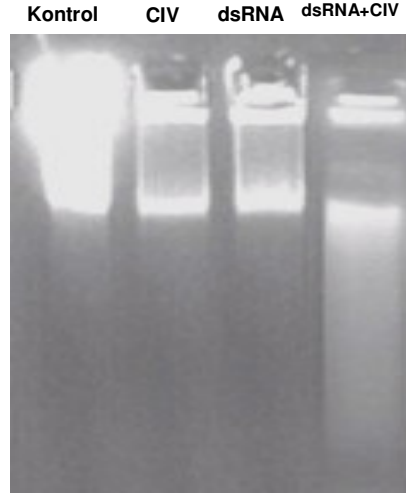


Şekil 3.8. CIV enfeksiyonunda *CIV iap* geninin dsRNA kullanılarak susturulması ve SPC-BM-36 hücreleri üzerinde etkilerinin incelenmesi



Şekil 3.9. CIV enfeksiyonunda CIV *iap* geninin siRNA kullanılarak susturulması ve SPC-BM-36 hücreleri üzerinde etkilerinin incelenmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda, CIV *iap* geninin apoptosis sürecini CIV enfeksiyonunda baskıladığı ve bu genin CIV replikasyonunda etkin role sahip olduğu belirlendi. CIV *iap* siRNA ve dsRNA transfeksiyonunun CIV enfeksiyonunda apoptosise neden olduğu ve CIV *iap* geninin replikasyonda etkili olduğunun anlaşılması için yapılan mikroskopik çalışmalara ek olarak hazırlanan örneklerde genomik DNA izolasyonu yapılarak hücresel genomda apoptosis sonucu meydana gelen özgün DNA fragmentasyonu örneklerde belirlendi (Şekil 3.10). CIV *iap* dsRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde CIV enfeksiyonu sonucunda özgün DNA fragmentasyonu meydana geldiği ve CIV *iap* geninin replikasyon için gerekli olduğu, CIV enfeksiyonunun apoptosisi baskılayarak viral neslin oluşumunu sağladığı anlaşılmıştır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



Şekil 3.10. CIV *iap* geninin gene özgün dsRNA ile susturulmasının apoptosis sürecine etkisi

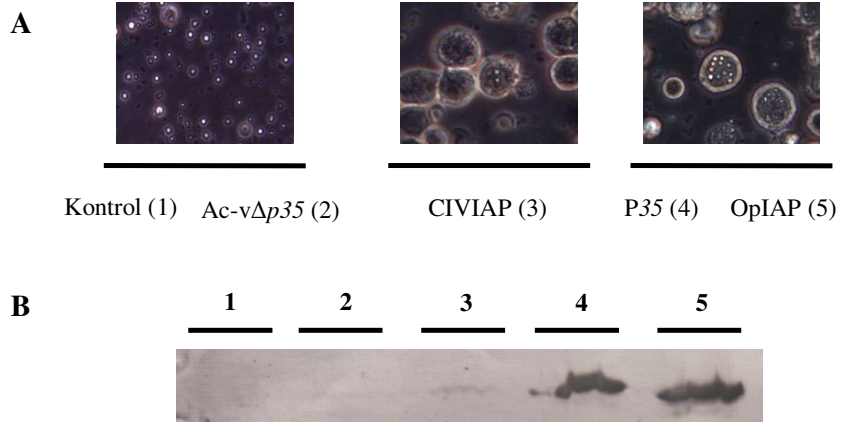
### 3.7. Bakülovirüs Enfeksiyonunda CIVIAP Proteininin Rolü

CIV *iap* ifadesinin  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*) enfeksiyonunda polihedra oluşumuna etkisi gözlemlendi. Sf21 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen bu deneyde  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*) enfeksiyonunun hücreleri apoptosise yönlendirildiği bilinmektedir. Apoptosis geni çıkarılan bu virüs hücrelerin viral enfeksiyon nedeniyle apoptosise girmesini engelleyememektedir.  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*) enfeksiyonuna CIV *iap* ifadesinin etkisi geçici gen ifadesi sağlayan vektörlerin enfeksiyon öncesinde Sf21 hücrelerine transfeksiyonuyla test edildi. Negatif kontrol olarak apoptosis inhibitör geni içermeyen pFB *empty* plazmiti, pozitif kontrol olarak pFB *Ac-p35*, pFB *Opiap* plazmitleri, pFB *CIViap* plazmitiyle gerçekleştirilen bu deneyin değerlendirilmesinde kullanıldı. Plazmitler Sf21 hücrelerine transfekte edildikten belli bir süre sonra (plazmitlerde bulunan genlerin ifadesi gerçekleştikten sonra)  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*) enfeksiyonu (MOI=5) gerçekleştirildi. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerdeki polihedra oluşumu gözlemlendi. Yaban tip AcMNPV enfeksiyonunda Sf21 hücre hattında polihedra oluşumu gözlemlendiği bilinmektedir.

CIV *iap* ifadesinin Sf21 hücre hattında  $\Delta p35$  AcMNPV enfeksiyonunda apoptosisi baskılayarak polihedra oluşumunu sağladığı tespit edildi. Polihedra oluşumu enfeksiyondan sonra 48. saatte belirgin hale geldi. OpIAP3, Ac-P35 ve CIVIAP ifade eden

plazmitlerin polihedra oluşumunda farklı düzeylerde etkili olduğu görüldü. Negatif kontrol plazmitini bulunduran ve  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*) ile enfekte edilen hücrelerin ise hızlı bir şekilde apoptosis sürecine girdiği belirlendi. Bu deneyde, polihedra oluşumu AcMNPV polihedrin antikoru kullanılarak Western blot analiziyle tespit edildi ve bu sonuçlar mikroskopik gözlemlerle paralel olduğu belirlendi (Şekil 3.11).

Sonuç olarak Sf21 hücre hattında gerçekleştirilen bu deneyde CIV *iap* ifade eden plazmitin tranfeksiyonu hücrelerin prematüre ölümlerini engellemiş ve apoptosisin baskılanarak hücrelerde *vAc-p35* (*polh+*) enfeksiyonu sonucunda polihedra oluşumunu *p35* veya *Op-iap* ifade eden plazmitlerin ifade edildiği hücelere oranla daha düşük bir verimle gerçekleştirdiği gözlenmiştir.



Şekil 3.11. CIVIAP proteinin bakülovirüs sistemindeki rolü. 1; Kontrol (pFB empty), 2;  $v\Delta p35$ AcMNPV enfeksiyonu, 3; CIVIAP ifadesi, 4; P35 ifadesi, 5; OpIAP ifadesi

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada CIV replikasyonunun ve deneylerde kullanılması planlanan vektörlerin ifadesinin verimli şekilde gerçekleştirileceği hücre hattı belirlenerek çalışmaların SPC-BM-36 ve Sf21 hücre hatlarında yapılması uygun görüldü. Bu hücre hatları dışında da CIV replike olduğu bilinmektedir. Fakat bu hücrelerdeki verimlilik düzeyleri farklılıklar göstermektedir. Constantino ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucunda Diptera ve Lepidoptera kaynaklı 12 hücre hattında CIV'nın replike olduğu belirlenmiştir (Constantino, vd., 2001). CIV replikasyon sürecinde yapılan gözlemlerde belirlenen önemli bir bulgu, enfeksiyonun ilk günü sonucunda CIV'nın hücrelerde yoğun bir vezikül oluşumunun gözlendi (Şekil 3.1). Bu veziküllerin enfeksiyonun ilerleyen safhalarında kaybolduğu ve hücrelerde CIV patolojisinin normal seyrinde devam ettiği belirlendi. Bu veziküllerin apoptotik bir yapı mı yoksa CIV replikasyonunda başka bir role mi sahip olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle apoptotik hücrelerde karakteristik olan oligonükleozomal ladder oluşumu hazırlanan örneklerde incelendi fakat herhangi bir oluşum gözlenmedi (Şekil 3.2). Replikasyonun geç evresinde böyle bir oluşumun viral neslin komşu hücrelere yayılmasında rol alabileceği düşünülmektedir. RSBIV (*Red Sea Bream Iridovirus*) benzer bir mekanizmayla bu vezikülleri kullanarak viral neslin yayılmasını sağlamaktadır (Imajoh vd., 2004). NPV enfeksiyonunda erken olaylar kadar geç olayların bu şekilde apoptotik sürecini kontrol ettiği literatür kayıtlarında belirtilmektedir (Alnemri vd., 1992; Teodoro ve Branton, 1997; LaCount ve Friesen, 1997). *iap* geninin viral enfeksiyon sürecinde gerekli olduğu ilk olarak Means ve arkadaşları tarafından (2003) Ld652Y hücre hattında OpMNPV ile gerçekleştirdikleri çalışmalarla belirlenmiştir.

Bu tezde, CIV apoptosis inhibitör genleri ve işlevsel analizleri üzerinde çalışmalar gerçekleştirildi. Bu genlerin varlığı Jacob ve arkadaşları (2001) tarafından CIV genom analizi sırasında belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgilere göre 157L, 193R ve 332L'nin *Cydia pomonella* granülovirüs IAP proteiniyle yüksek homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir. Amino asit dizi homolojisine dayalı olan bu benzerlik ile diğer *iap* genleri arasındaki benzerlik ilk olarak CpGV (Crook vd., 1993), AcMNPV (Clem ve Miller, 1994), ve



OpMNPV`de (Birnbaum vd., 1994) tanımlanmıştır. IAP proteinleri amino uçlarında bulunan bakülovirüs inhibitör tekrarı (BIR) olarak isimlendirilen protein motifine sahip olup olmamasıyla tanımlanır. Genellikle IAP proteinleri 1-3 tane BIR motifine sahiptir. BIR motifi bazı kaspazların inhibisyonunda ve dolayısıyla IAP proteinlerinin anti apoptotik işlevlerinden sorumludur. Şu ana kadar belirlenen tüm aktif IAP proteinlerinde BIR işlevsel gen bölgesi belirlenmiştir. Bu bağlamda üç ORF üzerinde yapılan motif analizi sonucunda yalnızca CIV ORF 193R`nın BIR işlevsel gen bölgesine sahip olduğu belirlendi. Ayrıca ORF 193R`nın karboksi ucunda RING finger motifine sahip olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda şu ana kadar tanımlanmış IAP ailesine ait proteinlerinin apoptosise neden olabileceği belirlenmemiştir. Yapılan Blast ve filogeni analizleri sonucunda CIV ORF 193R BIR motifinin bakülovirüs BIR2 motiflerine daha yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. Ayrıca, CIV *iap* geninin (ORF193R) bakülovirüsler dışında Ostreid herpes virüs, Kelp fly virüs, *Amsacta moorei* EPV, ASFV (African Swine Fever Virus) ve Ascovirüs (*Diadromus pulchellus* ascovirüs 4a) genomunda bulunan BIR ve RING finger işlevsel bölgeleriyle homolojiye sahip bölgelere sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Şu ana kadar 12 iridovirüsün genom analizi tamamlanmıştır. Bunlar arasında sadece CIV genomunda *iap* geni homologu tespit edildi. Biyoinformatik analizler ve literatür kayıtlarından elde edilen bilgiler ışığında CIV ORF 193R`nın muhtemel apoptosis inhibitör geni olduğuna karar verildi ve çalışmaların devamı ORF 193R üzerinde gerçekleştirildi.

İlk olarak bu genin transkripsiyonel olarak aktif olup olmadığı belirlendi. Genin transkripsiyonel analizi RT-PCR kullanılarak gerçekleştirildi ve gene özgü transkriptler enfeksiyon sonrası 4. saatte görülmeye başlanmıştır. Ayrıca protein sentezi inhibitörü siklohekzimit (Cyc) ve DNA sentezi inhibitörü sitozin  $\beta$ -D-arabino-furanozit (Ara-C) varlığında gerçekleştirilen enfeksiyonlarda da gene özgü transkriptler belirlendi (Şekil 3.4). Bu sonuca göre genin transkripsiyonel olarak aktif ve “en erken” genin grubuna ait bir gen olduğu belirlendi. Enfeksiyonun erken fazında işlev göstermesi Viral nesli garanti altına almak için viral enfeksiyon sonucunda konak hücrelerin apoptosis sürecine girmesini engellediği düşünülmektedir. Transkripsiyonel olarak aktif bir gen olduğunun anlaşılmasından sonra genin transkripsiyon başlangıç noktası 5` ACE analizi ile belirlendi ve translasyon başlangıç noktası ATG`nin A bazı +1 kabul edildiğinde -18. bölgedeki A bazı olduğu belirlendi (Şekil 3.5).

Genin fonksiyonel analizinde hücre kültüründe geçici gen ifadesiyle ve CIV enfeksiyonunda RNAi sistemi kullanılarak *iap* geninin susturulmasıyla test edildi. İlk aşamada CIV *iap* geninin geçici gen ifadesi SPC-BM-36 ve Sf21 hücrelerinde pFast Bac Dual vektöründen hazırlanan pFB *gfp*-(*ie2*)-hr5-(*ie1*)-CIV*iap* vektörü kullanılarak gerçekleştirildi ve apoptosis süreci Aktinomisin D kullanılarak uyarıldı. Pozitif kontrol olarak CIV *iap* geni yerine anti apoptotik etkisi bilinen *Ac-p35*, *Op-iap3* pozitif kontrol ve boş vektör negatif kontrol olarak kullanıldı. SPC-BM-36 ve Sf21 hücrelerinde gerçekleştirilen deneylerde CIV *iap* geninin Aktinomisin D ile teşvik edilen apoptosisi baskılamada farklı oranlarda etkili olduğu belirlendi (Şekil 3.6A). Ayrıca bu örneklerden hazırlanan genomik DNA numunelerinde oligonükleozomal ladder analizi yapılmış ve genomda apoptosis sürecinin karakteristik özelliği olan parçalanma gözlenmedi ve bu sonucun önceki elde edilen sonuçlarla tutarlılık gösterdiği belirlendi (Şekil 3.6B).

İridovirüslerde genetik manipülasyonların zorluğu, mevcut bir bakmit sisteminin olmayışı ve CIV DNA'sının enfektif olmayışı bu gruptaki virüslerle ilgili genlerin işlevsel rollerinin aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle alternatif bir yol olarak ele aldığımız ve bakülovirüslerde başarılı denemeleri olan (Means vd., 2003) RNA interference tekniği viral genetik mutantların oluşturulmasında kullanıldı. Bu teknik viral replikasyonun baskılanmasında dengue virüs, HIV, Rous sarcoma virüs, Semliki forest virüs ve Hepatit B virüsünde etkili bir şekilde kullanılmıştır (Adelman vd., 2001; Caplen vd., 2002; Coburn ve Cullen, 2002; Hu vd., 2002; McCaffrey vd., 2003). Bu bilgiler doğrultusunda Çalışmada RNAi tekniğinin CIV genlerinin fonksiyonel analizinde viral mutantların hazırlanmasında kullanılabilecek etkili bir yöntem olabileceği düşünüldü. Fakat bazı virüslerin enfeksiyonda RNAi'nin baskılanmasına neden olduğu bilindiğinden (Li vd., 2002; Anandalakshmi vd., 1998) *Chilo iridescent* virüs genlerinin susturulmasında etkili olup olamayacağı bilinmemekteydi. Bakülovirüslerde RNAi'nin viral enfeksiyon tarafından baskılanmadığı DNA virüslerinde ilk olarak Means ve arkadaşları (2003) tarafından belirlenmiştir. CIV`de bu durum dsRNA ve siRNA kullanılarak yapılan deneylerle viral enfeksiyonun RNAi`yi baskılamadığı markır gen *gfp* üzerinde yapılan deneylerle belirlendi (Şekil 3.7A-B). Bu tekniğin DNA virüslerinde etkili olarak kullanılabildiği Means ve arkadaşları tarafından (2003) Op-IAP3 üzerinde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.

CIV *iap* genine özgü sentezlenen dsRNA (Şekil 3.8) ve siRNA`ların (Şekil 3.9) kullanılmasıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda CIV enfeksiyonunda *iap* ifadesinin gerekli olduğu ve *iap* ifadesinin RNAi tekniğiyle CIV enfeksiyonunda susturulabildiği belirlendi. CIV enfeksiyonunda *iap* geninin susturulmasının transfekte edilen dsRNA ve ya siRNA dozuna bağlı olarak apoptosis sürecini hızlandırdığı ve viral replikasyonu baskıladığı belirlendi. Bu hücre numunelerinden hazırlanan genomik DNA`larda oligonükleozomal ladder analizi yapılarak sonuçlar doğrulandı (Şekil 3.10).

RNAi tekniğinin yalnızca bakülovirüslerde değil geleneksel yöntemlerle genetik manipülasyonu zor olan diğer virüs gruplarında da genlerin fonksiyonel analizinde kullanışlı bir teknik olarak kullanılabileceği yapılan çalışmalar sonucunda belirlendi.

Ayrıca CIV *iap* geninin  $\Delta p35$  AcMNPV ye aktarılarak bu virüste polihedra oluşumu dolayısıyla viral replikasyonu sağlamada etkili olup olmadığı belirlendi. CIV *iap* geni taşıyan  $\Delta p35$  AcMNPV rekombinant virüs Sf21 hücre hattında polihedra oluşumu sağlayamadığı ve hücrelerin apoptosis sürecine girdiği belirlendi ve bu yöntemle CIV *iap* geninin anti apoptotik etkisinin tespiti gerçekleştirilemedi. Bu nedenle hücreler enfeksiyondan bir gün önce *Ac-p35*, *Opiap3* ve CIV *iap* genleri taşıyan ve negatif kontrol olarak apoptosis inhibitör gen, bulundurmayan pFast Bac Dual vektörleriyle transfekte edildi ve sonrasında  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh* +) ile enfekte edildi. Bu enfeksiyon sonucunda fonksiyonel *iap* genine sahip plazmiti içeren hücrelerde AcMNPV`ye ait polihedraların gözlenmesi beklendi. Western analiziyle hücrelerden elde edilen protein özütlerinde polihedrin proteinlerinin varlığının tespit edilmesi (Şekil 3.11 B) ve mikroskopik analiz sonucunda doğrulanması (Şekil 3.11 A), CIV *iap* geninin ifade edildiği hücrelerde anti apoptotik gen bulundurmayan AcMNPV`nin replike olduğunu gösterdi. Bu hücrelerde pozitif kontrollere nazaran az miktarda polihedra oluşumu belirlendi.

Sonuç olarak tüm bu veriler ışığında “CIV ORF 193R fonksiyonel olarak aktif bir anti apoptotik protein kodlamaktadır” diyebiliriz. Bu aktif protein ayrıca CIV replikasyonu için gerekli bir gen olduğu, viral enfeksiyonun erken fazında ifade edilerek konak hücrenin apoptosis sürecini baskıladığı ve sonuç olarak viral replikasyonun devamını dolayısıyla neslin devamını sağladığı söylenebilir. Bu gen iridovirüslerde belirlenen ilk ve tek aktif *iap* genidir.

## 5. SONUÇLAR

CIV enfeksiyonunun başlangıç aşamasında 1. güne kadar hücre kültüründe bazı veziküllerin oluştuğu gözlemlendi. Bu veziküllerin enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında kaybolduğu ve CIV enfeksiyonunun doğal seyrinde süregeldiği gözlemlendi. Hücresel DNA görüntüsünün incelenmesi sonucunda bu yapıların apoptotik yapılar olmadığı enfeksiyonun doğal seyrinde ortaya çıkan yapılar olduğu belirlendi. Bu veziküllerin işlevi veya enfeksiyonda bir rolleri olup olmadığı henüz aydınlatılmamıştır.

CIV genomunun Jacob ve arkadaşları tarafından (2001) aydınlatılmasından sonra genomda belirlenen muhtemel apoptosis genleri üzerinde *in silico* olarak yapılan analizler sonucunda sadece ORF 193R geninin diğer fonksiyonel apoptosis inhibitör genlerinde olduğu gibi BIR işlevsel bölgesi ve RING parmak motifine sahip olduğu belirlendi ve diğer önerilen ORF'lerin büyük ihtimalle bir apoptosis inhibitör proteini kodlamadığına karar verildi. *In silico* analiz sonucunda CIV *iap* geninin *iap* gen ailesinde çoğunlukla *iap-2* ve ya *iap-3* grubu genlere yüksek oranda homoloji gösterdiği belirlendi. Ayrıca bakülovirüs *iap* genleri dışında DpAV 4a *iap* genine, Kelp fly virüs *iap* genine, Asfavirüs ve entomopoks virüslerde belirlenen *iap* genlerine yüksek homoloji gösterdiği belirlendi.

CIV *iap* geninin transkripsiyonel analizi RT-PCR analizi ile gerçekleştirilerek, genin en erken gen grubuna ait bir gen olduğu belirlendi. Ayrıca genin 18 bp'lik bir 5' UTR bölgesine sahip olduğu ACE analiziyle belirlendi. 3' UTR analizi için gerekli metotlar geliştirilerek ilk sonuçlar elde edildi. CIV *iap* geninin 3' UTR bölgesinde belirlenen bölgenin CIV genomunda CIV *iap* geninin aşağı bölgesinde tam olarak eşleştiği bir bölge belirlenemedi. Ayrıca CIV *iap* transkriptinde poli-A kuyruğu bulunmadığı belirlendi.

Bu çalışma sonucunda CIV ORF 193R'n fonksiyonel bir *iap* geni olduğu yapılan geçici gen ifadesi sistemi, özgün DNA profili ve RNAi deneyleriyle gösterildi. Bu genin ActD ile teşvik edilen apoptosis sürecini baskılamada etkili olduğu ayrıca  $\Delta p35$  AcMNPV (*polh+*) virüsünde önceden genin hücre hattında ifadesi durumunda apoptosisi baskıladığı ve polihedra oluşumunu sağladığı belirlendi.

Gerçekleştirilen RNAi çalışmaları sonucunda gene özgü sentezlenen dsRNA ve siRNA'larla yapılan deneyler CIV *iap* geninin enfeksiyon sürecinde konak hücrenin apoptosise girişini engelleyerek başarılı bir enfeksiyonun gerçekleşmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada CIV enfeksiyonunda genin etkinliğinin görülmesi açısından

önemli bir sonuç ortaya çıkarmıştır. Paul ve arkadaşları (2007) tarafından CIV viriyon ekstraktıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, viriyon ekstraktının SPC-BM-36 hücrelerinde apoptosise neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre CIV enfeksiyonlarında apoptosis sürecini baskılayan bir genin varlığını desteklemektedir.

CIV *iap* genin aktif bir *iap* geni olduğunun belirlenmesiyle şu ana kadar bu familya da belirlenen ilk fonksiyonel gen belirlenmiştir. Şu ana kadar 12 iridovirüs'ün genom haritası çıkarılmıştır. Bunlar içerisinde ilk ve tek BIR ve RING motifi sadece CIV`de bulunduğu ve bu genin aktif role sahip olduğu belirlendi. Bu nedenle CIV`de bu genin rolünün detaylı olarak aydınlatılması iridovirüslerin biyolojisinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Yeni literatür kayıtlarında da belirlendiği gibi bazı virüslerin apoptosis mekanizmasını replikasyonlarının belirli dönemlerin viral neslin hücreler arası dağılımı ve dolayısıyla virüs neslinin dağılmasını sağladığı belirlenmiştir. Bu ikilemin aydınlatılması ve apoptosis ile baskılanması sürecinin viral replikasyona, enfektiviteye ve virüs konak etkileşimine ne gibi etkilerinin olduğunun aydınlatılması virüslerle ilgili yapılması planlanan çalışmalara ışık tutması beklenmektedir. Ayrıca CIV`nin anatomik yapısının ve enfeksiyon sürecinin değerlendirilmesi sonucunda bu virüslerde diğer gruplarda bulunmayan bir anatomik yapı bulunduğu tespit edilmiştir. Bu yapının nasıl ortaya çıktığının anlaşılması ve replikasyondaki rollerinin anlaşılması oldukça önemlidir.

## 6. ÖNERİLER

Tezin tartışma bölümünde de belirtildiği gibi literatürdeki bilgilere göre *Iridoviridae* familyasında belirlene ilk *iap* geni olması nedeniyle bu genin işlevlerinin detaylı aydınlatılması ve etkili bir promotörün belirlenmesi oldukça önemlidir. Özellikle CIV genlerinin kendi promotör bölgelerinin belirlenmesi ve içerdikleri motiflerin tespiti CIV`de gen işleyişinin anlaşılmasında önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca bu tez çalışmasında geliştirilen 3` ACE analizi yöntemiyle CIV genlerinin transkripsiyon sonlanma bölgelerinin tespiti ve CIV`de transkripsiyonun sonlanma sisteminin aydınlatılması bu çalışma sonrasında yapılması gereken öncelikli çalışmalardandır.

Ayrıca CIV`nın enfeksiyon oluşturduğu hücre kültürlerinde etkin bir şekilde kullanılacak bir bakmit sisteminin geliştirilmesi CIV genlerinin işlevlerinin aydınlatılmasında oldukça kullanışlı bir yol açacaktır. Bu amaçla, CIV genlerinin transfer edilerek rekombinant virüs sisteminin oluşturulabilecek bakülovirüs BmNPV kullanılabilir. Bu sistem CIV genlerinin işlevsel analizlerinin gerçekleştirilebilmesinde yeni bir imkan sağlayabilir. CIV`de bu tip rekombinasyonların gerçekleştirilmesinde karşılaşılan zorlukların üstesinden gelinebilir.

CIV enfeksiyonunun sebep olduğu vezikül oluşumunun virüsün biyolojisinde ne gibi bir rolü olduğunun aydınlatılması yapılması gereken öncelikli çalışmaların başında gelmelidir. Bu veziküllerin günümüzde iridovirüslerin replikasyonunda önemli rollere sahip olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca bu virüsün *Iridoviridae* familyasının özelliklerinin anlaşılması için model bir organizma rolü üstlenmesi nedeniyle yapısal proteinlerinin belirlenmesi ve fonksiyonel analizlerinin yapılması oldukça önemlidir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adelman, Z.N., Blair, C.D., Carlson, J.O., Beaty, B.J. ve Olson, K.E., 2001. Sindbis virus–induced silencing of dengue viruses in mosquitoes. Insect Molecular Biology, 10, 265–273.
- Alfonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Balinsky, C.A., Moser, B.A., Becnel, J.J., Rock, D.L. ve Kutish, F., 2001. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. Journal of Virology, 75, 11157–11165.
- Alnemri, E.S., Robertson, N.M., Fernandes, T.F., Croce, C.M. ve Litwack, G. 1992. Overexpressed full length human BCL–2 extends the survival of baculovirus–infected Sf9 insect cells. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 89, 7295–7299.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J. Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. ve Vance, V.B., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95, 13079–13084.
- Arif, B.M., 1986. The structure of the viral genome. Current Topics Microbiology and Immunology, 131, 21–29.
- Bahr, U., Tidona, C.A. ve Darai, G., 1997. The DNA Sequence of *Chilo Iridescent Virus* between the Genome Coordinates 0.101 ve 391; Similarities in coding strategy between insect and vertebrate Iridoviruses, Virus Genes, 15, 235–245.
- Bertin, J., Mendrysa, S.M., LaCount, D.J., Gaur, S., Krebs, J.F., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J. ve Friesen, P.D. 1996. Apoptotic suppression by baculovirus *p35* involves cleavage by and inhibition of a virus–induced CED–3/ICE–like protease. Journal of Virology, 70, 6251–6259.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J. ve Miller, L.K., 1994. An apoptosis–inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a peptide with Cys/His sequence motif. Journal of Virology, 68 2521–2528.
- Blissard, G., Black, B., Crook, N., Keddie, B.A., Possee, R., Rohrmann, G. ve Theilmann, D.A., Volkman, L., 2000. "Family *Baculoviridae*" In: van Regenmoertel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. eds., *Virus Taxonomy–Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, San Diego, 195-202, pp.
- Blissard, G.W. ve Rohrmann, G.F., 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annual Review of Entomology, 35, 155–172.
- Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K. Chen, P., Ferenz, C., [Franklin](#), S., [Ghayur](#), T. ve [Li](#), P., 1995. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein P35. Science 269: 1885 – 1888.

- [Caplen](#), N.J., Zheng, Z., Falgout, B. ve Morgan, R.A., 2002. Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. Molecular Therapy, 6, 243–251.
- Carter, J.B., 1973. The mode of transmission of *Tipula Iridescent Virus*. II. Route of Infection, Journal of Invertebrate Pathology, 21, 136–143.
- [Cartier](#), A., [Komai](#), T. ve Masucci, M.G., 2003. The US3 protein kinase of *herpes simplex virus 1* blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. Experimental Cell Research, 291, 242–250.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1980. Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an Invertebrate virus (Iridovirus Type 6 or CIV), Archives of Virology, 63, 297–303.
- Cerutti, M., Guerillon, J., Arella, M. ve Devauchelle, G., 1981. Replication of Type 6 Iridovirus in various cell lines, Comptes Rendus – Academie des Sciences, Serie III, 292, 797–802.
- 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.
- Clem, R.J., 2001. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. Cell Death and Differentiation, 8, 137–143.
- Clem, R.J. ve Miller, L.K., 1994. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. Molecular and Cellular Biology, 14, 5212–5222.
- Clem, R.J., Fechheimer, M. ve Miller, L.K., 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science, 254, 1388–1390.
- Coburn, G.A. ve Cullen, B.R., 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. Journal of Virology, 76, 9225–9231.
- Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochemical Journal, 326, 1–16.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C. F. ve Williams, T., 2001. A comparison of techniques for detecting *Invertebrate iridescent virus 6*. Journal of Virological Methods, 98, 2, 109–118.
- Crook, N.E., Clem, R.J. ve Miller, L.K., 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. Journal of Virology, 67, 2168–2174.
- Day, M.F. ve Mercer, E.H., 1964. Properties of an Iridescent virus from the beetle *Sericothis Pruinosa*, Australian Journal of Biological Sciences, 17, 892–902.
- D'Costa, S., Yao, H. ve Bilimoria, S., 2001. Transcription and temporal cascade in *Chilo iridescent virus* infected cells, Archives of Virology, 146, 2165–2178.
- Delius, H., Darai, G. ve Flugel, R.M., 1984. DNA analysis of *Insect Iridescent Virus 6*: evidence for circular permutation and terminal redundancy, Journal of Virology, 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,.
- [Deveraux, Q.L.](#), [Stennicke, H.R.](#), [Salvesen, G.S.](#) ve [Reed, J.C.](#), 1999. Endogenous inhibitors of caspases. Journal of Clinical Immunology, 19, 6, 388–398.
- Deveraux, Q.L. ve J.C. Reed., 1999. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. Genes and Development, 13 239–252.
- Dobbelstein, M. ve Shenk, T., 1996. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI–2 (B13R) gene product. Journal of Virology, 70, 6479–6485.
- Eaton, B.T., Hyatt, A.D. ve Hengstberger, S., 1991. Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification, Journal of Fish Diseases, 14, 157–169.
- Fadok, V., Voelker, D.R. Campbell, P.A. Cohen, J.J. Bratton, D.L. ve Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. The Journal of Immunology, 148, 2207–2216.
- Fener, F., 1976. The classification and nomenclature of viruses. Second report of the international committee on taxonomy of viruses. Intervirology, 7, 1-115.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H. ve Darai, G., 1988. 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., Delius, H., Rösen-Wolff, A. ve Darai, G., 1990. Molecular biology of insect iridescent virus, in: Molecular Biology of Iridoviruses, Kluwer, Boston, Dordrecht, London, 47–80, pp.
- Fraser, M.J., 1987. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosisinfected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research, 95, 189–195.
- Friesen, P.D. ve Miller, L.K., 1987. Divergent transcription of early 35– and 94–kilodalton protein genes encoded by the *HindIII* K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Virology, 61, 2264 – 2272.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A *Chilo iridescent virus* (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), Applied Entomology and Zoology, 1, 69–72.
- Fukuda, T., 1971. Per os transmission of *Chilo iridescent virus* to mosquitoes, Journal of Invertebrate Pathology, 18, 152–153.
- Goorha, R., 1979. Frog virus 3 requires RNA polymerase for its replication, Journal of Virology, 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.

- 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.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, Journal of Virology, 21, 802–805.
- Grace, T.D.C., 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissue grown *in vitro*. Nature, 195, 788–789.
- Green, M.C., Monser, K.P. ve Clem, R.J., 2004. Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. Virus Research, 105, 89–96.
- Hama, H., 1968. On the cross-inoculation of *Chilo iridescent virus* (CIV). Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 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.
- Hay, S. ve Kannourakis, G., 2002. A time to kill: Viral manipulation of the cell death program. Journal of General Virology, 83, 1547–1564.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature, 407, 770–776.
- Hernandez, O., Maldonado, G. ve Williams, T., 2000. An epizootic of patient iridescent virus disease in multiple species of blackflies in Chiapas, Mexico. Medical and Veterinary Entomology, 14, 458–462.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A. Cory, J.S. and O'Reilly, D.R., 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. Annual Review of Entomology, 48, 211–234.
- Hozak, R.R., Manji, G.A. ve Friesen, P.D., 2000. The BIR motifs mediate dominant interference and oligomerization of inhibitor of apoptosis Op-IAP. Molecular and Cellular Biology, 20, 1877–1885.
- Hu, W.Y., Myers, C.P., Kilzer, J.M., Pfaff, S.L. ve Bushman, F. D., 2002. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. Current Biology, 12, 1301–1311.
- Ikonomou L, Schneider Y.J. ve Agathos S.N., 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, 62, 1, 1–20.
- Imajoh, M., Sugiura H. ve Oshima, S, 2004. Morphological changes contribute to apoptotic cell death and are affected by capsase-3 and caspase-6 inhibitors during red sea bream iridovirus permissive replication. Virology, 322, 220–230.
- 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, 96-182.
- [Jarvis D.L.](#), [Weinkauff C.](#) ve [Guarino L.A.](#), 1996. Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. [Protein Expression and Purification](#), 8, 191–203.

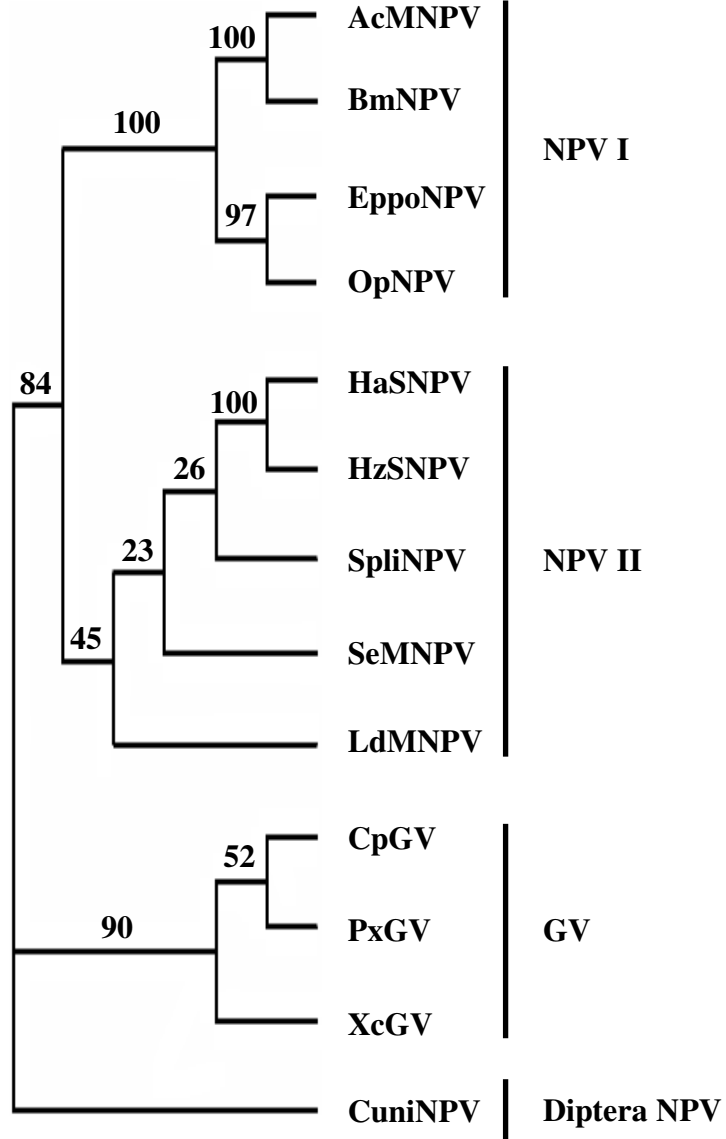
- Jarvis DL., 2003. Developing baculovirus–insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. Virology, 310, 1, 1–7.
- Jerome, K.R., Fox, R., Chen, Z., Sears, A.E., Lee, H. ve Corey, L., 1999. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, *Us5* and *Us3*. Journal of Virology, 73, 8950–8957.
- Kelly, D.C., 1985. Insect iridescent viruses, Current Topics on Microbiology and Immunology, 116, 23–35.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 26, 239–257.
- Kleespies, R.G., Tidona, C.A. ve Darai, G., 1999. Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range, Journal of Invertebrate Pathology, 73, 84–90.
- LaCount, D.J. ve Friesen, P.D., 1997. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. Journal of Virology, 71, 1530–1537.
- Lange, J.D., 2006. Functional analysis of *HearNPV iap-2* and *iap-3* genes. Wageningen University, MSc Thesis.
- Leopardi, B., Van Sant, C. ve Roizman. B., 1997. The *herpes simplex virus 1* protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, 7891–7896.
- Li, H., Li, W.X. ve Ding, S.W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. Science 296, 1319–1321.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D.R. ve Winstanley, D., 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. Journal of General Virology, 82, 2531–2547.
- Maguire, T., Harrison, P., Hyink, O., Kalmakoff, J. ve Ward, V.K., 2000. The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. Journal of General Virology, 81, 2803–2811.
- 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.
- McCaffrey, A.P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F.H., Xu, H., Wieland, S.F., Marion, P.L. ve Kay, M.A., 2003. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nature Biotechnology, 21, 639–644.
- Mclaughlin, R.E., Scott, H.A. ve Bell, M.R., 1972. Infection of the Boll weevil by *Chilo iridescent virus*. Journal of Invertebrate Pathology, 19, 285–290.
- Means, J.C., Muro, I. ve Clem, R.J., 2003. Silencing of the baculovirus *Op-iap3* gene by RNA interference reveals that it is required for prevention of apoptosis during *Orgyia pseudotsugata* M nucleopolyhedrovirus infection of Ld652Y cells. Journal of Virology 77, 4481–4488.
- Mitsuhashi, J., 1967. Infection of Leafhopper and its tissues cultivated *in vitro* with *Chilo iridescent virus*, Journal of Invertebrate Pathology, 9, 432–434.

- 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.
- [Nalçacıoğlu, R., Marks, H., Vlak, J.M., Demirbağ, Z. ve van Oers, M.M.](#), 2003. Promoter analysis of the *Chilo iridescent virus* DNA polymerase and major capsid protein genes. Virology, 317, 2, 321–329.
- [Nalçacıoğlu, R., Ince, I.A., Vlak, J.M., Demirbağ, Z. ve van Oers M.M.](#), 2007. The *Chilo iridescent virus* DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif. Journal of General Virology, 88, 9, 2488–2494.
- Paul, E.R., Chitnis, N.S., Henderson, C.W., Kaul, R.J., D’Costa, S.M. ve Bilimoria, S.L., 2007. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract. [Archives of Virology](#), 152, 1353–1364.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. ve Pickup, D.J., 1992. Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. Cell, 69, 597–604.
- Sah, N.K., Taneja, T.K., Pathak, N., Begum, R., Athar, M. ve Hasnain, S.E., 1999. The baculovirus antiapoptotic *p35* gene also functions via an oxidant-dependent pathway. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96, 4838–4843.
- Salvesen, G.S. ve Duckett, C.S., 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3, 401 – 410.
- 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. Journal of General Virology, 75, 1557–1567.
- Seshagiri, S. ve Miller, L.K., 1997. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. Pro. Nat. Ac. Sci., USA, 94, 13606 – 13611.
- Smith, G.E., Summers, M.D. ve Fraser, M.J., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Molecular and Cellular Biology, 3, 2156–2165.
- Smith, K.M., 1976. *Virus–Insect Relationships*, Longman, London, 102–104.
- Stanbridge, L.J., Dussupt, V. ve Maitland, N.J., 2003. Baculoviruses as vectors for gene therapy against human prostate cancer. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2, 79–91.
- 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. Journal of General Virology, 74, 873–879.

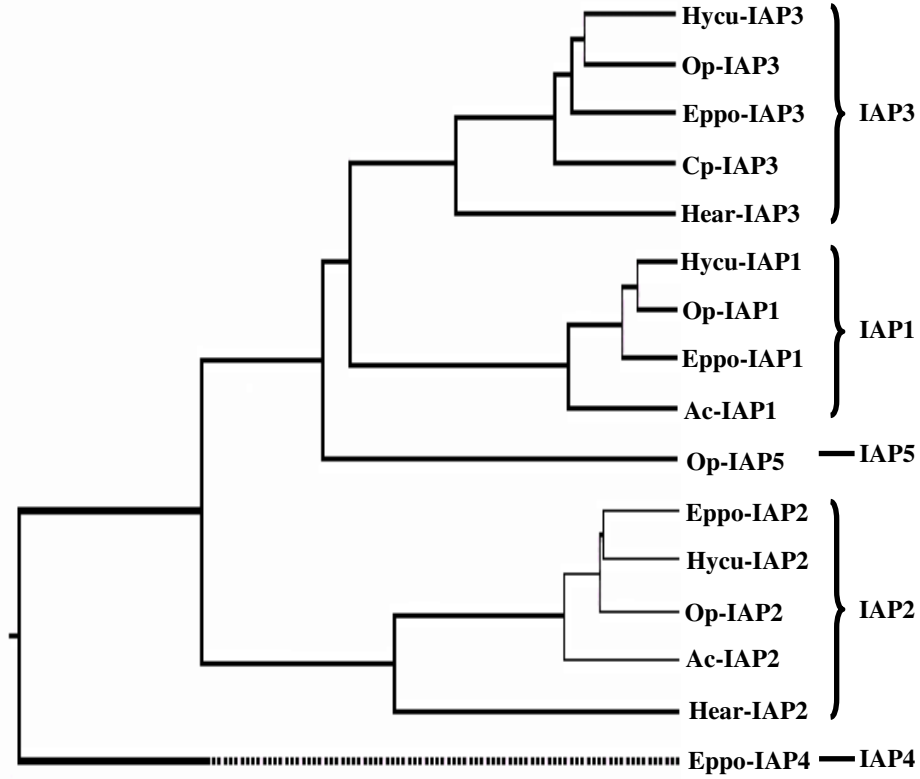
- Sun, X., 2005. Behaviour of wild-type and genetically modified baculoviruses in the *Helicoverpa armigera*-cotton system: a simulation approach. PhD thesis, Wageningen University.
- Teodoro, J.G. ve Branton, P.E., 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. Journal of Virology, 71, 1739–1746.
- Thornberry, N.A. ve Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. Science, 281, 1312–1316.
- 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.
- Tsai, C.T., Lin, C.H. ve Chang C.Y. 2007. Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in iridovirus genomes. Virus Res. 126, 1–2, 196–206
- URL–1, [www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/Iridoviruses.html](http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/Iridoviruses.html), Iridoviruses., 14.10.2007.
- URL–2, <http://news.uns.purdue.edu/VirusStructure/>, Virus Study Reveals How Nature “Super-Size” Tiny Structures. 17.12.2000.
- 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.
- Vaux, D.L. ve Korsmeyer, S.J., 1999. Cell death in development. Cell, 96, 245 – 254.
- Virgin, H.W., Latreille, P., Wamsley, P., Hallsworth, K., Weck, K.E., Dal Canto, A.J. ve Speck, S.H., 1997. Complete sequence and genomic analysis of murine gamma herpesvirus 68. Journal of Virology, 71, 5894–5904.
- Viswanath, V., Wu, Z., Fonck, C., Wei, Q., Boonplueang, R. ve Andersen, J. K. 2000. Transgenic mice neuronally expressing baculoviral *p35* are resistant to diverse types of induced apoptosis, including seizure-associated neurodegeneration. Pro. Nat. Ac. Sci., USA, 97, 2270–2275.
- Walker, N.I., Harmon, B.V. Gobe, G.C. ve Kerr, J.F.R., 1988. Patterns of cell death. In methods and Achievements in Experimental Pathology, 13, 18–54.
- Wang, J.W., Deng, R.Q., Wang, X.Z., Huang, Y.S., Xing, K. Feng, J.H., He, J.G. ve Long, Q.X., 2003. Cladistic analysis of iridoviruses based on protein and DNA sequences. Archives of Virology, 148, 2181–2194.
- Wang, Z., Hu, L., Yi, G., Xu, H., Qi, Y. ve Yao, L., 2004. ORF390 of white spot syndrome virus genome is identified as a novel anti-apoptosis gene. Biochemical and Biophysical Research Communications, 325, 899–907.
- Williams, R.C. ve Smith, K.M., 1957. A crystallizable insect virus, Nature, 179, 119-120.
- Williams, T., 1996. The iridoviruses, Advances in Virus Research, 46, 345–412.

- Williams, T., 1998. Invertebrate Iridescent Viruses, In: The Insect Viruses, Miller, L. ve Ball, A. (Eds.), Plenum Press NY, 31–68.
- Willis, D.B. ve Granoff, A., 1980. Frog virus 3 DNA is heavily methylated at CpG sequences. Virology, 107, 250–257.
- Willis, D.B. ve Granoff, A., 1985. Trans-activation of an immediate-early frog virus 3 gene by a virion protein. Journal of Virology, 56, 495–501.
- Willis, D.B., Goorha, R. ve Granoff, A., 1984. DNA methyl transferase induced by frog virus 3, Journal of Virology, 49, 86–91.
- Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature, 284, 555–556.
- Xeros, N., 1954. A second virus disease of the leatherjacket *Tipula paludosa*. Nature, 174, 562–563.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. ve Horvitz, H.R., 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell, 75, 641–652.
- Zhou Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. ve Salvesen, G.S., 1997. Target protease specificity of the viral serpin CrmA - Analysis of five caspases. Journal of Biological Chemistry, 272, 7797–7800.
- Zhou, Q., Krebs, J.F., Snipas, S.J., Price, A., Alnemri, E.S., Tomaselli, K.J. ve Salvesen, G.S., 1998. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein P35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. Biochemistry, 37, 10757–10765.

## 8. EKLER



Ek-Şekil 1. Bakülovirüslerin sınıflandırılması. Bakülovirüslerin, genomlarında bulunan 30 farklı gene bağlı olarak gerçekleştirilen filogenetik analiz (Herniou ve ark., 2003). Bakülovirüsler bu analizle 4 gruba ayrılmıştır. Grup I ve II NPV, GV ve Diptera NPV. HearNPV (HaSNPV), *Helicoverpa armigera* NPV, AcMNPV, *Autographa californica* MNPV; BmNPV, *Bombyx mori* NPV; EppoMNPV, *Epiphyas postvittana* MNPV; OpMNPV *Orgyia pseudotsugata* MNPV; HaSNPV, *Helicoverpa armigera* SNPV; HzSNPV, *Helicoverpa zea* SNPV; SpliMNPV, *Spodoptera litura* MNPV; SeMNPV, *Spodoptera exigua* MNPV; LdMNPV, *Lymantria dispar* MNPV; CpGV, *Cydia pomonella* GV; PxGV, *Plutella xylostella* GV; XcGV, *Xestia c-nigrum* GV; CuniNPV, *Culex nigripalpus* NPV



Ek-Şekil 2. Baculovirüs IAP proteinlerinin sınıflandırılması (Lange, 2006). Altı farklı baculovirüsde IAP proteinlerinin karşılaştırılması: Altı farklı bakülovirüsün IAP proteinlerinin filogenetik analizi. IAP proteinleri beş sınıfa ayrılmaktadır. IAP1, IAP2, IAP3, IAP4 ve IAP5. Ac, *Autographa californica* MNPV; Cp, *Cydia Pomonella*; Eppo, *Epiphyas postvittana*; Hear, *Helicoverpa armigera*; Hycu, *Hyphantria cunea*; Op, *Orgyia pseudotsugata*. Amino asit dizileri GenBank`dan elde edilmiştir.

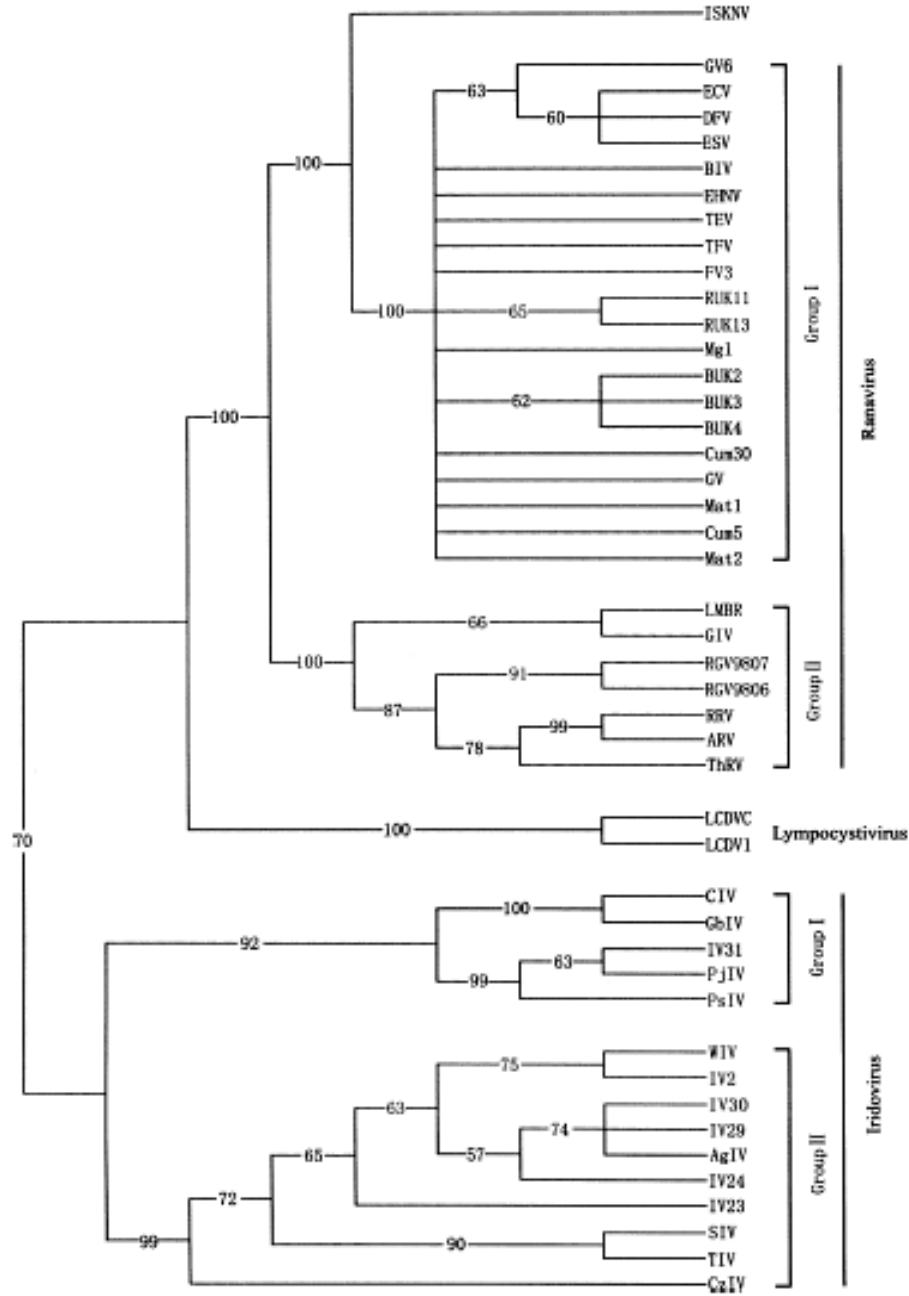


Ek-Tablo 1. *Iridoviridae* familyasının sınıflandırılması (Williams, 1998; Wang ve ark., 2003; PubMed verileriyle güncelenmiştir, 2007).

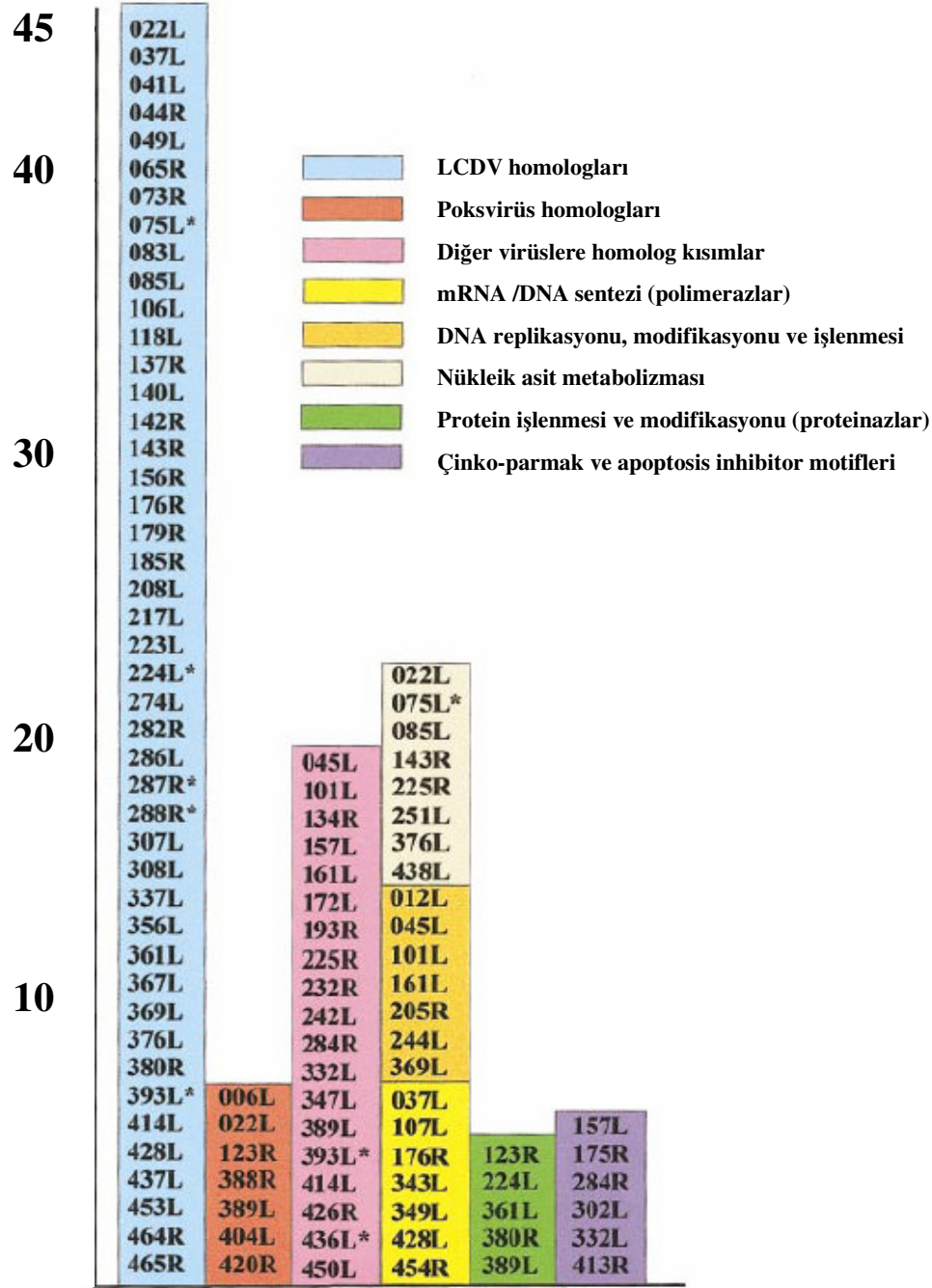
Cins	Kullanılan isim	Konak türü	Cinsin üyesi
<i>Iridovirus</i>	Küçük iridesent böcek virüsleri	Çeşitli omurgasız takımlar	<i>Tipula paludosa</i> IV (I 1) <i>Sericesthis pruinosa</i> IV (IV 2) <i>Chilo suppressalis</i> IV (IV 6) <i>Popilla japonica</i> IV <i>Porcellio scaber</i> IV <i>Wiseana cervinata</i> IV (IV 9) <i>Witlesia sabulosella</i> IV (IV 10) <i>Costelytra zealandica</i> IV (IV 16) <i>Pterosticus madidus</i> IV (IV 17) <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>Anticarsia gemmatalis</i> <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 <i>Gryllus bimaculatus</i> IV (IV31) <i>Porcellio scaber</i> IV (IV32)
<i>Chloriridovirus</i>	Büyük iridesent böcek virüsleri	Sivrisinekler	<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 (IV 8) <i>Aedes stimulans</i> (IV 11) <i>Aedes cantans</i> (IV 12) <i>Corethralla brakeleyi</i> IV (IV 13) <i>Aedes detritus</i> IV (IV 14) <i>Aedes detritus</i> IV (IV 15) <i>Chironomus plumosus</i> IV
<i>Ranavirus</i>	Kurbağa virüsü	Amfibiler	Frog Virüs 1, 2 Frog Virüs 3 (FV3) Box turtle virüs 3 Lucké triturus virüs 1-4

## Ek Tablo 1. in devamı

			Redwood Park virus
			Stickleback virus
			Tiger frog virüs
			Tortoise virüs 5
			<i>Bufo bufo</i> UK iridovirüs 1-3
			<i>Rana temporaria</i> UK iridovirüs 1-2
			<i>Bufo marinus</i> Venezuelan IV 1-6
			<i>Xenopus</i> virüs T21
			<i>Rana temporaria</i> UK iridovirüs 1-2
			Leptodactylus Venezuelan IV 1
			Giant Seaperch IV
			<i>Santee-Cooper</i> ranavirüs
			Doctor fish virus
			Guppyfish IV
			Largemouth bass ranavirus
			European catfish IV
			<i>Ictalurus melas</i> ranavirüs
			Grouper sleepy disease iridovirüs
			Sheetfish iridovirüs
			Bohle iridovirüs
			<i>Rana tigrina</i> ranavirüs
			Dwarf gourami iridovirus
			Taiwan grouper iridovirus
			Red Sea Bream IV
			Sea Bass IV
			African lampeye IV
			Red Sea Bream IV
			Grouper IV
			İridovirüs RGV-9807
			İridovirüs RGV-9806
			Regina ranavirüs
			<i>Ambystoma tigrinum</i> virüs
			Newt virüs T6-T20
<i>Lymphocystivirus</i>	Lenfosit hastalığı virüsü	Çeşitli balıklar	Lymphocystivirüs tip 1 (LCDV-1)
			Lymphocystivirüs tip 2 (LCDV-2)
			<i>Octopus vulgaris</i> disease virüs



Ek-Şekil 3. İridovirüslerin sınıflandırılması (Wang ve ark., 2003). Maksimum parsimoni analiziyle 45 iridovirüs major kapsit proteinine ait aminoasit dizisinin karşılaştırılarak *İridoviridae* familyasına ait türler arasındaki filogenetik ilişkisi gösterilmektedir. Bu analiz *Iridovirus*, *Ranavirus* ve *Lymphocystivirus* cinslerini birbirinden ayırdığı gibi ve *Iridovirus* ve *Ranavirus* cinsine ait türleride grup I ve II olarak ikiye ayrılmıştır. Analizde kullanılan iridovirüsler ve konakları Tablo 1.2`de gösterilmektedir.



Ek-Şekil 4. CIV gen ürünlerinin diğer organizmalarla olan homolojilerine göre sınıflandırılması. Herbir homolog grup farklı renklerle belirtilmektedir.

Ek-Tablo 2. Primer sıraları (5' → 3')

Primer İsimleri	Primer Sıraları (5' → 3')	Açıklama
RT PCR Primerleri		
RT-Reverse-CIV <i>iap</i>	GAAAACGATGGAGGAGATAA	
RT-Forward-CIV <i>iap</i>	TAAAAACACATTCATAACACGA	
Geçici Gen İfade Vektörünün Oluşturulmasında Kullanılan Primerler		
IE2-FW	<u>TTCTCGAGTCATGATGATAAACAATGTATGGTG</u>	** <i>XhoI</i>
GFP-RV	<u>TTTCTCGAGGTCGACCCGCTTACTTGTACAGC</u>	** <i>XhoI</i>
CIV <i>iap</i> -FW	<u>TTAACTAGTATGTGTGTAATTTTTCCGGTA</u>	** <i>SpeI</i>
CIV <i>iap</i> -RV	<u>TTCTGCAGTTATATAAAAAGATTGTTAATTTTGAT</u>	** <i>PstI</i>
Ac- <i>p35</i> - MW321	<u>TTAACTAGTATGTGTGTAATTTTTCCGGTA</u>	** <i>SpeI</i>
Ac- <i>p35</i> - MW322	<u>AATCTGCAGTTATTTAATTGTGTTAATATTACATTTTTG</u>	** <i>PstI</i>
dsRNA Üretimi İçin Hazırlanan Vektörün Hazırlanmasında Kullanılan Primerler		
MW-186	<u>CCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTAGT</u> <u>TATTGCTCAGCGGATCCCGTCCGAAGCGCGGGAATTC</u>	*
MW-187	<u>CCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTAGT</u> <u>TATTGCTCAGCGGAAGCTTGTCGAGACTGCAGGCTCTAG</u>	*
MW-188	<u>TTCTAGGTTAATACGACTCACTATAGGCAAAAACCCCT</u> <u>CAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGG</u>	*, ** <i>AvrII</i>
5' ACE Primerleri		
Oligo-dT tutunma	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV	***
PCR tutunma	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	
CIV <i>iap</i> SP1	TCTTGTTGATATTGTTTGT	
CIV <i>iap</i> SP2	TTTTTAAATCTTGTGTATGT	
CIV <i>iap</i> SP3	TATCTGATCTTTCCATTCCTTTA	

\* Altı çizili bölgeler T7 sonlandıcı bölgesinin kısmi bir parçasıdır

\*\* Kalın ve italik punto ile belirtilen bölgeler primere eklenen kesim bölgelerini göstermektedir

\*\*\* Primer *Mlu* I, *Cla* I ve *Sal* I enzimlerine ait kesim bölgelerini içermektedir.

## ÖZGEÇMİŞ

07.11.1978 yılında İstanbul`da doğdu. Orta öğrenimini İstanbul Atatürk Lisesinde tamamladı. 2000 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde yüksek öğrenimini tamamladı. Aynı yıl Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Araştırma Görevlisi olarak 2000–2004 yıllarında aynı enstitüde görev yaptı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Doktora öğrenimine başladı. Doktora eğitimi süresince TÜBİTAK, Wageningen Üniversitesi (Hollanda) ve Production Ecology and Resource Conservation`dan (Hollanda) aldığı çeşitli burslarla çalışmalarını tamamladı. Evli ve 1 çocuk babasıdır, ingilizce bilmektedir.