

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

***AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜS PROTEİN KİNAZ GENİNİN**  
**KARAKTERİZASYONU VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Biyolog Hacer MURATOĞLU**

**ARALIK 2010**  
**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***AMSACTA MOOREI* ENTOMOPOKSVİRÜS PROTEİN KİNAZ GENİNİN  
KARAKTERİZASYONU VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

**Biyolog Hacer MURATOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"Doktor (Biyoloji)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12.11.2010  
Tezin Savunma Tarihi : 30.12.2010**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ersan KALAY  
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Kazım SEZEN  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Trabzon 2010**

## ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei* Entomopoksvirüs Protein Kinaz Geninin Karakterizasyonu ve Fonksiyonel Analizi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek gerek konunun seçiminde gerekse çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin geliştirilmesinde ve planlanmasında yardımcı olan tez izleme jüri üyelerimden sayın Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, sayın Doç. Dr. Ersan KALAY’a, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma ve tez süresince bana her konuda destek veren aileme minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK, Proje no: 106T265) ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Programına (KTÜ-BAP, Proje No: 2007.111.004.2) teşekkür ediyorum.

Hacer MURATOĞLU  
Trabzon 2010

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET .....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ .....	X
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Poksvirüsler .....	3
1.2.1. Poksvirüslerin Sistematiği .....	3
1.2.2. Poxviridae Familyasının Genel Özellikleri .....	3
1.3. Entomopoksvirüsler .....	6
1.4. <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs (AMEV) .....	7
1.5. Protein Kinazlar .....	9
1.6. Viral Protein Kinazlar .....	9
1.7. <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs Serin/Treonin Protein Kinaz Geni (AMV197) .....	10
1.8. Çalışmanın Amacı .....	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	12
2.1. Hücrelerin ve Virüslerin Temini .....	12
2.2. Virüslerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Tayini .....	12
2.3. AMV197'nin Biyoinformatik Analizi .....	13
2.4. AMV197'nin Transkriptomik Analizi .....	14
2.4.1. Transkripsiyon Kinetiğinin Belirlenmesi .....	14
2.4.1.1. Enfekte Olmuş Hücrelerden mRNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Tayini .	14
2.4.1.2. İzole Edilen mRNA'ların DNazI ile Muamele Edilmesi .....	14
2.4.1.3. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	15
2.4.2. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi .....	16

2.5.	Protein Kinaz Geninin Transkriptomik Yapısının Aydınlatılması.....	17
2.5.1.	Toplam RNA İzolasyonu .....	18
2.5.2.	Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 5' Ucunun Rasgele Çoğaltılması (5' RACE) .....	18
2.5.3.	Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 3' Bölgesinin ve Transkripsiyon Bitiş Noktasının Tespit Edilmesi .....	20
2.5.4.	Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 5'/3' Bölgelerini İhtiva Eden Vektörün Oluşturulması.....	22
2.5.5.	Fragmanlar ile Vektörün Ligasyonu.....	22
2.5.6.	Elektrokompotent DH5 $\alpha$ <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması .....	22
2.5.7.	Elektrotransformasyon.....	23
2.5.8.	Plazmid DNA İzolasyonu ve Klonların Seçimi .....	23
2.5.9.	Restriksiyon Analiziyle Klonların Doğrulanması.....	24
2.5.10.	Klonlanan 5'/3' Translasyona Uğramayan Bölgelerin Dizi Analizi.....	24
2.6.	Protein Kinaz Geni (AMV197) Çıkartılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması .....	25
2.6.1.	<i>gfp</i> İçeren Rekombinant Transfer Vektörünün Oluşturulması .....	25
2.6.2.	Transfer Vektörünü Oluşturmak İçin Çoğaltılan DNA'ların Birleştirilmesi.....	26
2.6.3.	Rekombinant Virüsün Oluşturulması.....	29
2.6.3.1.	pBS-Am $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ve Yaban Tıp AMEV'nin Ld Hücrelerine Transfeksiyonu .....	30
2.6.3.2.	Plak Deneyi ile Rekombinant AMEV'nin Seçimi ve Saflaştırılması.....	31
2.6.3.3.	Rekombinant Virüs Stokunun Hazırlanması .....	32
2.6.3.4.	AMV197'nin AMEV Genomundan Silindiğinin PCR Analiziyle Doğrulanması .....	32
2.6.4.	Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ) Analizi .....	34
2.6.4.1.	Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ) DNA Replikasyonunun Belirlenmesi .....	34
2.6.4.2.	Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ) Protein Profilinin Belirlenmesi.....	36
2.6.4.3.	Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ) Enfektivitesinin Belirlenmesi.....	37
3.	BULGULAR.....	38
3.1.	Virüslerin Üretimi ve Saflaştırılması.....	38
3.2.	AMV197'nin Biyoinformatik Analizi.....	38
3.3.	AMV197'nin Transkriptomik Analiz.....	41
3.3.1.	Transkripsiyon Kinetiğinin ve Sınıfının Analizi.....	41
3.4.	Protein Kinaz Geninin Transkriptomik Yapısının Aydınlatılması.....	43

3.4.1.	Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 5' Ucunun Rasgele Çoğaltılması (5' RACE) .....	43
3.4.2.	Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 3' Bölgesinin ve Transkripsiyon Bitiş Noktasının Tespit Edilmesi (3' RACE) .....	44
3.5.	Protein Kinaz Geni (AMV197) Çıkartılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması .....	45
3.5.1.	Rekombinant Virüsün Saflaştırılması ve Stokunun Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	46
3.5.2.	AMV197'nin AMEV Genomundan Silindiğinin PCR Analiziyle Doğrulanması .....	47
3.5.3.	Rekombinant Virüsün (vAmΔPK/ <i>gfp</i> ) DNA Replikasyonunun Belirlenmesi .....	50
3.5.4.	Rekombinant Virüsün (vAmΔPK/ <i>gfp</i> ) Protein Profilinin Belirlenmesi .....	51
3.5.5.	Rekombinant Virüsün (vAmΔPK/ <i>gfp</i> ) Enfektivitesinin Belirlenmesi .....	52
4.	TARTIŞMA .....	54
5.	SONUÇLAR .....	60
6.	ÖNERİLER .....	62
7.	KAYNAKLAR .....	63

## ÖZGEÇMİŞ

## ÖZET

*Amsacta moorei* Entomopoksvirüs (AMEV), Poxviridae familyasına ve Entomopoxviridae subfamilyasına ait bir böcek virüsü olup, önemli böcek zararlıları üzerinde yüksek derecede patojenik etki göstermektedir. Ayrıca AMEV, gen ekspresyon ve gen terapi vektörleri olarak kullanılabilen ve insan virüslerinin mekanizmalarının anlaşılmasında çalışılabilecek model virüs olması bakımından büyük önem arz etmektedir.

AMEV genomik araştırmaları kapsamında yapılan bu çalışmada, AMEV genomunda bulunan serin/treonin protein kinaz bölgesine sahip AMV197 kodlu genin transkripsiyonel ve fonksiyonel analizleri gerçekleştirildi.

DNA sentez inhibitörü varlığında enfekte edilen Ld652 hücrelerinden izole edilen mRNA örneklerinin RT-PCR yöntemiyle yapılan transkripsiyonel analizleri, AMV197'nin "erken" grubu gen olarak ifade edildiğini gösterdi. AMV197'nin zamana bağlı transkripsiyon profili ise gene ait transkripsiyonun, enfeksiyondan 4 saat sonra başladığını, 7. saatte en yüksek seviyeye çıktığını ve bu saatten sonra azalmaya başladığını gösterdi.

5' RACE analizi, transkripsiyonun, translasyon başlangıç noktasına göre -54. pozisyonda başladığını gösterdi. 3' RACE analizi sonuçları, AMV 197 geninin translasyon bitiş noktasına (TAA), bir tanesi 21 diğeri 31 baz (aşağıda) uzaklıkta iki transkripsiyon bitiş noktasının bulunduğunu gösterdi.

Genin fonksiyonel analizi için, AMV197 geni homolog rekombinasyon ile AMEV genomundan silindi. Oluşturulan rekombinant virüsün (*AmΔPK/gfp*) DNA replikasyonu slot-blot hibridizasyonu yöntemiyle ve enfektivitesi ise EPDA (End Point Dilution Assay) yöntemiyle belirlendi. Bu sonuçlar, protein kinaz geninin AMEV genomundan silinmesi durumunda, DNA replikasyonunun yaban tipe göre 6 saat erken gerçekleştiğini, ancak virüs üretiminin %61 oranında azaldığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *AmΔPK/gfp*, *Amsacta moorei* Entomopoksvirüs (AMEV), protein kinaz, böcek virüsü, transkriptomik analiz

## SUMMARY

### Functional Analysis and Characterization of Protein Kinase Gene (AMV197) of *Amsacta moorei* Entomopoxvirus

*Amsacta moorei* Entomopoxvirus (AMEV) is an insect viruses that belongs to Poxviridae family and Entomopoxviridae subfamily, and has high level pathogenic effect on insect pests. In addition, AMEV can be used as gene expression and gene therapy vectors, and has great importance as model virus for studying the mechanism of human viruses.

In this work, in order to identify the AMEV genome, transcriptional and functional analysis of AMV197 which is found in AMEV genome and has serine/threonine protein kinase domain was performed.

In the presence of DNA replication inhibitor, transcriptional analyses done with mRNA from Ld652 cells infected with AMEV by using RT-PCR methods showed that AMV197 is expressed as an *early* group gene. Also, time dependent transcription profile of AMV197 showed that transcription of AMV197 started 4 hour after infection, increased to the high level at 7<sup>th</sup> hour and started to decrease from this hour.

5' RACE analysis showed that transcription started at the -54<sup>th</sup> nucleotide relevant to translational start point. Result of 3' RACE showed that AMV197 has two stop points, one of them is located at the 21<sup>st</sup> nucleotide and the other point is at the 31<sup>st</sup> nucleotide down stream of translational stop point (TAA).

For functional analysis of AMV197 gene has been deleted from AMEV genome by homolog recombination. DNA replication of constructed recombinant virus (*AmΔPK/gfp*) was determined by slot-blot hybridization analysis, and infectivity of the recombinant virus was determined by EPDA (End Point Dilution Assay). These results showed that DNA replication occurred six hours earlier relevant to wild type virus, but recombinant virus production decreased by 61% relevant to wild type virus.

**Key Words:** *AmΔPK/gfp*, *Amsacta moorei* Entomopoxvirus (AMEV), protein kinase, insect virus, transcriptomic analysis



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Poksvirüslere ait genel görünüm.....	4
Şekil 2. Vaksinya virüsün enfeksiyon döngüsü .....	5
Şekil 3. AMEV'nin enfeksiyonunda inhibitör kullanımı .....	16
Şekil 4. 5'RACE analizi .....	19
Şekil 5. 3'RACE analizi .....	21
Şekil 6. Rekombinant virüsün oluşturulması.....	30
Şekil 7. AMV197 protein kinaz katalitik bölgesi ve ATP bağlanma motifi .....	39
Şekil 8. AMV197'nin, diğer protein kinazlarla karşılaştırılması.....	40
Şekil 9. AMV197 kodlu ORF'nin transkripsiyon kinetiği .....	42
Şekil 10. AMV197 kodlu ORF'nin transkripsiyon sınıfı .....	43
Şekil 11. Transkripsiyon başlangıç noktasının, AMEV genomu üzerindeki yeri .....	44
Şekil 12. Transkripsiyon bitiş noktalarının AMEV genomu üzerindeki yerleri.....	45
Şekil 13. pBS-Am $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ile transfeksiyondan sonra Ld652 hücreleri.....	46
Şekil 14. Ld652 hücrelerinin vAm $\Delta$ PK/ <i>gfp</i> ile enfeksiyonu sonrasında oluşan plaklar.....	47
Şekil 15. Rekombinant virüs oluşumunun PCR yöntemiyle teyit edilmesi .....	48
Şekil 16. Rekombinant virüs oluşumunun restriksiyon analizi ile teyit edilmesi.....	49
Şekil 17. Homolog rekombinasyondan sonra oluşan DNA dizisi .....	50
Şekil 18. Slot-blot hibridizasyonu ile DNA replikasyonu.....	51
Şekil 19. SDS-PAGE elektroforezi ile virüslerin protein içeriği.....	52
Şekil 20. AMV197'nin transkriptomik yapısı .....	56

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik özelliği .....	3
Tablo 2. Protein kinaz geninin 5' ve 3' kısımlarına ait primerler.....	17
Tablo 3. Homolog rekombinasyon için kullanılan primerler. ....	26
Tablo 4. Rekombinant AMEV'nin enfektivitesi.....	53

## SEMBOLLER DİZİNİ

A+T	: Adenin ve Timin Nükleotit
AMEV	: <i>Amsacta moorei</i> Entomopoksvirüs
AMV197	: AMEV'nin 197 Kodlu Açık Okuma Zinciri
Ara-C	: $\beta$ -D-Arabino furanozilsitozin
ATP	: Adenozin Trifosfat
B1R	: Vaksinya Virüsün Serin/Treonin Protein Kinazı
bp	: Baz Çifti
cDNA	: Kopya DNA
d(T)	: Deoksi Timin Nükleotit
ddH <sub>2</sub> O	: İki Kere Damıtılmış Su
DH10 $\beta$	: <i>Escherichia coli</i> 'nin Bir Alt Türü
DH5 $\alpha$	: <i>Escherichia coli</i> 'nin Bir Alt Türü
DIG	: Digoxigenin
DIG-dUTP	: Digoxigenin-dUTP, Digoxigenin İşaretli Deoksi Urasil Trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNazI	: DNA Parçalayıcı Enzim
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
dsDNA	: Çift Zincir DNA
dUTP	: Deoksi Urasil Trifosfat
EPDA	: End Point Dilution Assay
EPV	: Entomopoksvirüs
FBS	: Fetal Bovine Serum
GFP	: Yeşil Floresan Protein
<i>gfp</i>	: Yeşil Floresan Protein Kodlayan Gen
HCl	: Hidrojen Klorik Asit
ICTV	: Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi
IPTC	: İzopiripil beta-D-tiyogalaktosid
ITR	: Uçlarda Ters Dönmüş Tekrar Sıralar
JM101	: <i>Escherichia coli</i> 'nin Bir Alt Türü
LB	: Luria Bertani

Ld652	: <i>Lymantria dispar</i> 'dan Böcek Hücre Kültürü
M	: Molar
mM	: Milimolar
MOI	: Multiplicity of Infection
mRNA	: Mesajcı RNA
ORF	: Açık Okuma Zinciri
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: H İyon Konsantrasyonu
RACE	: cDNA Uçlarının Rasgele Çoğaltılması
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: RNA Parçalayıcı Enzim
rpm	: Dakikadaki Dönme Sayısı
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS İçeren Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SP	: Seçici Primer
SSC	: Saline-Sodium Citrate Tampon
TENS	: Tris-HCl, EDTA, NaOH ve SDS İçeren Tampon
UTR	: Genin Translasyona Uğramayan Bölge
vAm $\Delta$ PK/ <i>gfp</i>	: Protein Kinaz Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
vAm $\Delta$ sph/ <i>gfp</i>	: Sferoidin Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
VV	: Vaksinya Virüs
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid
xg	: Dünyanın Yerçekimi İvmesi
$\mu$ g	: Mikrogram
$\mu$ l	: Mikrolitre
$^{\circ}$ C	: Santigrat Derece

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Dünyada tanımı yapılan hayvan türlerinin %97'sini böcekler oluşturmaktadır. Doğada yaşayan böceklerin %99,5'inin doğa ve insana faydalı olduğu bilinmektedir. Bilinen yaklaşık 1 milyon 300 bin böcek türünün, sadece %0,5'i doğa ve insana zarar vermektedir (URL-1, 2010). Sayısal olarak az olmalarına rağmen bu zararlıların etkileri oldukça büyük olmaktadır. Çeşitli mikrobiyal etmenler, böceklerde doğal enfeksiyonlar meydana getirmektedir (Tanada ve Kaya, 1993; Boucias ve Pendland, 1998; Charles vd., 2000). Bu doğal etmenlerin başında, böceklerin hastalanmalarına ve ölümlerine sebep olan böcek virüsleri gelmektedir (Hunter-Fujita vd., 1998; Miller ve Ball, 1998).

Böcek virüslerini, doğaya ve insanlara yaptıkları olumlu ve olumsuz etkilere göre iki açıdan ele almak gerekir. Bu etkilerden bir tanesi, ipek böceği ve bal arıları gibi, insanlara ve çevreye faydalı olan böceklerin, virüsler yüzünden hastalanıp ölmeleridir. İkinci etki ise, fındık kurdu, ladin kabuk böceği, amerikan beyaz kelebeği, sivrisinek gibi, çeşitli tarım ve orman ürünlerini veya insan sağlığını etkileyen zararlı böcekler ile virüsler sayesinde mücadele edilebilmesidir. Böylece, böcek virüsleri tarım ve ormancılıkta zararlı böceklerle mücadelede kullanılan önemli biyolojik mücadele materyali haline gelmiştir (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000; Sezen ve Demirbağ, 2005). Ayrıca, böcek virüsleri gen ifade vektörü (Anderson vd., 1996; Ciccarone vd., 1997) ve gen terapi vektörü (Merrihew vd., 2001; Stanbridge vd., 2003) olarak kullanılma potansiyeline sahip olduklarından endüstriyel bakımdan da büyük önem sahiptirler.

Başlıca böcek enfeksiyonu etmenlerinden olan Entomopoksvirüsler (EPV), ilk kez Vago (1963) tarafından keşfedilmişlerdir. EPV'lerin mikrobiyal mücadele ajanı olarak geliştirilmesi hem çok sayıdaki böcek takımından izole edilmelerinden hem de bakulovirüslerin kullanımını tamamlaması açısından çok büyük bir potansiyele sahiptir. Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera gibi dünyanın en önemli tarımsal zararlılarını içeren bu takımlardan izole edilmeleri, son yıllarda artan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları ve moleküler biyolojileri üzerine devam eden çalışmalar, bu virüsleri çok önemli kılmaktadır. Çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisinekler gibi en önemli zararlıların mikrobiyal kontrolü, bu takımlardan yeni EPV'lerin izole edilip

tanımlanmasına bağlıdır (King vd, 1998). EPV'ler birçok zararlı tür için, özellikle de bakulovirüslerin hiç izole edilmediği, çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisineklere karşı, biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülmektedir. Biyolojik kontrolde, EPV'lerin bakulovirüslere kıyasla en önemli dezavantajı, konaklarını öldürme sürelerinin uzun olmasıdır. Bu problem, EPV genomuna yabancı genlerin yerleştirilmesi sonucu genetik olarak değiştirilmiş EPV'lerin oluşturulmasıyla aşılabılır. Özellikle, son yıllarda entomopoksvirüsler biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmaya da başlanmıştır. Böyle bir çalışmada, *Amsacta moorei* entomopoksvirüse (AMEV) ait sferoidin (*sph*) kodlama bölgesi çıkartılıp yerine kloramfenikol asetil transferaz (*cat*) geni yerleştirilmiştir. Daha sonra rekombinant AMEV-*cat* transfeksiyonu, AMEV ile enfekte olmuş Ld652 hücrelerinde rekombinant proteinin üretimiyle sonuçlanmıştır (King vd, 1998). Bu örneğe benzer olarak yapılan diğer çalışmalarda, interlökinler, sitokininler, büyüme faktörleri, interferonlar, enzimler ve yapısal proteinleri kodlayan genler, büyük DNA fragmentlerini yapısına alabilen poksvirüs vektörlerine klonlanıp ekspresyonları yapılabilmektedir.

AMEV önemli bazı tarım zararlısı böcekleri enfekte edebilen ve hücre kültüründe kolaylıkla büyüeyebilen bir EPV'dir (Goodwin vd., 1990; Hall ve Moyer, 1991; Winter vd., 1995). AMEV genomunda bulunan AMV197 kodlu açık okuma zinciri, serin/treonin protein kinaz bölgesine sahip potansiyel bir protein kinaz genidir. Protein kinazlar, ATP'deki bir fosfatı hedef substrat proteinin serin, treonin veya tirozin aminoasidine taşınmasını sağlayan büyük bir enzim grubudur. Bu enzimler, protein fosfatazlarla birlikte hücrel sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Böylece, AMEV protein kinaz geninin virüs replikasyonu üzerinde önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir. Ancak, bu genin virüste aktif olup olmadığı ve fonksiyonu hakkında literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında AMEV'nin moleküler yapısının aydınlatılması, virüs replikasyonundaki rolünün anlaşılması ve biyoteknolojik kullanımına katkılar sağlaması amacıyla, virüsün potansiyel bir protein kinaz geni olan AMV197'nin transkripsiyonel ve fonksiyonel analizi gerçekleştirilmiştir.

## 1.2. Poksvirüsler

### 1.2.1. Poksvirüslerin Sistematığı

Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre Poxviridae familyası Chordopoxvirinae ve Entomopoxvirinae olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (URL-2, 2010). Omurgalı konaklardan elde edilen izolatlar, Chordopoxvirinae alt familyasına aitken, omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar, Entomopoxvirinae alt familyasına aittir (Murphy vd., 1995) (Tablo 1).

Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik özelliği

Familya:	Poxviridae	
Alt familya	Chordopoxvirinae (Konakları omurgalı)	10 cins
Cins	Avipoxvirus	10 tür
Cins	Capripoxvirus	3 tür
Cins	Cervidpoxvirus	1 tür
Cins	Leporipoxvirus	4 tür
Cins	Molluscipoxvirus	1 tür
Cins	Orthopoxvirus	9 tür
Cins	Parapoxvirus	4 tür
Cins	Suipoxvirus	1 tür
Cins	Yatapoxvirus	2 tür
Cins	Tanımlanmamış	1 tür
Alt familya	Entomopoxvirinae (Konakları omurgasız)	4 cins
Cins	Alphaentomopoxvirus	7 tür
Cins	Betaentomopoxvirus	13 tür
Cins	Gammaentomopoxvirus	6 tür
Cins	Tanımlanmamış	1 cins

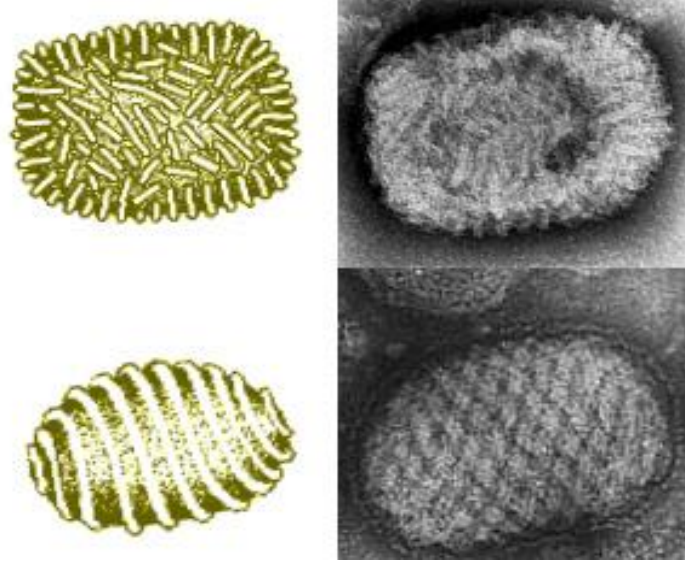
### 1.2.2. Poxviridae Familyasının Genel Özellikleri

Poksvirüsler, oldukça değişken şekilli, genellikle tubuler veya globuler üniteler içeren lipoprotein yüzey membranına sahip, tuğla biçimli (220-450 nm uzunluk, 140-260 nm genişlik, 140-260 nm kalınlık) veya düzenli spiral filamentlere (10-20 nm çapında) sahip ve ovoid (250-300 nm uzunluk, 160-190 nm çap) yapıdadır (Murphy vd., 1995; Cann, 2005) (Şekil 1).

Viriyon parçacığının protein içeriği, parçacığın ağırlığının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Cinslere bağlı olarak, virüs genomu tarafından yaklaşık 150-300 protein

kodlanır. Bunlardan yaklaşık 100 tanesi viriyonda mevcuttur. Virüs parçacığı, DNA replikasyonu, RNA transkripsiyonu, protein veya nükleik asitlerin modifikasyonu için gereken birçok enzime sahiptir (Carter ve Saunders, 2007). Zarflı viriyonlar, viriyon parçacığının etrafını çevreleyen çift tabakalı lipid arasına yerleşmiş, virüs tarafından kodlanan polipeptitlere sahiptirler (Murphy vd., 1995).

Viriyon parçacığın ağırlığının yaklaşık %4'ünü lipidler oluşturur. Zarflı virüsler, hücreli lipidlerin modifikasyonu sonucu oluşabilen glikolipidlere veya virüs replikasyonunun erken aşamasında *de novo* olarak sentezlenen lipidlere sahiptir (Murphy vd., 1995).



Şekil 1. Poksvirüslere ait genel görünüm. Orthopoksvirüs'lere ait tuğla şeklindeki şematik ve elektron mikroskobu görünümü solda ve Parapoksvirüs'lere ait ovoid şeklindeki şematik ve elektron mikroskobu görünümü sağda yer almıştır (Murphy vd., 1995).

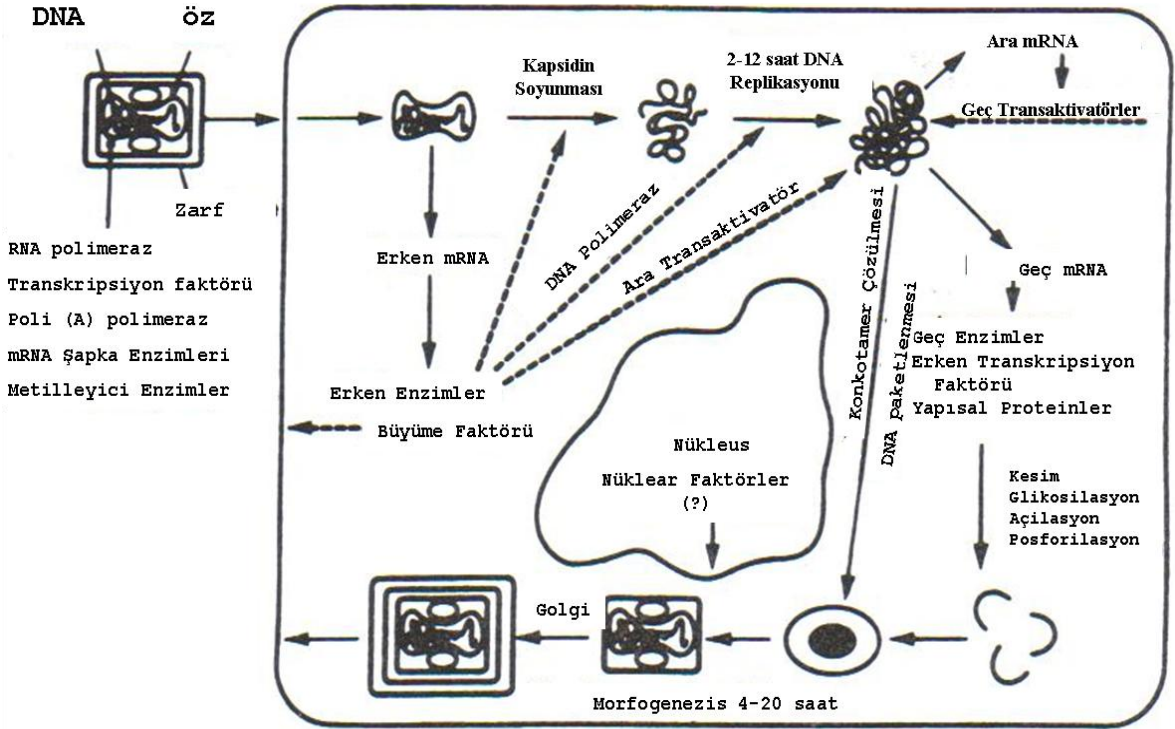
Viriyonların karbohidrat içeriği ise, virüs ağırlığının yaklaşık %3'ünü teşkil etmektedir. Orthopoksvirüslerin zarfındaki hemagglutinin gibi belirli viral proteinler, N-bağlı ve C-bağlı glikanları içerirler (Murphy vd., 1995).

Poksvirüslerin genomları, tek parçalı, çift zincir DNA'dan ibarettir. Viriyonun genomu, ağırlığının yaklaşık %3'ünü oluşturur. Lineer dsDNA molekülü, uçlardan kovalent olarak kapalıdır. İki izomerik DNA'dan oluşan zincirin sonundaki saç tokası yapısı, ters dönmüş komplementer diziler içerir. Boyutları değişken olan bu ters tekrar sıralar, genomun uçlarına yakın bir yerde olabileceği gibi hiç de olmayabilir (Moss, 2001).



Konak hücrelere giriş, viriyonun hücreye tutunmasından sonra, plazma membranı ve viral yüzey membranı arasındaki kaynaşma sayesinde gerçekleşir. Virüs zarfı mevcut olduğunda, membranlar arasındaki kaynaşma, viral özün hücre sitoplazmasına salınması ve daha ileri derecede virüs zarfının soyunmasından sonra meydana gelir. Plazma ve vakuolar membranlar arasındaki kaynaşma durumunda görülen endositoz da mümkündür (Moss, 1991; Murphy vd., 1995).

Poliadenillenmiş mRNA transkriptleri, genomun %15'ine tekabül eder. Bunlar, virüs özündeki çoklu alt ünitelere sahip RNA polimeraz enzimleri sayesinde, her iki DNA zincirinden de sentezlenir. Transkriptler, konak ribozomları tarafından translasyona uğratılmak üzere virüs özünden çıkarılır. Erken virüs moleküllerinin sentezi sırasında, konak makromoleküllerinin sentezi durdurulur. Virüsün çoğalması, konak hücre sitoplazmasında meydana gelir ve sonucunda viroplazma veya virüs faktörleri olarak adlandırılan bazofilik (B-tipi) inklüzyonlar oluşur.



Şekil 2. Vaksinya virüsün enfeksiyon döngüsü

Genomda, çeşitli promotörler tarafından yönetilen Açık Okuma Zincir (ORF)'leri mevcuttur. Bu promotörler, zamana bağlı olarak üç sınıf genin transkripsiyonunu düzenler. *Erken genler*, genomun soyunması öncesinde veya sırasında ifade edilir. Bunlar,

yapısal olmayan birçok RNA ve proteini kodlar. *Ara genler*, DNA replikasyonu sırasında ifade edilir ve geç genlerin transkripsiyonunu ayarlar. *Geç genler*, replikasyondan sonra ifade edilir ve birçok viriyon proteinini kodlar (Moss, 1991; Broyles, 2003) (Şekil 2)

mRNA'ların, 5' uçları şapkalı, 3' uçları ise poliadenillenmiştir. İntronlar mevcut değildir. Erken protein sentezi, genellikle geç gen ifadesi sırasında azalır. Fakat bazı genler, ilk önce erken promotordan ifade edilmeye başlar, daha sonra geç promotordan ifade edilmeye devam eder. Belirli proteinler, translyasyondan sonra proteolitik kesim, fosforilasyon, glikolizasyon, ribosilasyon, sülfasyon, açılasyon, myristalizasyon, metal iyonlarının bağlanması ve disülfüt bağlarının oluşması gibi modifikasyonlara maruz kalır (Murphy vd., 1995).

### 1.3. Entomopoksvirüsler

Entomopoksvirüsler ilk olarak Vago (1963) tarafından “yeni bir tip böcek virüsü” olarak açıklanmıştır. Bu virüsler, coğrafik olarak geniş bir alana yayılmış, onlarca böcek türünden izole edilmiştir. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV), poksvirüsleri Tablo 1’de gösterildiği gibi Chordopoxvirinae (Omurgalıları enfekte eden poksvirüsler) ve Entomopoxvirinae (Böcekleri enfekte eden poksvirüsler) olmak üzere iki alt familyaya ayırmıştır (Moss, 2001). Entomopoxvirinae virüs morfolojisi, konak türü ve genom hacmi bakımından 4 cinse ayrılır. Her bir cins, bir tip türle temsil edilmekte ve Alphaentomopoxvirusler Coleoptera grubu (*Melolontha melolontha* EPV), Betaentomopoxvirusler Lepidoptera grubu (*Amsacta moorei* EPV) ve Orthoptera grubu (*Melanoplus sanguinipes* EPV), Gammaentomopoxvirusler Diptera grubu (*Chironomus luridis* EPV) (Arif ve Kurstak, 1991; Goodwin vd., 1991; Moyer, 1999) böcekleri enfekte eden virüsleri kapsarken, bazı virüsleri kapsayan tanımlanmamış bir başka Entomopoxvirinae cinsi de bulunmaktadır.

EPV’lerin en önemli karakteristik yapısı, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında büyük oval şekilli sferoidlerin oluşumudur. Sferoidler, moleküler ağırlığı yaklaşık 110-115 kDa olarak bilinen sferoidin proteininden oluşur (Bilimoria ve Arif, 1979). Sferoidin sentezi, EPV replikasyon döngüsünün geç aşamasında ortaya çıkar ve bu protein, virüs parçacıklarının içine gömüldüğü, virüsleri UV ışığına ve ısıya karşı koruyan matriksi oluşturur (Palmer vd., 1995).

Spindıllar, alfaentomopoksvirüsler ve bazı Lepidoptera grubu üyesi EPV'ler ile enfekte olmuş hücrelerinin sitoplazmasında, ikinci bir protein yapı olarak bulunur. Bu yapılar, şu ana kadar hiçbir Orthoptera veya Diptera konakta gözlenmemiştir. Spindıllar, 1-15 µm boyunda, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında veya bir sferoid içinde virüs partikülleriyle beraber görülebilirler. Fusolin proteini tarafından oluşturulan bu yapılar, sferoidlerden çok farklıdır ve ilk olarak Bergoin ve arkadaşları (1970) tarafından çalışılmıştır. Spindılların bilateral simetriye sahip olması, onları kolayca sferoidlerden ayırt etmeyi sağlar. Spindılların, sferoidlerden diğer bir önemli farkı ise spindılların gömülü virüslere sahip olmamasıdır.

Böcek gruplarını enfekte eden virüsler arasında yapısal farklılıklar mevcuttur. Ancak, EPV'ler, orthopoksvirüslere benzer yapısal özelliklere sahiptirler ve omurgalı poksvirüs gen homologileri gösterdikleri bulunmuştur (Bawden vd., 2000). Bu homologiler sayesinde, iki grup arasında, gen regülasyonunda benzerliklerin olması da mümkündür. Bu virüslerin çoğunluğunu moleküler seviyede anlamak için, *Amsacta moorei* EPV (AMEV) üzerinde yapılan çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Çünkü, AMEV, hücre kültüründe replike olabilen sadece birkaç EPV'den biridir (Langridge, 1983; Goodwin vd., 1990). Daha sonra, D. J. Dall tarafından yapılan çalışmaların yayınlanmamış sonuçlarına göre, *Heliothis armigera* entomopoksvirüsünün de serumsuz lepidoptera hücre kültürlerinde çoğalabileceği bildirilmiştir.

#### **1.4. *Amsacta moorei* Entomopoksvirüs (AMEV)**

*Amsacta moorei* entomopoksvirüs (AMEV), betaentomopoksvirüslerdendir ve doğal olarak *Amsacta moorei*'den izole edilmiştir. Ayrıca, *Estigmene acrea* (Hall ve Hink, 1990) ve *Lymantria dispar* (Arif ve Moyer, Basılmamış sonuçlar) gibi tarımsal bakımdan zararlı böcekleri enfekte ettiği rapor edilmiştir. Böcek konaklarında enfeksiyon, ekstrasellüler virüsün böcek tarafından yenilmesiyle ve böceğin alkali orta barsağında inklüzyon yapının sindirilmesiyle başlar. AMEV'nin larvalarda oluşturduğu enfeksiyon, larvanın gelişim aşamasına özeldir. Fakat, larvaya ait yağ doku, hemositler, sinir hücreleri, orta bağırsak hücreleri, hipodermis, trakeoblastlar ve kas hücreleri gibi bir çok hücre ve doku enfeksiyona maruz kalır (Bawden vd., 2000). Enfekte olmuş larvalarda, inklüzyon yapılarının varlığı, tipik bir durumdur. Inklüzyon yapılar, sferoidin matrikse gömülü halde viral parçacıkları bulundurur (Arif ve Kurstak, 1991). Tomurcuklanan virüslerin çevreye

saçılması, böceğin kusması, dışkılaması ve ölü larvanın etrafa dağılmasıyla meydana gelir (Goodwin vd., 1991). Bu yüzden, hem doku kültüründe moleküler özelliklerini hem de böceklerde poksvirüslerin patojenitesini araştırmak için, AMEV'nin kullanımı kolay bir yaklaşımdır.

AMEV'nin 232,392 bp'lik genomunun dizisi tamamen belirlenmiştir (Bawden vd., 2000). Bu sonuç, yaklaşık olarak diğer böcek poksvirüsleri için tahmin edilen veya yayınlanan genom miktarına eşittir. AMEV'de kodlama kapasitesinin etkili kullanımı, "uçlarda ters dönmüş tekrar sıralar" (ITR) dahil olmak üzere, %95'dir. Bilgisayar destekli ORF analizlerine göre, AMEV genomunda toplam 279 benzersiz ORF belirlenmiştir. Genomda, merkezi kodlama bölgesinin her iki yanında, yaklaşık 9.4 kb'lik ters yönlü uç tekrar (ITR)'lar mevcuttur. Her bir ITR, 13 ORF'nin birbirinin aynı iki kopyasına sahiptir. Bu durumda, AMEV genomundaki ORF'lerin sayısı 292'ye çıkar (Bawden vd., 2000). Daha sonra, Guo ve Yu (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, AMEV ORF'lerinden 38 tanesinin protein kodlamadığı, biyoinformatik analize göre belirlenmiştir ve protein kodlayan ORF sayısı 254 olarak son halini almıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, AMEV genomunun A+T içeriği %81.5 olarak tahmin edilmiştir (Langridge, 1983). Belirlenen dizinin A+T içeriğinin yeniden hesaplanması sonucunda, bu oran %82.2'ye yükselmiş ve böylece, AMEV poksvirüsler içinde en yüksek A+T oranına sahip virüs olarak belirlenmiştir (Bawden vd., 2000).

AMEV, diğer poksvirüslerde bulunanlara benzer şekilde, gen ifadesini sağlayan promotor elemanlarına sahiptir. AMEV genlerinden 133 tanesinin, erken veya potansiyel olarak erken gen olabileceği düşünülmektedir. Diğer genlerden, 158 tanesi ise, geç veya potansiyel geç gen motifine sahiptir. Genomu oluşturan 179 genden sadece 15'i için, promotor veya düzenleyici elemanlar tanımlanamamıştır. Translasyonel başlangıç kodonunun 100 bp yukarısında TGAAAXXXXA veya TGAATXXXXA sıralarını içeren genler, erken (E) veya potansiyel erken genler (E?) olarak tanımlanır (Bawden vd., 2000). Ayrıca, genin 3' ucuna yakın bir yerde vaksinya virüs (VV) erken terminasyon dizisine (TTTTTNT) sahip olan genler, erken grubu gen olmaya adaydır (Yuen ve Moss, 1987; Gruidl vd., 1992; Sriskantha vd., 1997). Translasyonel başlangıç dizisinde TAAATG sırasını taşıyan AMEV ORF'leri, geç genler (L) olarak düşünülür (Weir ve Moss, 1984; Rosel ve Moss, 1985; Bertholet vd., 1986; Davison ve Moss, 1989a). Bu geç promotor sırası, *spheroidin* gibi diğer EPV geç genlerinde gözlenmiştir (Hall vd., 1996). Başlangıç kodonundan 100 bp kadar yukarıda TAAAT veya TAAAAT sırasına sahip olan genler ise,

potansiyel geç genler olarak düşünülmektedir. Bu diziler, diğer omurgalı poksvirüs geç genlerinde de bulunmuştur (Roseman ve Hruby, 1987).

### **1.5. Protein Kinazlar**

Protein kinazlar, ATP'deki bir fosfatı hedef substrat proteinin serin, treonin veya tirozin aminoasidine taşınmasını sağlayan büyük bir enzim grubudur. Bu enzimler, protein fosfatazlarla birlikte hücrel sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde anahtar bir role sahiptir. Saflaştırılan ilk protein kinaz, fosforilaz kinazdır (Krebs vd., 1959) ve bunu diğer protein kinazların saflaştırılması izlemiştir. Bilinen protein kinazların sayısındaki bu artış, gen klonlaması ve dizi analiz tekniklerinin avantajı sayesinde meydana gelmiştir. Bu sayede, proteine ait nükleotid dizilerinden aminoasit dizileri elde edilir. Eğer, bu sıralarda protein kinaz katalitik bölgeleri için yüksek bir şekilde korunmuş belirli anahtar diziler mevcutsa, bu proteinin protein kinazları temsil ettiği düşünülür. Substrat seçiciliği ve düzenlenmesi benzer modellere sahip olan protein kinazların katalitik bölgeleri, bir gen kümesi oluşturur. Bu kümelenme, yeni protein kinazların görevi ve özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Katalitik bölgenin proteindeki yeri sabit değildir. Buna rağmen, tek alt üniteden oluşan enzimlerin çoğunda, katalitik bölge proteinin karboksil ucunda bulunur ve amino ucu da proteinin düzenleyici rolünden sorumludur. Çoklu alt ünitelere sahip protein kinazlarda, genel olarak polipeptitler, neredeyse katalitik bölgenin tamamını içerirler. Substrat seçiciliğine göre tanımlanan bütün protein kinazlar, serin/treonin seçici protein kinazlar veya tirozin seçici protein kinazlar olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. İki grup protein kinaz da çok benzer katalitik bölge primer yapısına sahip olmasına rağmen, bu bölgedeki belirli kısa aminoasit dizileri, her iki sınıfı da temsil edebilir (Hanks, 1987). Bu bölgeler, varsayılan protein kinazın, tirozini mi yoksa serin/treonini mi fosforilleyeceğini gösterir.

### **1.6. Viral Protein Kinazlar**

Herpesvirüsler ve poksvirüsler gibi büyük DNA virüsleri, hücrel serin/treonin protein kinazlarla ilişkili proteinleri kodlarlar. Hepatit-B ve veziküler stomatitis virüsleri,

ise yapısal olarak farklı protein kinazları kodlayabilirler. Diğer virüsler, interferon tarafından uyarılan ökaryotik başlangıç faktörü-2, büyüme faktörü tarafından uyarılan protein kinazlar ve mitozu düzenleyen protein kinazlar gibi bazı hücrel protein kinazları aktif hale getirebilirler.

Ortopoksvirüsler büyük bir genomla sahiptir ve genom sıraları belirlenmiştir. Genom dizisine göre, vaksinya virüse ait B1R proteininin, ökaryotik protein kinazlarla kuvvetli homoloji gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Howard ve Smith, 1989; Traktman vd., 1989).

B1R, hücrel protein kinazlarla kuvvetli bir ilişkisi olduğu varsayılan vaksinya virüs gen ürünüdür (Goebel vd., 1990). B1R proteini, *Escherichia coli*'de ifade edilmiş ve kazein gibi bazı sentetik substratları fosforillediği gösterilmiştir (Banham ve Smith, 1992; Lin vd., 1992; Rempel ve Traktman, 1992). Rekombinant B1R için şimdiye kadar *in vitro*'da tespit edilen en iyi substratlar, 40S ribozomal alt ünite proteinlerinden S2 ve Sa proteinleridir (Banham vd., 1993). Bu ribozomal proteinler, B1R kinazın potansiyel fizyolojik substratlarıdır ve B1R kinazın, vaksinya virüsün hücreleri enfeksiyonu süresince fosforillenmeye başladığı vurgulanmıştır (Kaerlein ve Horak, 1976; Kaerlein ve Horak, 1978; Buendia vd., 1987). Fosforilasyon, enfeksiyonun erken safhasında ortaya çıkar ve proteinin sentezinin virüs tarafından durdurulmasıyla zamana bağlı ilişki içindedir. Buna rağmen, ribozomal alt ünitelerin fosforilasyonundaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Diğer yandan, S2-Sa protein kinaz aktivitesi, vaksinya virüs ile enfekte olmuş HeLa hücrelerinden saflaştırılmış ve B1R proteinine karşılık geldiği gösterilmiştir (Beaud vd., 1989; Beaud vd., 1994).

### **1.7. *Amsacta moorei* Entomopoksvirüs Serin/Treonin Protein Kinaz Geni (AMV197)**

Biyoinformatik analizler, AMEV genomunda bulunan, 900 nükleotit ve 299 aminoasit büyüklüğünde olan AMV197 kodlu açık okuma zincirinin (ORF), bir serin/treonin protein kinaz kodlayabileceğini göstermektedir. Bu bilgi, AMV197'ye ait nükleotit ve aminoasit sıralarının incelenmesi sırasında, protein kinazlara ait korunmuş sıraların ve domainlerin tespit edilmesiyle belirlenmiştir (Bawden vd., 2000).

### 1.8. Çalışmanın Amacı

Tezin amacı, yukarıda da belirtildiği gibi, bir protein kinaz olabileceği belirtilen, virüs replikasyonunda ve enfektivitesinde önemli rolü olabileceği düşünülen ve şu ana kadar üzerinde herhangi bir araştırma yapılmamış olan *Amsacta moorei* entomopoksvirüs'e ait AMV197 açık okuma zincirinin transkripsiyonel ve fonksiyonel analizlerini gerçekleştirmektir. Bu amaç çerçevesinde tezin kapsamı şöyledir:

1. Tez konusu olan AMV197'nin güncel ve ileri biyoinformatik yöntemler kullanılarak protein kinaz olma özelliğinin yeniden araştırılması,
2. AMV197'nin transkripsiyonel olarak aktif olup olmadığının, aktif ise transkripsiyon periyodunun ve transkripsiyon sınıfının belirlenmesi,
3. Transkripsiyonel olarak aktif olduğu belirlenen genin anatomik yapısının (translasyona uğramayan 5' ve 3' bölgelerinin) aydınlatılması,
4. Genin virüs replikasyonunda herhangi bir etkisinin olup olmadığının, rekombinant virüs oluşturarak araştırılmasıdır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Hücrelerin ve Virüslerin Temini

*Lymantria dispar* böceğinden geliştirilmiş Ld652 hücre kültürü ve yaban tip AMEV, Dr. Basil Arif'ten (Centre of Forestry, Molecular Virology Laboratory, Sault Ste. Marie, Canada) temin edildi. Diğer yandan, sferoidin proteini yerine, 28 kDa'luk GFP proteini üreten, rekombinant olmasına rağmen yaban tip virüsün replikasyon özelliklerini gösteren *vAmΔshp/gfp* (Palmer vd., 1995), Dr. Richard Moyer'den (Florida University, School of Medicine, Department of Molecular Genetics and Microbiology, Gainesville, FL, USA) sağlandı. Hücreler 28 °C'ye ayarlanmış etüvde, %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma, Kat No: F-0643) katkılı besiyeride (%45 Grace's Insect Medium, GIBCO, Kat No: 11605-045; %45 Excell (TM) 420, Biosciences, Kat No: 14420C), özel hücre kültürü kapları (Corning) içerisinde büyütüldü. Hücrelerin pasajlanması işlemi haftada iki kez gerçekleştirildi.

### 2.2. Virüslerin Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Tayini

Virüs çoğaltma işlemi için, konak olarak Ld652 hücre kültürü kullanıldı. Daha önce, AMEV'nin bu böcek hücre kültüründe çoğaldığı gösterilmiştir (Goodwin vd., 1990). Hücreler AMEV ve *vAmΔshp/gfp* ile büyük ölçekli hücre kültürü kaplarında (75 cm<sup>2</sup>'lik flasklar) ayrı ayrı enfekte edildi. Enfekte edilmiş hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. Elde edilen her bir virüse ait süspansiyondaki virüsün konsantrasyonu, 60 gözlü hücre kültürü kapları (Terasaki kapları; Corning) kullanılarak EPDA (End Point Dilution Assay) metoduna göre belirlendi (Darling vd., 1998).

Deneye başlarken, 10 adet mikrosantrifüj tüpü, 1'den 10'a kadar numaralandırıldı. Virüs, 9. tüpe kadar büyüme besiyerisi içerisinde 1/10 oranında seyreltilti. 10. tüp, kontrol olarak kullanıldı ve buna sadece besiyeri bırakıldı. Bu arada  $1,5-2 \times 10^6$  hücre/ml olarak süspansiyon haline getirilen Ld652 hücrelerinden, 10 tüpün her birine 90 µl eklendi ve karıştırıldı. Yeni pipet ucu kullanarak, Terasaki kabının her satırına (A'dan F'ye doğru) aynı konsantrasyonda olacak şekilde, 10 µl hücre-virüs karışımından eklendi. Virüssüz kuyudan (10. tüp) başlayarak, en yoğun virüs süspansiyonunun olduğu kuyuya (1. tüp) doğru bir sıra



takip edildi. Terasaki kabının kapağı kapatılarak, ıslatılmış peçetelerle birlikte bir kutuya yerleştirildi ve 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyon belirtileri netleşinceye kadar inkübe edildi.

EPDA deneyinin sonuçları, her bir gözdeki enfekte olmuş tek bir hücrenin dahi olup olmamasına göre her kuyuya + (artı) veya - (eksi) değer verilerek kayıt edildi. Virüs konsantrasyonu, aşağıdaki EPDA formülü ve elde edilen değerler kullanılarak hesaplandı.

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

n = enfeksiyon değerinin %50 veya %50'den büyük olduğu en yüksek seyreltme,

a = log n,

b = n. seyreltiğin % değeri,

c = n. değer altındaki % değeri,

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

### 2.3. AMV197'nin Biyoinformatik Analizi

AMV197 kodlu genin aminoasit sırası veri tabanından temin edildi ve Expasy-Prositate programı kullanılarak, protein kinazlara ait bilinen motifler tarandı. Mevcut AMV197 aminoasit sırası içinde, protein kinazlara ait katalitik bölge, ATP'nin bağlanma bölgesi ve ATP'nin bağlandığı yerde hayati değeri olan lizin (K) aminoasidi arandı. Ayrıca, Clustal W programı kullanılarak, AMV197'nin diğer organizmalara ait protein kinazlarla karşılaştırılması yapıldı. Veri tabanından temin edilen, vaksinya virüse ait B1R protein kinaz (VACV-B1-RPK, YP233065), *Melanoplus sanguinipes* entomopoksvirüs protein kinaz (MSEV-PK, AF063866), fareye ait bir protein kinaz (PIM-1, AAA39930), yine fareye ait serin/treonin protein kinaz dönüştürücü protein (MOS, P00538) ve *Saccharomyces cerevisiae*'ya ait hücre bölünmesi kontrol proteini 28 (CDC28, P00546) proteinlerinin aminoasit sıraları, AMV197'nin aminoasit sırasıyla karşılaştırıldı.

## **2.4. AMV197'nin Transkriptomik Analizi**

### **2.4.1. Transkripsiyon Kinetiğinin Belirlenmesi**

#### **2.4.1.1. Enfekte Olmuş Hücrelerden mRNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Tayini**

AMV197'nin AMEV ile enfekte olan Ld hücre kültüründe transkripsiyon zamanını belirlemek için, enfekte olan hücrelerden farklı zamanlarda izole edilen mRNA'ların RT-PCR yöntemiyle analizleri yapıldı. 0., 1., 2., 4., 7., 12. ve 24. saatler ve kontrol için olmak üzere, sekiz adet T-75 flaske,  $1 \times 10^7$  Ld652 hücresi içeren 15'er ml besiyeri bırakıldı. Yaklaşık 2-3 saat kadar hücrelerin tutunması için beklendikten sonra hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp, MOI = 2 olacak şekilde 2 ml virüs süspansiyonu eklendi. Virüslerin hücreye tutunması için, iki saat 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler FBS katkısız besiyeriyle yıkanarak tutunmayan virüsler uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 15 ml taze besiyeri eklendi. Bu zamanın 0. saat olduğu kabul edildi. 0. saat için ayrılan flaskdeki hücreler, besiyeri ile birlikte toplandı ve bu hücrelerden mRNA izolasyon kiti (PolyATtract System 1000, Z5420; Promega) kullanılarak, kitteki yöntemlere göre mRNA izolasyonu yapıldı. Diğer flasklerdeki hücreler de, saatlerine uygun şekilde toplandı ve bunlardan da mRNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen mRNA'ların konsantrasyonu ve saflığı SpektraMax M2 (Molecular Devices Corporation) okuyucuda belirlendi.

#### **2.4.1.2. İzole Edilen mRNA'ların DNazI ile Muamele Edilmesi**

İzolasyon sırasında meydana gelebilecek DNA kontaminasyonundan mRNA'ları temizlemek için, mRNA'lar DNazI ile muamele edildi. Bu amaçla, her bir örnek için 8 µg mRNA, 5 µl tampon (10x) ve 2 µl DNazI (Sigma, AMP-D1, 1u/µl) karışımı bir tüpe bırakıldı. Son hacim, ddH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlanarak, karışım 15 dakika oda ısısında bekletildi. Bekleme süresi sonunda, 2'şer µl "stop solüsyonu" ilavesiyle, mRNA hidrolizini katalizleyebilecek divalent iyonların inaktivasyonu sağlandı. DNazI ve mRNA'nın denatürasyonu için 70 °C'de bekletilen mRNA'lar, yeniden spektrofotometrik olarak ölçüldü.

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

İzole edilen mRNA'lar kullanılarak cDNA oluşturulması işlemine geçildi. Konsantrasyonu belirlenen mRNA'lardan, cDNA reaksiyonu için her reaksiyon başına yaklaşık 2'şer µg kullanıldı. Her bir zaman dilimi için izole edilen mRNA, primer (oligo dT-ankor primeri; 5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C(T)<sub>16</sub>V-3') ve ddH<sub>2</sub>O farklı mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı. Tüp ve içeriği, 70 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra buz içersine bırakılarak soğutuldu ve içerisine 2,5 µl tampon (10x, M-MuLV Revers Transkriptaz enzimine ait) ve 2 µl dNTP (10 mM) karışımı eklendi. Son karışım 37 °C'de 2 dakika bekletildi. Bu karışımdan 2 µl alındı ve DNA kontaminasyonunu araştırmak için yapılan PCR'de kalıp olarak kullanıldı. Geri kalan 23 µl'lik sıvıya 0,92 µl M-MuLV Revers Transkriptaz (Biolabs) enzimi ilave edildi. Önce 37 °C'de 60 dakika bekletilerek enzimin aktivitesi, daha sonra 70 °C'de 15 dakika bekletilerek enzimin inaktivasyonu sağlandı. Her bir zaman için ayrı ayrı yapılan cDNA'lar, PCR ürünü temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) 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 13.000×g'de santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. cDNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 20 µl, 10 mM Tris-HCl ilave edildi ve 13.000×g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu şekilde elde edilen cDNA, tampon ve enzim gibi kimyasallardan temizlenmiş oldu. Daha sonra, cDNA'lardan aşağıdaki şekilde PCR yapılarak, RT-PCR işlemi tamamlanmış oldu. PCR işlemi, mRNA'da DNA kontaminasyonu olmadığını görmek için, mRNA kalıbı kullanılarak da uygulandı. Bu uygulamadan herhangi bir bant beklenmemektedir.

<u>PCR Karışımı</u>		<u>PCR Koşulları</u>	
1 µl	Kalıp (mRNA/cDNA)	95 °C'de 3'	
1 µl	PKSP4 (İleri Primer)	} 35 döngü	
1 µl	PKR (Geri Primer)		95 °C'de 1'
1 µl	dNTP		55 °C'de 30''
3 µl	MgCl <sub>2</sub>		72 °C'de 1'
5 µl	Tampon 10x		
0.5 µl	Taq DNA polimeraz	72 °C'de 7'	
37.5 µl	ddH <sub>2</sub> O	4 °C'de ∞	

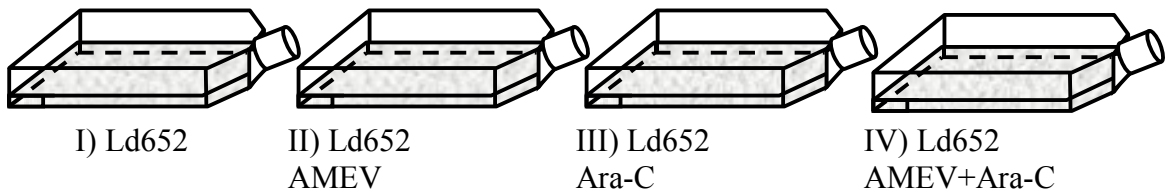
PKR (5'-GGC AAA CTT CCA CTA TAC C-3')

PKSP4 (5'-CCG TTG TTT GTA GAA ATG C-3')

#### 2.4.2. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi

AMV197 kodlu ORF'nin transkript edildiği gen ekspresyon sınıfını tayin edebilmek için, AMEV ile enfekte olmuş Ld652 hücreleri, DNA sentezi inhibitörü olan β-D-Arabinofuranozilsitozin (Ara-C; Sigma, Kat No: C-1768) ile muamele edildi.

AMV197'nin gen ifade sınıfını belirlemek için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Dört adet T-75 flaske, 15 ml besiyeri ve Ld652 hücre ( $1 \times 10^7$ ) karışımı bırakıldı. Yaklaşık 4-5 saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı. Flaskların iki tanesine (I ve II no'lu) normal besiyeri, diğer iki tanesine (III ve IV no'lu) de Ara-C (100 µg/ml) inhibitörü eklenmiş besiyerinden 5 ml eklendi (Şekil 3).



Şekil 3. AMEV'nin enfeksiyonunda inhibitör kullanımı

Hücreler, bir saat 28 °C'lik etüvde bekletildikten sonra, hücrelerin üzerindeki sıvı alındı. Virüs enfeksiyonu yapılacak olan flasklar (II ve IV no'lu) için MOI = 2 olacak şekilde, 2'şer ml enfeksiyon sıvısı hazırlandı ve ilave edildi. İnhibitör içeren flasklar (III ve IV no'lu) için inhibitör ilavesi yeniden sağlandı. Flasklar virüslerin hücreye tutunması için, iki saat 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve hücreler inhibitör içerip içermediğine uygun olarak, 2'şer ml besiyeri kullanılarak yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine yine inhibitör içeriğine uygun olarak 15'er ml taze besiyeri eklendikten sonra kapağı kapatılıp, 28 °C'lik etüvde, bu gene ait transkripsiyonun en yüksek zaman dilimi olan, 16 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda yukarıda belirtildiği gibi mRNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilen mRNA'lar, DNA kontaminasyonuna karşı, yukarıdaki gibi DNazI ile muamele edildikten sonra spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu mRNA'lar, AMV197'ye özel primerler kullanılarak, daha önce açıklandığı şekilde RT-PCR işlemine tabi tutuldu.

## 2.5. Protein Kinaz Geninin Transkriptomik Yapısının Aydınlatılması

Genin transkriptomik yapısının aydınlatılması amacıyla 5'/3' RACE deneyi yapılarak transkripsiyonun başlama noktası (5' ucu) ve durma noktası (3' ucu) belirlenmeye çalışıldı.

AMV197 geninin transkripsiyon başlangıç ve bitiş noktalarını tespit edebilmek için 5'/3' RACE (cDNA uçlarının rasgele çoğaltılması) tekniği kullanıldı (Frohman vd., 1988). Bu işlem için, daha önceden genlerin 5' ucuna ait üçer adet geri primeri (PKSP1, PKSP2, PKSP3) ve 3' ucuna ait 2 adet ileri primeri (PKSP4, PKSP5) sentezletirildi (Tablo 2). Bu primerler kullanılarak deney şartları, 5'/3' RACE kitindeki (ROCHE, Kat No: 1 734 792) kullanma yöntemine göre oluşturuldu.

Tablo 2. Protein kinaz geninin 5' ve 3' kısımlarına ait primerler

Primer Adı	Primer Sırası	Genomdaki Yeri
PKSP1-Rv	5'-CAT AAT AAT CTA TTA CTA TAT ATC-3'	169558–169534
PKSP2-Rv	5'-CCA TTA TGA TAT AGT AAT GGT ATT CC-3'	169504–169479
PKSP3-Rv	5'-GCA TTT CTA CAA ACA ACG G-3'	169411–169392
PKSP4-Fw	5'-CCG TTG TTT GTA GAA ATG C-3'	169392–169411
PKSP5-Fw	5'-CAA CAC TTG TTT AAC TAA TTC ACC-3'	169964–169988

### 2.5.1. Toplam RNA İzolasyonu

Besiyeri içerisinde süspanse edilmiş  $2,5 \times 10^6$  Ld hücresi 1,5 ml hacim içerisinde, 60 mm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kabına (Petri) bırakıldı. Yaklaşık 10-12 saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra, hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp MOI=2 konsantrasyonunda AMEV süspanasyonu (900 µl/petri) eklendi. Virüslerin hücreye tutunması için, iki saat 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler katkısız besiyeri ile iki kez yıkanarak tutunmayan virüsler uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1,5 ml taze besiyeri eklendi. Enfeksiyondan 16 saat sonra, AMEV ile enfekte olmuş hücrelerden, QIAGEN RNeasy ticari kit (Kat: 74106) kullanılarak, kitteki yöntem göre toplam RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü. RNA örneği, RNA'nın izolasyonu sırasında açığa çıkabilecek RNaz enzimiyle parçalanıp parçalanmadığını belirlemek için, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntüsü Kodak MI Jel görüntüleme cihazıyla kaydedildi.

### 2.5.2. Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 5' Ucunun Rasgele Çoğaltılması (5' RACE)

Genin 5'RACE analizinin ilk aşamasında, toplam RNA'dan PKSP1 primeri kullanılarak tek zincir cDNA sentezi gerçekleştirildi. Daha sonraki aşamaları da içeren 5' RACE yönteminin şematik gösterimi aşağıdadır (Şekil 4).

Sentez işlemi için, 5'/3' RACE kitindeki kimyasallar kullanıldı. Bir tüpe;

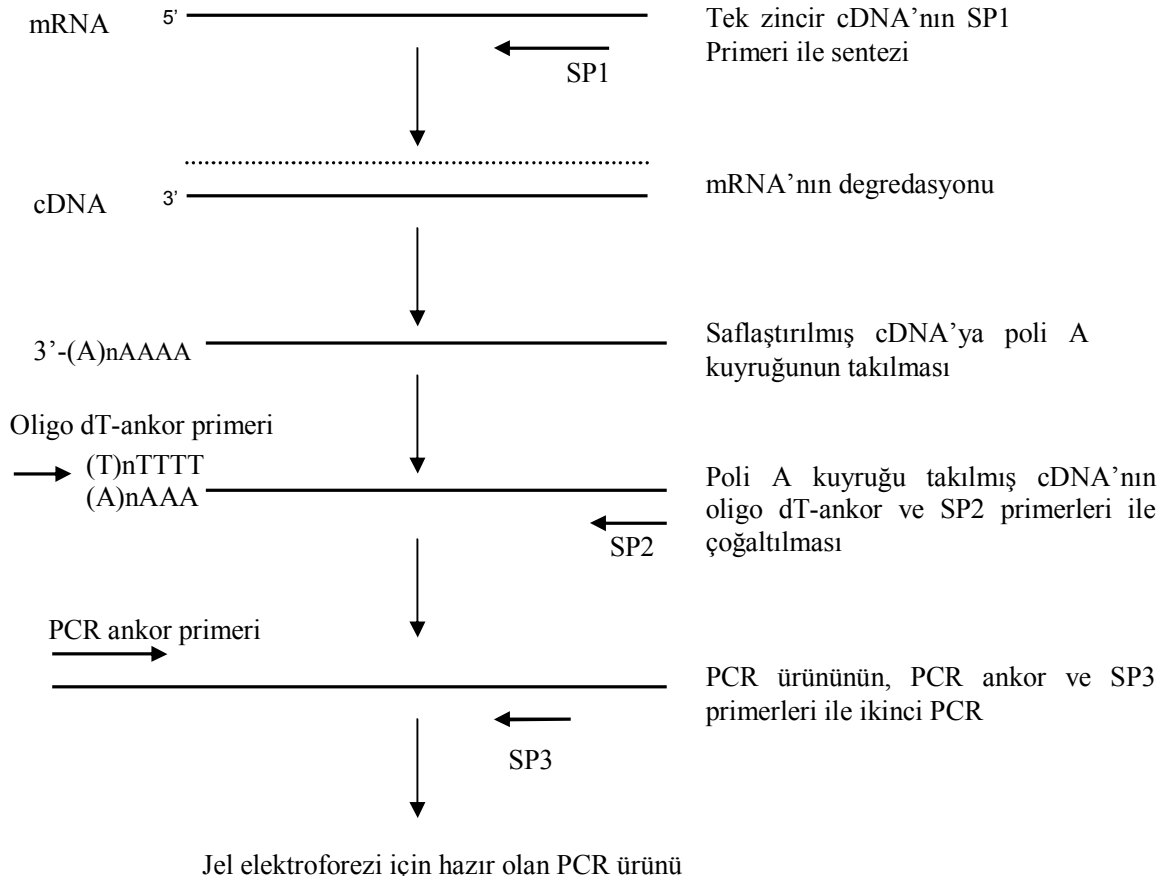
cDNA sentez tamponu (tüp 1)	∴ 4 µl (5x)
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	∴ 2 µl
PKSP1 primeri	∴ 1 µl (12 µM)
Toplam RNA	∴ 2 µg (3 µl)
AMV revers transkriptaz (tüp 2)	∴ 1 µl
H <sub>2</sub> O	∴ 9 µl

karışımı bırakıldı. Karışımın 55 °C'de 60 dakika ve 65 °C'de de 10 dakika bekletilmesi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA, PCR ürünü temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) kullanılarak yukarıdaki talimata göre temizlendi.

Temizlenen cDNA'nın 3' ucuna, terminal transferaz enzimi kullanılarak "poli A" kuyruğu takıldı. Bunun için bir tüpe;

Temizlenen cDNA örneği	: 19 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 2,5 µl (10x)
2 mM dATP (tüp 4)	: 2,5 µl

karışımı bırakıldı ve karışım 94 °C'de 3 dakika bekletildikten sonra hemen buz üzerine alındı. Üzerine 1 µl terminal transferaz (tüp 6, 10 ünite/µl) ilave edilip karıştırıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Enzimin inaktivasyonu için, karışım 70 °C'de 10 dakika bekletildi.



Şekil 4. 5'RACE analizi

Bu şekilde "poli A" kuyruğu takılmış cDNA, önce PKSP2 primeri sonra PKSP3 primeri kullanılarak birbirini takip eden iki ayrı PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Birinci PCR reaksiyonunda tüpe;

“Poli A” kuyruğu takılmış cDNA	: 5 µl
Oligo dT-ankor primeri (tüp 8)	: 1 µl
PKSP2 primeri	: 1 µl (12 µM)
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl (10x)
H <sub>2</sub> O	: 36,5 µl

karışımı bırakıldı ve PCR yapıldı. PCR reaksiyonu 94 °C’de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C’de 30 saniye, 50 °C’de 30 saniye ve 72 °C’de 1 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. İkinci PCR reaksiyonunda ise yine bir tüpe;

Birinci PCR ürünü	: 1 µl
PCR-ankor primeri (tüp 9)	: 1 µl
PKSP3 primeri	: 1 µl (12 µM)
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl (10x)
H <sub>2</sub> O	: 40,5 µl

karışımı bırakıldı ve üstteki PCR programına tabi tutuldu. Neticede oluşan ürün %1,2’lik agaroz jelde elektroforez edildi. PCR sonucu oluşan DNA parçası jelde görüntülendi.

### **2.5.3. Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 3’ Bölgesinin ve Transkripsiyon Bitiş Noktasının Tespit Edilmesi**

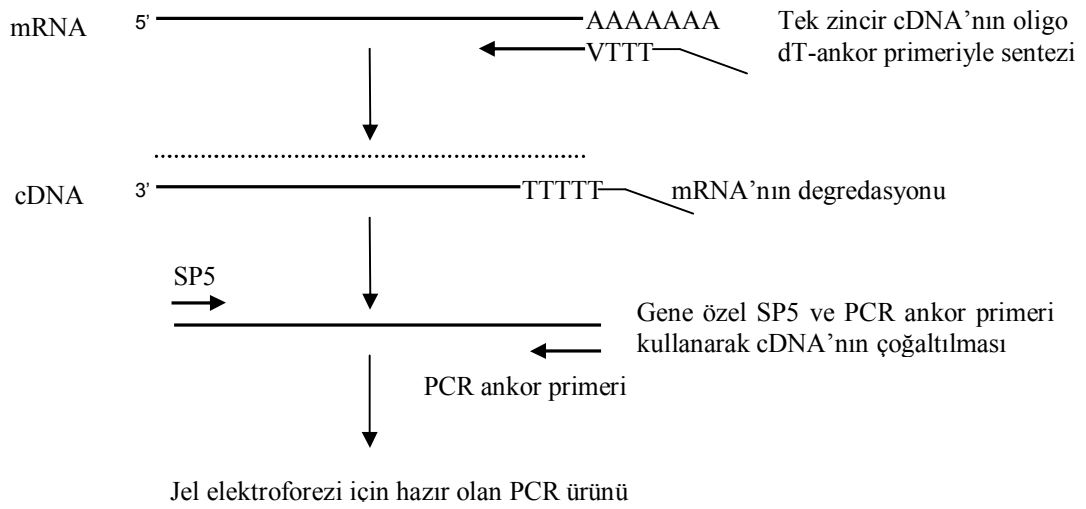
Genin 3’ ucuna uygun ileri (forward) primeri kullanılarak deney şartları 3’ RACE kitindeki (ROCHE, Kat No: 1 734 792) kullanma yöntemine ikinci bir PCR’nin ilavesiyle oluşturuldu. Ökaryotik bir hücreyi enfekte eden AMEV için, mRNA’nın poli(A) taşıdığı gerçeğinden yola çıkarak, cDNA yapımında oligo dT-ankor primeri kullanıldı.

Şekil 5’de, 3’RACE analizi şematik olarak anlatılmaktadır. PKSP4 primerinin kullanıldığı ilave PCR basamağı şemada gösterilmedi. Sentez işlemi için, 5’/3’ RACE kitindeki kimyasallar kullanıldı. Bunun için bir tüpe;



cDNA sentez tamponu (tüp 1)	: 4 $\mu$ l (5x)
Deoksिनükleotid karışımı (tüp 3)	: 2 $\mu$ l
Oligo dT-ankor primer (tüp 8)	: 1 $\mu$ l (12 $\mu$ M)
Toplam RNA	: 2 $\mu$ g (3 $\mu$ l)
AMV revers transkriptaz (tüp 2)	: 1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	: 9 $\mu$ l

karışımı bırakıldı. Reaksiyon, 55 °C'de 60 dakika inkübe edilerek tamamlandı ve 65 °C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. Böylece cDNA sentezlenmiş oldu.



Şekil 5. 3'RACE analizi

Bu şekilde sentezlenmiş cDNA, PKSP4 primeri kullanılarak PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. PCR reaksiyonu için tüpe;

cDNA	: 5 $\mu$ l
PCR ankor primeri (tüp 9)	: 1 $\mu$ l
PKSP4 primeri	: 1 $\mu$ l (12 $\mu$ M)
Deoksिनükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	: 0,5 $\mu$ l
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 $\mu$ l (10x)
H <sub>2</sub> O	: 36,5 $\mu$ l

karışımı bırakıldı ve PCR yapıldı. PCR reaksiyonu 94 °C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Neticede oluşan ürün kalıp olarak kullanılarak

ikinci bir PCR yapıldı. Böylece oluşacak ürünün gen için daha seçici olması sağlandı. Bu PCR için PKSP5 ve PCR ankor primeri kullanıldı. Elde edilen ürün %1,2'lik agaroz jelde elektroforez edildi ve oluşan DNA parçası jelde görüntülendi.

#### **2.5.4. Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 5'/3' Bölgelerini İhtiva Eden Vektörün Oluşturulması**

Klonlama işlemleri için fragmanlar, yukarıda belirtilen primerler (PKSP1-Rv, PKSP2-Rv, PKSP3-Rv, PKSP4-Fw, PKSP5-Fw) ve PCR koşulları uygulanarak çoğaltıldı. Elde edilen fragmanlar, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jelden temizlendi. Temizlenen DNA, %1,2'lik agaroz jelde tekrar elektroforez edilerek konsantrasyonları kontrol edildi.

#### **2.5.5. Fragmanlar ile Vektörün Ligasyonu**

Jelden temizlenen DNA fragmenti, ampisilin antibiyotiğine direnç geni taşıyan pGEM-T Easy vektörüne, 3 DNA fragmenti: 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pGEM-T Easy) klonlandı. Reaksiyon

1 µl pGEM-T Easy vektörü,

5 µl 2× ligasyon tamponu,

1 µl T4 DNA ligaz (Promega) ve

3 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 10 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi.

Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

#### **2.5.6. Elektrokompotent DH5α *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması**

Petriye ekilmiş DH5α *E. coli* hücrelerinden tek bir koloni alınıp, NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden, 1:100 oranında LB Broth besiyerine aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de, yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 OD 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 steril 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 saklandı.

### 2.5.7. Elektrotransformasyon

Protein kinaz geninin translasyona uğramayan DNA sıralarının klonlandığı plazmidleri hücreye aktarmak için, elektrokompetent DH5α hücreleri kullanıldı. Kompetent *E. coli* hücrelerinin bulunduğu tüpler, -80 °C'den buz üzerine alındı ve bu hücrelerin üzerlerine, 1-3 µl ligasyon karışımından konuldu ve karıştırıldı. Karışım elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve kuvvetler elektroporatör cihazına (BioRad) yerleştirildi. Kuvvetler, cihazda 200 ohm, 1,5-2K ve 25mF'de 3-4 sn bekletildi. Ardından kuvvetin içeriği 1ml 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 süspansiyon edildi ve petri kaplarında bulunan, 1/1000 oranında ampisilin antibiyotiği içeren, 40 µl IPTC (izopiripil beta-D-tiyogalaktozid) (100 mM) ve 40 µl X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid) (50 mg/ml) sürülmüş LB Agar besiyerisi üzerine cam bagetle yayıldı. Petriyerler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden, yalnızca beyaz olanlardan gece kültürleri hazırlandı. Hatalı olabilecek kolonileri de göz önünde bulundurarak her bir klonlama için yaklaşık 10 koloni seçildi.

### 2.5.8. Plazmid DNA İzolasyonu ve Klonların Seçimi

Plazmid DNA'larının izolasyonu için, hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant, geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti kalan süpernatant içinde vorteksenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; %0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben, üzerine 150 µl 3

M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. Hazırlanan karışım, 10 dakika buz içinde bekletildi ve bu sürenin sonunda, 14.000 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %100'lük etanol ilave edilerek 14.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve 10 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü.

### 2.5.9. Restriksiyon Analiziyle Klonların Doğrulanması

İzole edilen plazmid DNA'ların protein kinaz geninin translasyona uğramayan bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları *EcoR* I restriksiyon enzimi ile muamele edildi. pGEM-T Easy vektörü, *EcoR* I enzimi için iki adet kesme bölgesi içermektedir. Bu enzim kullanılarak kesim yapıldığında, agaroz jel üzerinde biri vektöre ait ~3000 bp'lik DNA ve diğeri vektöre ligasyonu sağlanan yabancı geni içeren DNA olmak üzere iki DNA bandı ortaya çıkmaktadır. Yabancı DNA bandının, DNA markıra göre beklenen uzunlukta olması, klonların doğrulanması için bir basamak teşkil etmektedir. Bunun için, 10 µl DNA, 0,5 µl *EcoR* I (Promega), 1,5 µl enzime ait 10x tamponu ve 3 µl H<sub>2</sub>O olacak şekilde 15 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve kesim reaksiyon tüpü, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından reaksiyon karışımı, %1,2'lik jelde elektroforez edildi. Seçilen klonların büyük bir kısmının restriksiyon analizleri sonucunda, yaklaşık 250 baz çifti DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

### 2.5.10. Klonlanan 5'/3' Translasyona Uğramayan Bölgelerin Dizi Analizi

Protein kinaz geninin 5' ve 3' bölgeleri için doğru olduğu belirlenen klonlardan, kit (Promega, Kat No: A1360) kullanılarak saf plazmid DNA'ları izole edildi. Bunun için 3 ml gece kültürü, 9.000 rpm'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 13.000 rpm'de, 1 dakika 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 rpm'de, 1 dakika santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü. Tüm DNA'ların 20 µl'lik hacim içinde 100-200 ng/µl'lik konsantrasyonları hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek, DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için, Macrogen Firmasına (Kore) gönderildi. Dizi analizi için T7 primeri kullanıldı. Dizi sonuçlarına göre, genin 5'/3' proteine dönüşmeyen bölgeleri belirlendi.

## 2.6 Protein Kinaz Geni (AMV197) Çıkarılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması

Belirlenen genin fonksiyonel analizini gerçekleştirebilmek için ilk basamak, bu genin virüs genomundan silinmesi ve bu gen bakımından negatif (mutant) virüsün oluşturulmasıdır. Genin virüs genomundan silinmesi işlemi, bir işaret gen (Green fluorescent protein, GFP)'i ile AMV197 kodlu genin yerlerinin değiştirilmesi şeklinde gerçekleştirildi. Bunun için, ilk önce protein kinaz geninin askı bölgelerini içeren bir ara vektör oluşturuldu. Oluşturulan bu ara vektördeki askı bölgelerinin arasına GFP geni yerleştirilerek, sonuç transfer vektörü oluşturuldu. Daha sonra, Ld652 hücrelerine yaban tip virüsün enfeksiyonu ve transfer vektörün transfeksiyonu sonucu, hücrede homolog rekombinasyon neticesinde oluşabilecek rekombinant virüsler oluşturulmaya çalışıldı. Rekombinant virüs seçilerek test edildi.

### 2.6.1. *gfp* İçeren Rekombinant Transfer Vektörünün Oluşturulması

Protein kinaz geninin kodlayan bölgesinin (ORF) baş kısmından, 1184 (AMV197SUR) ve son kısmından, 1051 (AMV197SDR) bazlık DNA fragmentleri belirlendi. Bu bölgeleri AMEV genomundan ve işaretleme amacıyla kullanılacak *gfp* genini pDU20*gfp* transfer vektöründen çoğaltmak için, 3 çift primer hazırlandı (PK2Fw, PKSURRv, PKSDRFw, PK1Rv, AMV197GFPP, AMV197GFPR). Primerlere, üretilecek PCR ürünlerinin pBlueScript SK(-) vektörüne aynı oryantasyonda klonlanmasına imkan sağlayan ve vektörde bulunan kesme bölgelerine uygun enzim kesme bölgeleri eklendi (Tablo 3). Hazırlanan primerler kullanılarak, AMV197'nin baş ve son kısmı yaban tip

AMEV DNA'sından ve *gfp* geni pDU20*gfp* transfer vektöründen, sferoidin promotoruyla beraber PCR yöntemiyle çoğaltıldı.

PCR işlemi için, 3'→5' ekzonükleaz (hataları doğrulama) aktivitesine sahip olan Phusion (FINNZYMES, Kat No: F-530S) marka DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

<u>PCR Karışımı</u>		<u>PCR Koşulları</u>
1 µl	Kalıp DNA	95 °C'de 3'
1,5 µl	İleri Primerler	} 35 döngü
1,5 µl	Geri Primerler	
1,5 µl	dNTP	
1 µl	MgCl <sub>2</sub> 50mM	
10 µl	HF Tampon 5x	72 °C'de 1'
0,5 µl	Phusion DNA polimeraz	72 °C'de 7'
33 µl	ddH <sub>2</sub> O	4 °C'de ∞

Tablo 3. Homolog rekombinasyon için kullanılan primerler. Enzim kesme bölgelerinin altı çizildi. Klonlama işlemi için, AMV197GFPF ve AMV197GFPR primerlerindeki kesme bölgeleri değil, pGEM-T Easy vektördeki *EcoR* I kesme bölgesi kullanıldı.

Primer Adı	Enzim Bölgesi	Primer Sırası	Genomdaki Yeri
PK 2 Fw	<i>SacI</i>	5'-TTGAGCTCCATAACCATTTTTTATAACACGCATAGTACC-3'	168069-168100
PKSURRv	<i>PstI</i>	5'-GGCTGCAGCGTCCATTTTAATTAATTATTATATATTATATC-3'	169252-169220
PKSDRFw	<i>HindIII</i>	5'-GGAAGCTTGATAAATTAGTTTTTTGTAAATAAAATT-3'	170122-170149
PK 1 Rv	<i>KpnI</i>	5'-GGGGTACCCATAATAACTATTATCTAATGTCTGTAT-3'	171145-171172
AMV197GFPF	<i>SacI</i>	5'-GCATCGAGAGCTCTACTGTGCGAAACATCTAACG-3'	
AMV197GFPR	<i>PacI</i>	5'-GCATCGATTAAATTAATAATTCTCACTTGTACAGCTC-3'	

### 2.6.2. Transfer Vektörünü Oluşturmak İçin Çoğaltılan DNA'ların Birleştirilmesi

Protein kinaz ORF'sinin PCR ile çoğaltılan 1184 bp'lik baş kısmı (AMV197SUR), çoğaltılan primerlerdeki ve pBlueScript SK (-) vektöründeki kesme bölgeleri (*Sac* I ve *Pst* I) kullanılarak kesim işlemine tabi tutuldu.

Kesim yöntemi

10 µl	DNA (pBlueScript SK(-) ve AMV197 baş kısım PCR ürünü)
1 µl	<i>Sac</i> I
1 µl	<i>Pst</i> I
2 µl	TA tampon 10x
6 µl	ddH <sub>2</sub> O

karışımı, hem pBlueScript SK(-) için hem de AMV197 baş kısmının PCR ürünü için iki ayrı tüpte hazırlandı. Tüplerin içeriği, hafifçe karıştırıldıktan sonra, 37 °C'de 2 saat inkübe edilerek enzimlerin reaksiyonu sağlandı. İki saatin sonunda her bir tüp içeriği %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü. Vektör için 2964 bp'lik ve AMV197 için 1184 bp'lik beklenen bantlar elde edildi.

Enzimlerle kesilip sonra elektroforez edilen pBlueScript SK(-) vektörün ve AMV197 baş kısmının oluşturduğu bantlar, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi, DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) ve bu kitte bulunan uygulama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Kontrol işleminden sonra, daha önce jelden temizlenen DNA fragmentleri, 3 PCR fragmenti : 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pBlueScript) klonlandı. Reaksiyon,

2 µl	pBlueScript SK(-) vektörü,
10 µl	2x ligasyon tamponu,
1 µl	T4 DNA ligaz (Promega) ve
7 µl	DNA (AMV197SUR) fragmenti bir araya getirilerek 20 µl'lik hacim içinde

gerçekleştirildi. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Protein kinaz geninin baş bölgesinin klonlandığı plazmidleri hücreye aktarmak için, elektrokompotent DH10β hücreleri kullanıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerden gece kültürleri hazırlandı. Plazmid DNA'larının izolasyonu için, hızlı miniprep metodu kullanıldı.

İzole edilen plazmid DNA'ların protein kinaz geninin baş bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları *Sac* I ve *Pst* I restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Kesim işlemi için yukarıdaki yöntem kullanıldı. Ardından %1,2'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Kesim sonucu yaklaşık 1000 baz çifti DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. Belirlenen klonlardan pBS-AMV197SUR2 kodlu

klon, AMV197SDR'ye ait PCR ürününü klonlamak üzere ayrıldı, DNA dizi analiziyle klonun sırası doğrulandı ve stoklandı.

pBS-AMV197SUR kodlu klon ve protein kinaz ORF'sinin PCR ile çoğaltılan 1051 bp'lik son kısmına (AMV197SDR) ait PCR ürünü, yukarıdaki yönteme göre, *Hind* III ve *Kpn* I enzimleriyle kesildi. Kesilen DNA fragmanları, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden temizlendi. Temizlenen DNA'lar %1,2'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, daha önce jelden temizlenen DNA fragmentlerinin, ligasyonu sağlandı. Ligasyon ürünü, önceden hazırlanan elektrokompotent *E. coli* DH10 $\beta$  suşuna, elektrotransfomasyonla aktarıldı.

AMV197SUR'nin pBlueScript SK(-) vektöre transformasyonda, bu vektörde bulunan *LacZ* geni parçalandığı için, AMV197SDR'ye ait PCR ürününün pBS-AMV197SUR vektöre transformasyonundan sonra, bu kez beyaz kolonilerden rasgele ekim yapıldı. Beyaz koloniler üreten suşlardan, hızlı miniprep yöntemi ile plazmid DNA'larının izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidlerin doğrulanması için, *Hind* III ve *Kpn* I restriksiyon enzimleriyle yukarıdaki şekilde kesim işlemi yapıldı. Ardından %1,2'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Kesim sonucu yaklaşık 1000 baz çifti DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. Belirlenen klonlardan pBS-AMV197SURSDR19 kodlu klon, *gfp* genine ait PCR ürününü klonlamak üzere ayrıldı, DNA dizi analiziyle sırası doğrulandı ve stoklandı.

pDU20*gfp* transfer vektöründen PCR yöntemiyle, sferoidin promotoruyla beraber çoğaltılan *gfp* geni, jelden temizlendi ve sferoidin promotorunun altında *gfp* geninin içeren bu parça, pGEM-T Easy vektöre A-T yöntemiyle klonlandı. Oluşturulan yeni vektör, pG-*gfp* olarak isimlendirildi ve DNA dizi analizi yaptırılarak *gfp*'nin DNA sırası doğrulandı.

pBS-AMV197SURSDR vektöre *gfp* geninin ligasyonunu sağlamak için, her iki DNA sırası da aynı enzimle kesilmek zorundadır. Bunun için uygun olan, *EcoR* I enzim kesme bölgesidir. Kesim için kullanılan *EcoR* I bölgesi, pBS-AMV197SURSDR'de pBlueScript SK (-) vektör ve pG-*gfp* için de pGEM-T Easy vektör çoklu klonlama bölgesinde mevcuttur. Bu yüzden, primerlerde kesme bölgeleri bulunan enzimler kullanılarak değil, *EcoR* I enzimi kullanılarak kesim yapıldı ve kesilen DNA fragmanları, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü. Gereken bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) ve kitin içindeki



uygulama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Temizlenen DNA'lar %1,2'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, daha önce jelden temizlenen DNA fragmentleri, 3 DNA parçası : 1 vektör oranında (0,3 µg *gfp* ve 0,1 µg pBS-AMV197SURSDR) klonlandı. Ligasyon reaksiyonu,

2 µl pBS-AMV197SURSDR,

10 µl 2x ligasyon tamponu,

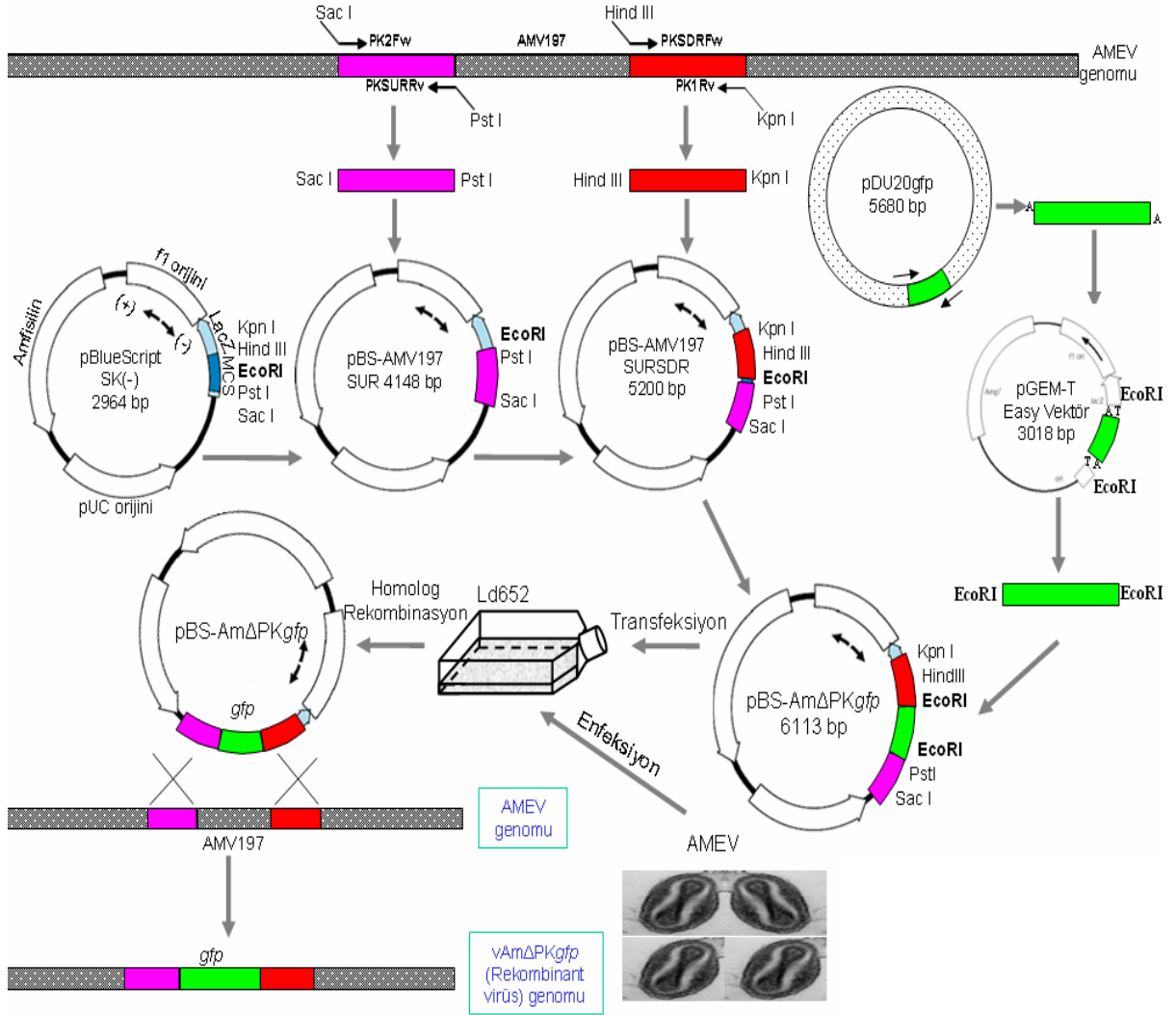
1 µl T4 DNA ligaz (Promega) ve

7 µl DNA (*gfp*) fragmenti bir araya getirilerek 20 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ligasyonu yapılan DNA'nın, önceden hazırlanan elektrokompotent *E. coli* DH10β suşuna, elektrotransfeksiyonu sağlandı. pBlueScript SK(-) vektörden pBS-AMV197 SURSDR'nin oluşturulmasından sonra, bu ticari vektördeki doğal *LacZ* geni parçalandığı için, *gfp*'nin pBS-AMV197SURSDR vektöre transformasyonundan sonra, yine beyaz kolonilerden rasgele ekim yapıldı. Bunlardan, hızlı miniprep yöntemine göre plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidlerin doğrulanması için, *EcoR* I restriksiyon enzimiyle kesim işlemi yapıldı. Kesim sonucu, yaklaşık 900 baz çifti DNA fragmentlerini içeren klonlar, agaroz jelde belirlendi.

Belirlenen klonlardan pBS-AMV197SURSDR*gfp1* kodlu klon ayrıldı, pBS-AmΔPK/*gfp* olarak adlandırıldı ve stoklandı. Böylece protein kinaz geninin askı bölgelerine ve işaret olarak GFP'yi üreten, *gfp* genine sahip rekombinant plazmid oluşturuldu. Plazmidler, *E. coli* DH10β hücrelerinde bol miktarda üretildi ve daha sonra transfeksiyon deneyinde kullanıldı.

### 2.6.3. Rekombinant Virüsün Oluşturulması

Böylece, vektördeki *gfp* geni ile, yaban tip AMEV virüsündeki AMV197 kodlu genin homolog rekombinasyonla silinmesi işlemi gerçekleştirildi. Rekombinant transfer vektörünün oluşturulması ile ilgili tüm klonlama, enfeksiyon, transfeksiyon ve rekombinasyon aşamaları Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6: Rekombinant virüsün oluşturulması

### 2.6.3.1. pBS-AmΔPK/*gfp* ve Yaban Tip AMEV'nin Ld Hücrelerine Transfeksiyonu

pBS-AmΔPK/*gfp* vektörünün transfeksiyonu için, 35 mm'lik (8 cm<sup>2</sup>'lik) kültür kabına  $9,4 \times 10^5$  Ld652 hücresi bırakıldı. Hücrelerin tutunması için, oda sıcaklığında 4-5 saat bekletildi. Daha sonra hücrelerin üzerindeki sıvı alındı ve MOI = 5 olacak şekilde, 600 µl enfeksiyon sıvısı (FBS'siz besiyeri ve 6 µl virüs ( $7,76 \times 10^8$  pfu/ml AMEV virüs)) ilave edildi. Hücreler, enfeksiyon sıvısı ilave edildikten sonra, 2 saat oda sıcaklığında 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, iki ayrı tüpte transfeksiyon karışımı hazırlandı. Tüplerden birinde, 5 µg DNA (pBS-AmΔPK/*gfp*) son hacim 100 µl olacak şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltilti. Diğer tüpe ise 85 µl FBS'siz besiyeri ve 15 µl lipofektin

(Invitrogen, Kat No: 18292-011) bırakıldı. Her iki tüp oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve bekleme süresinin sonunda, tüp içerikleri birbirine karıştırıldı. Bu transfeksiyon karışımı, karıştırıldıktan sonra 20 dakika daha bekletildi. Diğer yandan, hücrelerin üzerinden enfeksiyon sıvısı alındı ve hücreler FBS'siz besiyeriyle yıkandı. Hazırlanan 200 µl'lik transfeksiyon karışımı ve 800 µl FBS'siz besiyeri hücrelerin üzerine bırakıldı. Tekrar 5 saat oda sıcaklığında 2,5 rpm'de sallandı. 5 saatin sonunda eski besiyeri çıkarıldı ve 2 ml FBS'li besiyeri eklenerek 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında, Auxovert floresan inverted mikroskop ile bakılarak hücrelerde yeşil rengin oluşumu, yani sferoidin promotörü sayesinde sentezlenen GFP proteininin ortaya çıkışı beklendi.

Yaklaşık 5 gün sonra, ortamdaki GFP proteinin çokluğuna bakılarak yeterince rekombinant virüs üretildiği tahmin edildi. Hücreler, besiyeriyle toplandı ve 1.000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek rekombinant virüsler hasat edildi.

### 2.6.3.2. Plak Deneyi ile Rekombinant AMEV'nin Seçimi ve Saflaştırılması

Transfeksiyon işleminden sonra elde edilen virüs süspansiyonu, rekombinant virüslerin (*gfp* genini ve protein kinaz geninin askı bölgelerini içerenleri) yanı sıra, yabancı tip AMEV'leri de içermektedir. Karışık süspansiyondan rekombinantları seçmek için, virüs süspansiyonu Ld652 hücrelerine inoküle edildi ve rekombinant virüsler "plak deneyi" ile seçilerek saflaştırıldı (Dulbecco ve Vogt, 1953).

Plak deneyi için, Ld652 hücreleri,  $1,7 \times 10^6$  olacak şekilde son hacim 1,5 ml'ye ayarlanarak, 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücrelerin tabana tutunması için yaklaşık 4-5 saat 28 °C etüvde bekletildi. Daha önce üretilen rekombinant AMEV (*vAmΔPK/gfp*) virüsten, besiyeri kullanarak son hacim 900 µl olacak şekilde seyreltikler ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ) hazırlandı. Her bir seyreltik virüs solüsyonu, farklı bir gözdeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Hücre-virüs karışımı, iki saat 2,5 rpm'de sallanarak, virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. İki saatin sonunda, enfeksiyon sıvısı uzaklaştırıldı ve hücreler, FBS içermeyen besiyeri ile yıkanarak tutunmayan virüslerin deney ortamından uzaklaştırılması sağlandı. Daha önceden, %2,5 olacak şekilde Sea plaque agaroz ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü. Hazırlanan karışım, mikrodalga fırında eritildi, otoklavlandı ve 45 °C'lik su banyosuna bırakıldı. Agarozun uygun sıcaklığa (hücreleri yakmayacak ve dökülmeden önce donmayacak) gelmesinden sonra, 1 hacim agaroz : 1 hacim besiyeri olmak üzere yeni bir karışım hazırlandı. Üzerinden enfeksiyon sıvısı alınan hücrelerin üzeri, 2,5 ml agaroz-

besiyeri karışımıyla kaplandı. Agarozun tamamen donması için, kapağı açık şekilde bekletildi. Agaroz donduktan sonra kapak kapatıldı. Hücre kültür kabı, ddH<sub>2</sub>O ile ıslatılmış peçetelerle birlikte bir kutuya yerleştirildi ve 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Plak oluşumu Auxovert floresan inverted mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Yaklaşık üçüncü günde, ancak floresan mikroskop ile görülebilen GFP içeren plaklar gözlenmeye başladı. Bir hafta sonra, bu yeşil renkli GFP içeren öbeklerden alınan virüsler çoğaltıldı ve bu çoğaltılan virüs süspansiyonu kullanılarak bir sonraki plak işlemi yapıldı. Ardışık şekilde yapılan dört plak işleminden sonra, saf vAmΔPK/*gfp* virüsü elde edildi.

### 2.6.3.3 Rekombinant Virüs Stokunun Hazırlanması

Rekombinant AMEV (vAmΔPK/*gfp*) hazırlandıktan sonra, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere rekombinant virüsün çoğaltılmasına başlandı. Bu çalışma için, üç adet T75 flaske, 9x10<sup>6</sup> olacak şekilde Ld652 hücresi bırakıldı. Hücreler, tabana tutunmaları için, 3-4 saat etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra, her bir flaskedeki hücreler, son hacim 2 ml olacak şekilde 30 µl saf vAmΔPK/*gfp* virüsle enfekte edildi. Hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildiler. Enfeksiyondan 3 gün sonra, hücrelerin içerisinde belirgin granüllerin ve nükleus kararmalarının olduğu gözlendi. Hücrelerin %100 oranında enfekte olduğu gözlenince (8 gün sonra), hücre sıvısı toplandı ve 1.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen rekombinant virüs süspansiyonu, 4 °C'de, karanlık ortamda muhafaza edildi.

vAmΔPK/*gfp*'nin saflaştırılması ve stokunun yapılması çalışmalarından sonra, üretilen virüsün konsantrasyonunun tayini, 60 gözlü hücre kültürü kapları (Corning) kullanılarak, EPDA (End Point Dilution Assay) metoduyla belirlendi (Darling vd., 1998).

EDPA deneyinin sonuçları, her bir gözde GFP proteininin olup olmasına göre her kuyuya + (artı) veya - (eksi) değer verilerek değerlendirildi. Virüs konsantrasyonu, EPDA formülü ve elde edilen değerler kullanılarak hesaplandı.

### 2.6.3.4. AMV197'nin AMEV Genomundan Silindiğinin PCR Analiziyle Doğrulanması

Transfeksiyon ve onu takip eden enfeksiyonlarda her ne kadar GFP proteininin varlığı, AMV197'nin yokluğu olarak değerlendirildiyse de AMV197'nin AMEV

genomundan tamamen silindiğini doğrulamak gerekmektedir. Bunun için, hem yaban tip AMEV'den hem de oluşturulan vAmΔPK/*gfp* virüsünden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar, PCR işlemi için kalıp olarak kullanıldı. Hem AMEV DNA'sında hem de vAmΔPK/*gfp* DNA'sında ortak olan, AMV197'nin yukarı bölgesindeki iki farklı sıraya karşılık gelen, AMV197F ve AMVFw adlı primerler iki ayrı PCR işleminde ileri primer olarak kullanıldı. Geri primer olarak, her iki ileri primer için uygun olan AMV197GFPR primeri kullanıldı. Bu geri primeri, sadece vAmΔPK/*gfp* virüsünde bulunabilecek olan, sferoidin promotörü altındaki *gfp* genini pDU20*gfp* vektöründen çoğaltmak için kullanılan primerdir.

Bu PCR işlemi sonucunda, yaban tip AMEV kalıbıyla yapılan PCR'de, yalnızca ileri primerler için bağlanma sırası mevcut olacağından herhangi bir bant beklenmedi. Oysa, vAmΔPK/*gfp* virüs kalıbıyla yapılan PCR'den, her iki primer çifti için de bağlanma sırası mevcut olacağından, 987 bp'lik (AMVFw) ve 1302 bp'lik (AMV197F) bantlar beklenmektedir. PCR için uygulanan yöntem şöyledir:

<u>PCR Karışımı</u>		<u>PCR Koşulları</u>	
1,5 µl	Kalıp DNA	94 °C'de 3'	
1 µl	İleri Primer (20 mM)		
1 µl	Geri Primer (20 mM)	94 °C'de 1'	} 35 döngü
2 µl	dNTP (5 mM)	48 °C'de 30''	
3 µl	MgCl <sub>2</sub> 50mM	72 °C'de 1'	
5 µl	Tampon 10x		
0,5 µl	DNA polimeraz (Fermentas)	72 °C'de 7'	
36 µl	ddH <sub>2</sub> O	4 °C'de ∞	
AMVFw	5'-GAT ATA ATA TAT AAT AAT TAA TTA AAA TGG-3'		
AMV197F	5'-CGA ATA ATT ATC AGG ATT AAT TG-3'		
AMV197GFPR	5'-G CAT CGA TTA ATT AAA ATT CTC ACT TGT ACA GCT C-3'		

Elde edilen PCR ürünleri, jelden temizlendi ve doğrulama işlemine devam etmek amacıyla, restriksiyon analizine tabi tutuldu. PCR ürünleri, çoğaltıldığı varsayılan sırada

bulunan *Xma* I ve *Nco* I enzimleriyle ayrı ayrı kesilerek, kesim ürünleri %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü.

Restriksiyon analizinden sonra, PCR ürünlerinden 1302 bp olduğu düşünülen bant, jelden temizlendi ve bu DNA'nın, 3 DNA parçası : 1 vektör oranında pGEM-T Easy vektöre ligasyonu sağlandı. Vektör, ligasyon işleminden sonra, *E. coli* JM101 suşuna, soğuk  $\text{CaCl}_2$  transformasyonu ile aktarıldı. Transformasyon sonucu oluşan beyaz kolonilerden ekim yapıldı. Seçim işleminden sonra belirlenen bir klonun, DNA dizi analizi yaptırıldı.

#### **2.6.4. Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/*gfp*) Analizi**

Tezin bu aşamasında protein kinaz geninin virüs replikasyonundaki rolünü anlamak için rekombinant virüsün DNA replikasyonu, protein profili ve toplam virüs üretim potansiyeli belirlendi.

##### **2.6.4.1. Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/*gfp*) DNA Replikasyonunun Belirlenmesi**

Rekombinant virüsün DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyonu yöntemi ile DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Kat No: 11 745 832 910) kullanılarak belirlendi.

Çalışmanın başında, hibridizasyon işlemi sırasında kullanılacak olan prob hazırlandı. Prob olarak kullanılacak DNA sırasının, hem yaban tip AMEV, hem vAm $\Delta$ *shp/gfp* ve hem de vAm $\Delta$ PK/*gfp* ile homoloji sağlaması gerekmektedir. Bunun için, rekombinant transfer vektörü hazırlarken kullanılan pBS-AMV197SDR plazmidinden yararlanıldı. Bu vektör, her üç virüs için de AMV197 açık okuma zincirinin aşağı bölgesine ait, 1051 bp'lik DNA sırası içermektedir ve hibridizasyon çalışmalarında prob olarak kullanılmaya uygundur. Yapılan bu tespitten sonra, pBS-AMV197SDR plazmidi kit yardımıyla izole edildi ve *Hind* III ve *Kpn* I kesme bölgeleri kullanılarak, kesme işlemi sağlandı. Kesilen DNA fragmanları, %1,2'lik agaroz jelde yürütüldü.

Gereken bant, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) ve kitin içindeki kullanma

yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Temizlenen DNA'lar %1,2'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, probun DIG-dUTP (Digoxigenin-dUTP) ile işaretlenmesi işlemine başlandı. Jelden temizlenen DNA'nın denatürasyonu, kaynamakta olan suda 10 dakika bekletilerek sağlandı. Hemen buz üzerine alınarak DNA'nın yeniden birleşmesi engellendi. Soğutulan DNA'ya 1/5 oranında, işaretli dUTP ilave edildi ve karıştırıldı. Bu karışım, işaretleme işleminin tamamlanması için, 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, karışım 65 °C'de 10 dakika bekletildi ve reaksiyon durduruldu. Hazırlanan prob, kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Diğer yandan, Ld652 hücreleri,  $1 \times 10^6$  olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücreler, tutunma işlemi tamamlandıktan sonra, MOI=10 olacak şekilde, yaban tip AMEV, *vAm $\Delta$ shp/gfp* ve *vAm $\Delta$ PK/gfp* ile ayrı ayrı enfekte edildi. Enfekte edilen hücrelerden, 0., 6., 12., 18. ve 24. saatlerde örnekler alındı. Belirlenen sürelerde, hücreler ve hücre sıvısı tamamen alınıp 800xg'de, 10 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan pellet, 800  $\mu$ l, 0,5 M sodyum hidroksit içinde lizis edildi. Lizis işleminden sonra 80  $\mu$ l, 10 M amonyum asetat kullanılarak nötralizasyon sağlandı. Elde edilen lizatlar, bütün örnekler biriktirilinceye kadar 4 °C'de bekletildi. Bütün örnekler toplandıktan sonra, örneklerin nitroselüloz membrana (Hybond-N+ nylon membrane; Amersham-Biosciences, Kat No: RPN303B) geçirilmesi işlemine başlandı.

Her bir virüsten alınan ve 4 °C'de muhafaza edilen hücre lizatından, 100'er  $\mu$ l alınıp yeni bir tüpe bırakıldı. Tüpler, 10 dakika kaynayan suda bırakıldı ve kaynatma işleminden sonra hemen buza alınarak soğutuldu. Diğer yandan, membran uygun ölçülerde kesildi, 6xSSC (saline-sodium citrate) tamponunda 5 dakika yıkandı ve slot-blot aletine yerleştirildi. Kaynatılan örnekler, belli bir düzen içinde kuyucuklara yerleştirildi. Vakum yapılarak, kuyucuklardaki örneklerin membrana geçmesi sağlandı. Blotlama cihazından çıkarılan membran, 2xSSC ile 2 dakika yıkandı ve üç kat kurutma kağıdının arasında, oda ısısında 30 dakika kuruması için bırakıldı. Kurutma işleminden sonra, membran 80 °C'de 2 saat bekletilerek örneklerin iyice membrana tutunması sağlandı.

Probun hazırlanması ve örneklerin membrana emdirilmesi tamamlandıktan sonra, ön hibridizasyon işlemine başlandı. Önceden hazırlanan 15 ml'lik hibridizasyon tamponu, -20 °C'den çıkarılıp eritildi, kaynayan su içinde 10 dakika kaynatıldı ve hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Örneklerin emdirildiği membran, hibridizasyon şişesine alındı. Soğutulan hibridizasyon tamponu, şişedeki membranın üzerine boşaltıldı. Hibridizasyon

fırına yerleştirilen şişe, 42 °C’de, 16 saat, döner durumda bırakılarak ön hibridizasyon sağlandı.

Ön hibridizasyon süresinin sonunda, yeni bir hibridizasyon tamponu daha -20 °C’den alındı, eritildi. Eritilen tamponun içine, daha önceden hazırlanan işaretli probdan 5 µl eklendi ve karıştırıldı. Probu eklendiği tampon, kaynayan su içinde 10 dakika kaynatıldı ve tampon-prob karışımı hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Diğer yandan, hibridizasyon şişesinden ön hibridizasyon sıvısı boşaltıldı. Yerine, işaretli proba beraber hazırlanan hibridizasyon tamponu eklendi ve şişe yine 42 °C’de, 16 saat, döner durumda bırakılarak probun membrandaki örneklerle hibridizasyonu sağlandı.

İşaretli prob ile viral örneklerin hibridizasyonu tamamlandıktan sonra, bağlanan probun görünür hale getirilmesi işlemine başlandı. Hibridizasyon şişesinden alınan membran, yıkandı ve bağlanmayan proplar uzaklaştırıldı. Yıkanan membran, bloklama solüsyonundan geçirilerek, kullanılacak antikora özgü olmayan membrandaki bağlanma bölgeleri kapatıldı ve membran, bu kez antikor solüsyonuna (Anti-Digoxigenin-AP) bırakıldı. DIG ile antikorların bağlanması sağlandıktan sonra, membran yeniden yıkama işlemine tabi tutuldu ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Membran, tespit tamponunda yıkama işleminden sonra, renk tamponunda renk oluşumu gözleninceye kadar karanlıkta bırakıldı. Renk oluşumu tamamlandıktan sonra, membran tarandı ve kaydedildi.

#### **2.6.4.2. Rekombinant Virüsün (vAmΔPK/gfp) Protein Profilinin Belirlenmesi**

Rekombinant vAmΔPK/gfp’nin protein profilinin belirlenmesinin amacı, DNA sırasına göre 35,5 kDa olması gerektiği anlaşılan AMV197 kodlu genin protein ürününün, rekombinant virüsteki eksikliğini belirlemek ve AMV197 geninin silinmesinden kaynaklanacak diğer genlere ait protein bantlarının eksiklerini veya fazlalıklarını, yaban tip ve vAmΔshp/gfp virüsleri ile karşılaştırmaktır.

Yapılan çalışmada, yine yaban tip AMEV ve vAmΔshp/gfp virüsleri kontrol olarak kullanıldı. Çalışmanın başında, Ld652 hücre kültürü, her üç tip virüs için de MOI=5 olacak şekilde enfekte edildi. Bir haftalık inkübasyon sonucu elde edilen virüs süspansiyonu, 0,45 µm çapında gözenekleri bulunan filtrelerden geçirildi. Böylece, hücre parçaları ve bunlardan kaynaklanan proteinlerin çoğunluğu ortamdaki uzaklaştırıldı. Yaklaşık 60 ml hacimdeki her bir süzüntü, 18.000 rmp’de, 4 °C’de, 45 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponunda çözülme ve proteinin



konsantrasyonu belirlendi (Bradford, 1976). Her bir örnek, kaynayan suda 3 dakika kaynatıldıktan sonra, hazırlanan %10'luk SDS-PAGE jeline 35 µg olacak şekilde yüklendi. Yürütme işlemi, 30 mA'lik akım altında ve protein marker eşliğinde uygulandı. Yürütülen jel, hem "Coomassie Brilliant Blue" yöntemine (Neuhoff vd, 1985) hem de "gümüş boyama" yöntemine (Morrisey, 1981) göre boyandı.

Yukarıdaki aynı işlem başka bir zamanda, virüs süspansiyonu filtre edilmeden de yapıldı.

Diğer bir işlemde, her üç tip virüs ile yapılan enfeksiyonlardan, 0., 6., 12., 24., 48., ve 72. saatlerde örnekler alındı. Alınan örnekler santrifüjlendi ve pelletler -80 °C'de biriktirildi. Her bir zaman dilimi için örnek alınması tamamlandıktan sonra, hücreler proteaz inhibitörleri içeren tamponda patlatıldı ve hücre ekstraktları, SDS-PAGE'e (Laemmli, 1970) tabi tutuldu.

#### 2.6.4.3. Rekombinant Virüsün (*vAmΔPK/gfp*) Enfektivitesinin Belirlenmesi

Protein kinaz geninin fonksiyonunu belirlemek amacıyla bu genden mahrum rekombinant *vAmΔPK/gfp*'nin enfektivitesi, yaban tip AMEV ve *vAmΔshp/gfp* ile karşılaştırılarak belirlendi. *vAmΔshp/gfp* adlı virüs, *spheroidin* geni yerinde *gfp* geni taşıyan başka bir rekombinant virüsdür. Ancak, sadece dış ortam şartlarında virüs partiküllerini koruyan bu genin eksikliği, virüsün hücre kültüründe büyümesine herhangi bir olumsuz etki oluşturmaz (Palmer vd., 1995). Bu deneyde, hem *vAmΔshp/gfp* hem de *vAmΔPK/gfp* virüsün GFP proteininin üretimi, aynı sferoidin promotörü tarafından sağlandığı için, GFP proteininin belirlenmesi açısından, *vAmΔshp/gfp* virüsü AMEV'nin yanında başka bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Deney sırasında, Ld652 hücreleri, her üç tip virüs ile MOI=1 olacak şekilde, enfekte edildi. Enfeksiyondan sonra, belirtiler gözlenerek 7 gün inkübasyona devam edildi. Her üç tip virüs için, üretilen yeni virüsler alındı ve her birinin konsantrasyonu 96 gözlü hücre kültür kaplarında EPDA deneyi ile belirlendi. Deneyler, dört tekrar olarak yapıldı ve elde edilen ortalama değerler sonuç olarak, tabloya aktarıldı.

### 3. BULGULAR

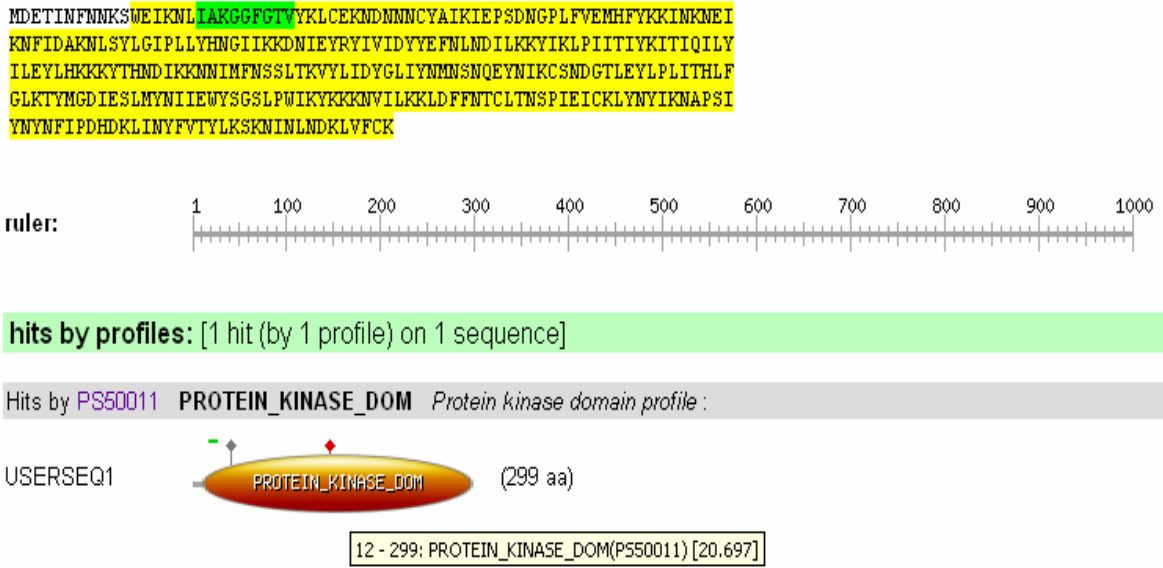
#### 3.1. Virüslerin Üretimi ve Saflaştırılması

Tez çalışması sırasında kullanılacak virüslerin üretimi için, Ld652 hücre kültürü kullanıldı. Yaban tip AMEV ve kontrol olarak kullanılacak *vAmΔshp/gfp* virüslerin Ld652 hücre kültürüne enfeksiyonu yapıldı. Enfekte edilmiş hücreler 28 °C’de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildiler. Enfeksiyondan 3 gün sonra hem AMEV hem de *vAmΔshp/gfp* enfekte olmuş hücrelerin içerisinde, enfeksiyona has belirgin granüllerin ve nükleus kararmalarının oluştuğu gözlemlendi. Hücrelerin %100 oranında enfekte olduğu gözlenince (9 gün sonra), her bir farklı virüsle enfekte edilen hücre sıvısı toplandı ve 2.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen virüs süspansiyonları kullanılarak sağlıklı Ld652 hücreleri, yine her bir virüs için ayrı ayrı tekrar enfekte edildi. Gayet güzel gelişen enfeksiyonların sonucu olarak, deneysel işlemler sırasında kullanılacak virüs stokları üretildi.

AMEV’ye ve *vAmΔshp/gfp*’ye ait virüs stoklarının konsantrasyonları, EPDA metodu ile yapılan hesaplama göre tespit edildi. Seyreltik virüs süspansiyonu kullanarak, 60 gözlü hücre kültür kaplarında yapılan enfeksiyonlardan elde edilen sonuçlar, istatistiksel temele dayanan EPDA formülüne göre hesaplandı. Yapılan hesaplama göre, AMEV ve *vAmΔshp/gfp* konsantrasyonları sırasıyla  $7,76 \times 10^8$  pfu/ml ve  $1,7 \times 10^8$  pfu/ml olarak belirlendi. Virüs stokları, ışık almayacak şekilde 4 °C’de muhafaza edildi.

#### 3.2. AMV197’nin Biyoinformatik Analizi

AMV197’in serin/treonin protein kinaz aktivitesi gösterebileceği daha önceki çalışmalarda *in silico* olarak belirlenmişti (Bawden vd., 2000). Bu tez çalışması kapsamında, mevcut AMV197 aminoasit sırası içinde, protein kinazlara ait katalitik bölge, ATP’nin bağlanma bölgesi ve ATP’nin bağlandığı yerde hayati değeri olan lizin (K) aminoasidi arandı. Bu işlem için, ExPasy-Prosites programı (<http://www.expasy.ch/prosites>) kullanıldı. Analiz sonucunda, AMEV protein kinaz katalitik bölgesinin, aminoasit dizisindeki 12.-299. aminoasitler arasında bulunduğu belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. AMV197 protein kinaz katalitik bölgesi ve ATP bağlanma motifi. 12.-299. aminoasitler arasını gösteren sarı ile işaretli kısım, protein kinazlara ait katalitik bölgeyi göstermektedir. Sarı kısmın içindeki 18.-26. aminoasitler arasını gösteren yeşil sıra ise, ATP bağlanma motifini göstermektedir.

Bu analize göre, protein kinazların yapısında bulunan, ATP bağlanma bölgesini oluşturan IAKGGFGTV motifi ise 18.-26. aminoasitler arasında belirlendi (Şekil 7).

Ayrıca, AMEV'nin protein kinazının (AMV197) aminoasit dizisi, Clustal W programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) kullanılarak, diğer protein kinazlardaki temel protein motifleriyle karşılaştırıldı. Karşılaştırılan bu sıralar, öncelikle çeşitli protein kinazlarda kolaylıkla tanınabilen, korunmuş aminoasitlerden ve bazılarında ise ayrımı oldukça zor olan motiflerden oluşmaktadır (Şekil 8).

Katalitik bölgenin N-ucundaki bölge (subdomain I), glisin bakımından zengin (21GFQTVY26) bir sırayı kapsar. Onun hemen yanındaki, 39.-42. aminoasitler arasını kapsayan bölgede (subdomain II), lizin aminoasidi (42K) vardır. I. bölgeden II. bölgeye kadar olan kısmın, ATP'nin bağlanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Hanks ve Hunter, 1995). Bu ATP bağlanma bölgesi, Prosite veri bankasında bir protein kinaz motifi olarak Şekil 8'de gösterilen iki bölgeden sadece biridir (Şekil 7). Bu bölgedeki sıra (21.-42. aminoasitler), protein kinaz I. korunmuş bölge motifine uyumludur: [LIV]-G-{P}-G-{P}-[FYWMGSTNH]-[SGA]-{PW}-[LIVCAT]-{PD}-x-[GSTACLIVMFY]-x-(5,18)-[LIVMFYWCSTAR]-[AIVP]-[LIVMFAGCKR]-K. Burada, lizin (42K) ATP'nin bağlandığı aminoasidi göstermektedir (kare parantez, verilen pozisyon için kabul edilebilir aminoasitleri, dalgalı parantez ise, verilen pozisyon için kabul edilmeyecek aminoasitleri

göstermektedir). 54E ve 98YIV100 sırası, sırasıyla III. ve IV. bölgeler (subdomain III ve subdomain IV) ile homoloji göstermektedir. V. bölge (subdomain V) ise, ayırt edilecek kadar net değildir.

AMEV-PK	-----MDETI--NFNKN-SWEIK-----NLIAGGFGTVYKLCEKNDNN	36
VACV-B1-RPK	-----MNFQGLVL--TDNCKNQWVVG-----PLIGKGGFGSIYTTNDNN---	37
MSEV-PK	-----MIL--KSVRGNIWQVS-----ECLVNEYIINIHLLENDN--	33
PIM-1	RARPCNDLHATK LAPKE--KEPLESQYQVG-----PLLGSGGFGSVYSGIRVADN-	61
MOS	APRKAGKFLFGTTPRAP--GLPRRLAWFSIDWEQVCLMHRGLSGGFGSVYKATYHGVPE-	117
CDC28	-----MSGELANYKRLEK-----VGEPTYGVVYKALDLRPG-	31
	I	
AMEV-PK	NCYAIKIEPSDNGPLFV-EMHFYKKINK-NEIKNFIDAKNLSYLGIPLLYH-NGIICKDN	93
VACV-B1-RPK	--YVVKIEPKANGSLFT-EQAFYTRVLKPSVIEEWKSHNIKHVGLITCKA-FGLYKSIN	93
MSEV-PK	--KIIKIASIEDGPLFC-EINFYIRYCK-----EEMVKDVNLI LPYVD-SGIDKYK-	79
PIM-1	LPVAIKHVEKDRI SDWG-ELPNGTRVPMEEVLLKKVSSDFSGVIRLLDWFE-RPDSFVLI	119
MOS	--VAIKQVNKCTEDLRASQRSFWAELNIAGLRHDNIVRVVAASTRTPEDSNLGTI IMEF	175
CDC28	--QGRVVALKKIRLESEDEGVPSTAIRESILLKELKDDNIVRLYDIVHSD-AHKLYLVF	88
	II II	
AMEV-PK	IEYRYIVIDYEFNLDILKK-YIKLPIITTYKITIQIILYILEYLHKKKYTHNDIKKNNI	152
VACV-B1-RPK	VEYRFLVINRLGADLDAVIRANNRLPKRSVMLIGIEILNTIQFMHEQGYSHGDIKASNI	153
MSEV-PK	-KLRFLVL PKLDYNLQISIN-----NIYNLSKDIIFALKYIHSKEYIHSDIKDENI	130
PIM-1	LERPEPVQDLDFITER GALQ-----EDLARGFFWQVLEAVRHCHNCVGLHRDIKDENI	173
MOS	GGNVTLHQVIYDATRSEPELSCRKQLSLGKCLKYSLDVVNGLLFLHSQSILHLDLKPANI	235
CDC28	EFLDLDLKRYMEGIPKQPLG-----ADIVKFFMMQLCKGIAYCHSHRI LHRDLKPQNL	142
	IV VI	
AMEV-PK	MENSS-LTKVYLIDYGLIYMNNSNQEYN--IKCSN---DGTLEYLP-LITHLFGLKTYMG	205
VACV-B1-RPK	VLDQIDKNKLYLDYGLVSKFMSNGEHVPFIRPNKMDNGTLEFTP-IDSHKGYVVSRRG	212
MSEV-PK	LYDKN--NNKFYLTDFGNITKHTK-----FITNCKLVNNGTYKYIG-IDMHNG-ISTYKS	182
PIM-1	LIDL S-RGEIKLIDFGSGALLKDT-----VYTFDGT RVYSPPEWIRYHRYHGRSA	223
MOS	LISEQ--DVCKISDFGCSQKLDLRGRQ----ASPPHIGGTYTHQA-PEILKGEIATPKA	288
CDC28	LINKD--GNLKL GDFGLARAFVGP-----LRAYTHEIVTLWYRAPEVLLGGKQYSTGV	193
	VII VIII	
AMEV-PK	DIESLMYNIIEWYSGSLPWIKYKKKNVILKKLDFNTCLTNSPIEICKLYNIKNAPSIY	265
VACV-B1-RPK	DLET LGYCMIRWLGGLPWT KISETKNCALVSATKQYVNNATLMTSLQYAPRELLQY	272
MSEV-PK	DLESFGYLLYDILYG-LPWNKLKDI INIKKDFIDNVII CN-NKLSKYFLYLS-----	234
PIM-1	AVWSLGILLYDMVCGDIPFEHDEEIKGQVFFRQTVSSECQHLIKWCLSLRPSDRPSFEE	283
MOS	DIYSFGITLWQMTTREV PYSGEPQYVQYAVVAYNL RPSLAGAVFTASLTGKALQN-IIQS	347
CDC28	DTWSIGCIFAEMCNRKPI FSGDSEIDQIFKIFRVLGTPNEAIWPDI VYLPDFKPSFPQWR	253
	IX	
AMEV-PK	NYNFIPDHDKLINYFVTYLKS KNINLNDKLVFCK-----	299
VACV-B1-RPK	----ITMVNSLTYFEEPNYDEF RHILMQGVYY-----	300
MSEV-PK	----LIENDKNIEY-VTLLKTLE-----	252
PIM-1	IRNHPWMQGDLLPQAASEIHLHSLSPGSSK-----	313
MOS	CWEARGLQRPSAELLQORDLKAFRGTLG-----	374
CDC28	RKDL SQVVPSLDPRGIDLLDKLLAYDFINRISARRAAIHPYFQES	298

Şekil 8. AMV197'nin, diğer protein kinazlarla karşılaştırılması. Korunmuş katalitik bölgeler, roma rakamıyla ve gölgelenmiş olarak gösterilmiştir. AMEV-PK, AMEV protein kinazı (AAG02903); VACV-B1-RPK, vaksinya virüs protein kinazı (YP233065); MSEV-PK *Melanoplus sanguinipes* entomopoksvirüs protein kinazı (AF063866); PIM-1, fare protein kinazı (AAA39930); MOS, fareye ait serin/treonin protein kinaz dönüştürücü protein (P00538) ve CDC28, *Saccharomyces cerevisiae* hücre bölünmesi kontrol proteini 28 (P00546) için kullanılan kodlardır.

VI. bölge (subdomain VI), protein kinazlar arasında çok iyi derecede korunmuştur. AMV197'deki 142YTHNDIKKNNIMF154, protein kinaz korunmuş bölge motifine çok iyi bir şekilde uyumlu ikinci sıradır: [LIVMFYC]-x-[HY]-x-D-[LIVMFY]-K-x-(2)-N-[LIVMFYCT] (3). Buradaki aspartik asit (146D), muhtemelen enzimin katalitik aktivitesi için önemli aminoasittir (Kinghton vd., 1991; Liu vd., 2001). Serin/treonin protein kinaza özel lizin (K), 148. pozisyondaki aminoasittir. VII. bölge (subdomain VII), çok iyi derecede korunmuş 163LIDYG167 sırasından oluşur.

VIII. bölge (subdomain VIII), çoğu protein kinazda çok iyi derecede korunmuş olan A-P-E motifidir. Bu bölgenin, katalitik bölgeye kadar uzadığı ve genel otofosforilasyon bölgesine komşu olduğu düşünülmektedir (Hunter, 1987; Selten vd., 1986). AMEV protein kinazda, bu sıra ile tamamen aynı olan bir sıra bulunamadı. Onun yerine, uygun bölgede diğer bir T-L-E sırası bulundu ve vaksinya virüs 34 kDa protein kinaz VIII. bölgesi ile uyum içindeki VIII. bölge olabileceği düşünüldü (Traktman vd., 1989). Bu çalışmada, APE motifinin TLE motifine değişme ihtimali, yayınlanmış protein kinaz motifleri içinde, bazı heterojenliklerin görülmesiyle açıklandı ve son glutamik asidin (E) tek değişmez aminoasit olduğu gösterildi (Selten vd., 1986). Alaninin, diğer nötral aminoasitlerle (Glisin, Lösin ve Prolin) yer değiştirdiği gözlemlendi. Alaninin (nötral), lösinin ve izolösinin (polar olmayan), merkez prolinin yerini aldığı tespit edildi. IX. bölgenin (subdomain IX), 206DIESLM211 sırası olabileceği düşünülmektedir ancak, 212YNIIEWYSG220 sırasında da olabileceği sanılmaktadır. X. ve XI. Bölgeler (subdomain X ve subdomain XI) AMEV protein kinazda tam olarak tanımlanamamıştır. Fakat, X. bölgenin, 221. ve 225. aminoasitlerin arasında olması muhtemeldir.

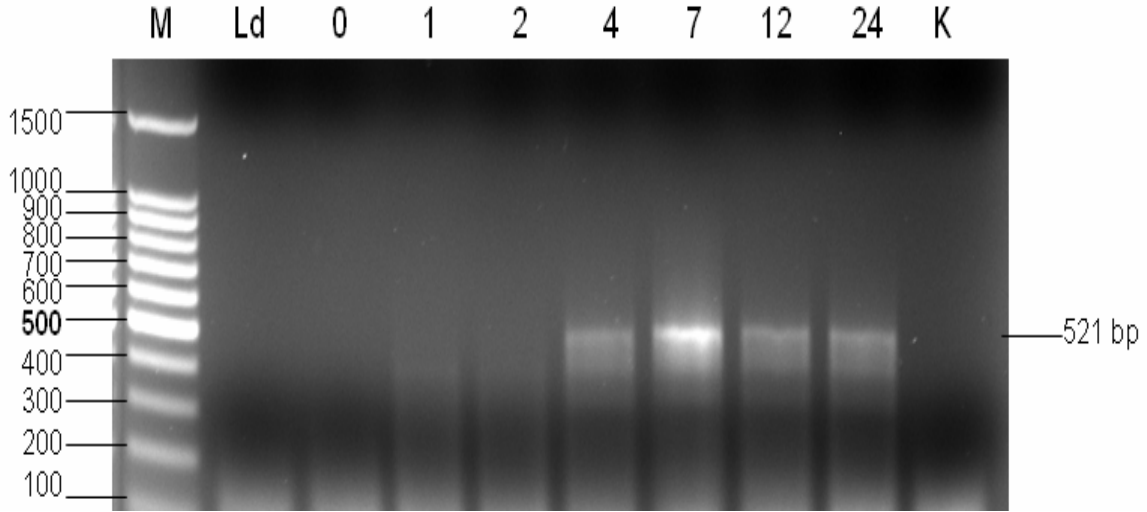
### **3.3. AMV197'nin Transkriptomik Analizi**

#### **3.3.1. Transkripsiyon Kinetiğinin ve Sınıfının Analizi**

AMEV'nin Ld652 hücrelerindeki replikasyonunu transkripsiyonel olarak belirlemek, protein kinaz geninin transkripsiyon saatini ve hangi gen ekspresyon sınıfına ait olduğunu tespit etmek amacıyla RT-PCR deneyi yapıldı.

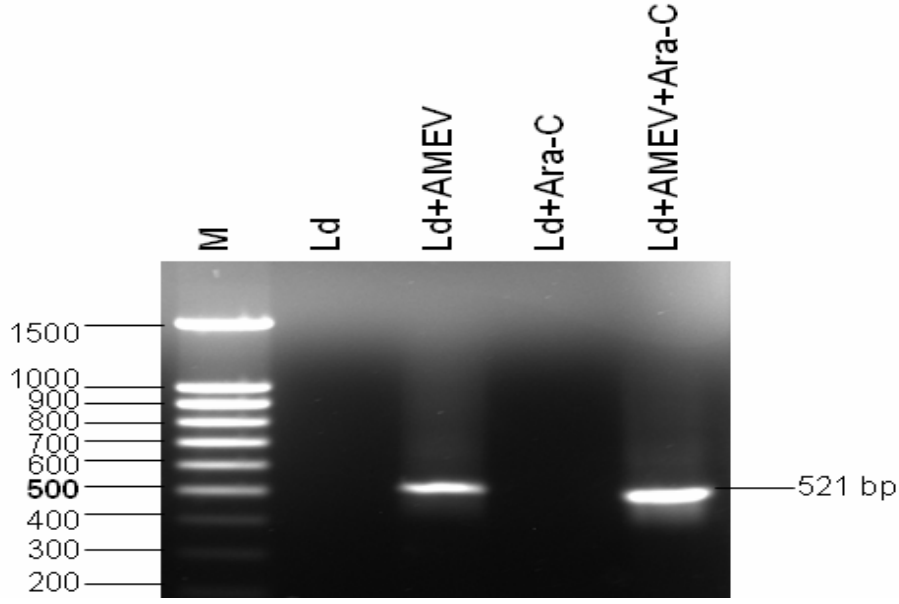
Transkripsiyon süresini belirlemek için virüs enfeksiyonundan sonra farklı zaman dilimlerinde mRNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen mRNA örnekleri ile gene ait özel primerler (PKR ve PKSP4) kullanılarak RT-PCR deneyi oluşturuldu. Bu deneyden elde

edilen verilere göre, AMV197 kodlu genin transkripsiyonu, AMEV'nin Ld652 hücre kültüründe enfeksiyonunu takip eden 2. ve 4. saatler arasında başladı. Enfeksiyondan sonraki 7. saatte, transkripsiyonun yoğunlaştığı ve daha sonra azalarak devam ettiği belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. AMV197 kodlu ORF'nin transkripsiyon kinetiği. M; marker (100 bp, Promega). AMEV ile enfekte olmuş Ld652 hücrelerinden, enfeksiyondan sonra farklı zamanlarda (0-24 saat enfeksiyon sonrası) izole edilen mRNA'lardan yapılan RT-PCR ürünleri gösterilmektedir.

Virüs genlerinin ifade edildiği gen ekspresyon sınıfını belirlemek için, DNA sentez inhibitörünün kullanımı, yaygın bir yöntemdir. Bu işlem için, AMEV'nin Ld652 hücre kültüründe enfeksiyonu sırasında DNA sentez inhibitörü  $\beta$ -D-Arabino furanozilsitozin (Ara-C) kullanıldı. Negatif kontrol olarak, Ara-C'nin kullanılmadığı enfeksiyonlar yapıldı. İnhibitörün besiyerinde mevcut olduğu ve olmadığı ortamlarda, virüs enfeksiyonundan sonra izole edilen mRNA'lar ve gene ait özel primerler (PKR ve PKSP4) kullanılarak RT-PCR deneyi yapıldı. Yapılan çalışmanın sonucu, AMV197 kodlu genin, hem DNA sentez inhibitörü Ara-C varlığında hem de yokluğunda sentezlendiğini gösterdi (Şekil 10).



Şekil 10. AMV197 kodlu ORF'nin transkripsiyon sınıfı. M; marker (100 bp, Promega). İnhibitörle muamele edilmiş, AMEV ile enfekte olmuş, Ld652 hücrelerinden enfeksiyondan sonra izole edilen mRNA'lardan yapılan RT-PCR ürünleri gösterilmektedir.

### 3.4. Protein Kinaz Geninin Transkriptomik Yapısının Aydınlatılması

#### 3.4.1. Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 5' Ucunun Rasgele Çoğaltılması (5' RACE)

AMV197 kodlu genin, proteine dönüşmeyen 5' bölgesini tespit edilebilmek için, transkripsiyon ürünleri kullanılmaktadır. Bunun için, yaban tip AMEV ile enfekte edilen Ld652 hücre kültüründen toplam RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar, 5'/3' RACE kitinde anlatıldığı gibi PKSP1 primeri kullanılarak, cDNA'ya dönüştürüldü. Daha sonraki PCR işleminde kolaylık sağlaması bakımından, cDNA'nın 3' ucuna poli-A kuyruğu takıldı. Oluşturulan poli-A kuyruklu cDNA kalıp olmak üzere, oligo dT-ankor / PKSP2 primer çifti kullanılarak PCR yapıldı. Bu ilk reaksiyonun ürünü DNA kalıp olmak üzere, PCR-ankor / PKSP3 primer çiftiyle ikinci bir PCR daha yapıldı. İkinci PCR reaksiyonunun ürünü olan DNA'lar, pGEM-T Easy vektöre klonlandı. Oluşturulan klonlardan rasgele olarak seçilen 11 klonun DNA dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonuçlarına göre, 11 klondan 9 tanesi AMEV genomunun 169192. sırasındaki Adenin bazında sonlanmaktadır. Buna göre, AMV197 geninin transkripsiyon başlangıç noktasının (5' UTR), ATG'den 54 baz yukarda olduğu belirlendi (Şekil 11).

```

pk2_7          -----GACTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTAAATAATAAT
genom          TCATTTATTATTATATAATAATATATAAATTGAAAAATTATTAAAAATAATTAAATAATAAT
                *   **   *** **   *   *****

pk2_7          TAAAAATAATATATATTTTGATATAATATATAATAATTAATTAATAATGGACGAAACAATA
genom          TAAAAATAATATATATTTTGATATAATATATAATAATTAATTAATAATGGACGAAACAATA
                *****

pk2_7          AATTTTAATAATAAATCATGGGAAATAAAAAATTAATAGCTAAAAGGTGGTTTTGGAACA
genom          AATTTTAATAATAAATCATGGGAAATAAAAAATTAATAGCTAAAAGGTGGTTTTGGAACA
                *****

pk2_7          GTATATAAATTATGCGAAAAAATGATAATAATAACTGTTACGCTATTAATAATAGAACCA
genom          GTATATAAATTATGCGAAAAAATGATAATAATAACTGTTACGCTATTAATAATAGAACCA
                *****

pk2_7          TCGGATAATGGTCCGTTGTTTGTAGAAATGC-----
genom          TCGGATAATGGTCCGTTGTTTGTAGAAATGCACCTTTATAAAAAAATAAATAAAAAATGAA
                *****

```

Şekil 11. Transkripsiyon başlangıç noktasının, AMEV genomu üzerindeki yeri. Kesiksiz çizgi: Translasyonun başlangıcını (ATG); Kesikli çizgi: PCR-ankor primerin ucundaki oligo dT-ankor primerini; Uzun çizgi-nokta: PKSP3 primerini; \*: Doğru baz eşleşmelerini göstermektedir.

### 3.4.2. Protein Kinaz Geninin Translasyona Uğramayan 3' Bölgesinin ve Transkripsiyon Bitiş Noktasının Tespit Edilmesi (3' RACE)

AMV197 kodlu genin, proteine dönüşmeyen 3' bölgesinin tespit edilebilmesi için de 5'/3' RACE kiti kullanıldı. Bunun için, yaban tip AMEV ile enfekte olan Ld652 hücre kültüründen izole edilen toplam RNA'lar, 5'/3' RACE kitinde anlatıldığı gibi cDNA'ya dönüştürüldü. Oligo dT-ankor primeri kullanılarak yapılan cDNA'lardan, PCR-ankor / PKSP4 primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucunda, sağlıklı bir DNA bandı elde edilemedi. Bu yüzden, kit içeriğindeki yöntemden farklı olarak, ilk PCR reaksiyonunun ürünü DNA kalıbı olmak üzere, PCR ankor / PKSP5 primer çifti kullanılarak ilave bir PCR işlemi daha yapıldı. İlk ürüne göre daha kısa olmakla beraber daha seçici özelliğe sahip ikinci PCR reaksiyonunun ürünü DNA, pGEM-T Easy vektöre klonlandı. Oluşturulan 3' UTR klonlarından 13 tanesi seçildi. Bu klonların DNA dizi analizleri yaptırıldı. Dizi analizi yapılan 13 klondan 8 tanesinin TAA'dan 21 baz aşağıda, 5 tanesinin ise 31 baz aşağıda Timin bazında sonlandıkları belirlendi (Şekil 12). Bu sonuçlara göre, AMV197 geninin, iki tane poliadenilasyon kesim noktasına sahip olduğu ve bu noktaların, AMEV genomunun 170166. ve 170176. Timin bazlarında olduğu belirlendi.



```

3UTR5          -----CAACACTTGGTTTAACTAATTCACCAATTGAAATA
genom          GTTATATTAATAAATTAGATTTTTTCAACACTTGGTTTAACTAATTCACCAATTGAAATA
                *****

3UTR5          TGTAAATTATATAATTATATAAAAAATGCTCCTTCTATATATAATTATAATTTTATACCT
genom          TGTAAATTATATAATTATATAAAAAATGCTCCTTCTATATATAATTATAATTTTATACCT
                *****

3UTR5          GATCATGATAAAATTAATTAATTATTTTGTAACTTATTTAAAAATCTAAAAATATAAAATTA
genom          GATCATGATAAAATTAATTAATTATTTTGTAACTTATTTAAAAATCTAAAAATATAAAATTA
                *****

3UTR5          AATGATAAAATTAGTTTTTTGTAAATAAAATTAATATTTTAAATATGTAAAAAA-----
genom          AATGATAAAATTAGTTTTTTGTAAATAAAATTAATATTTTAAATATGTATAAAATATCTAT
                *****

3UTR6          ----CAACACTTGGTTTAACTAATTCACCAATTGAAATATGTAATTATATAATTATATAA
genom          TTTTCAACACTTGGTTTAACTAATTCACCAATTGAAATATGTAATTATATAATTATATAA
                *****

3UTR6          AAAATGCTCCTTCTATATATAATTATAATTTTATACCTGATCATGATAAAATTAATTAATT
genom          AAAATGCTCCTTCTATATATAATTATAATTTTATACCTGATCATGATAAAATTAATTAATT
                *****

3UTR6          ATTTTGTAACTTATTTAAAAATCTAAAAATATAAAATTTAAATGATAAATTAGTTTTTTGTA
genom          ATTTTGTAACTTATTTAAAAATCTAAAAATATAAAATTTAAATGATAAATTAGTTTTTTGTA
                *****

3UTR6          AATAAAATTAATATTTTAAATATGTATAAAATATCTAAAAAAGTTCGACAT
genom          AATAAAATTAATATTTTAAATATGTATAAAATATCTATACTTTATAATAATA-TCATTAT
                *****

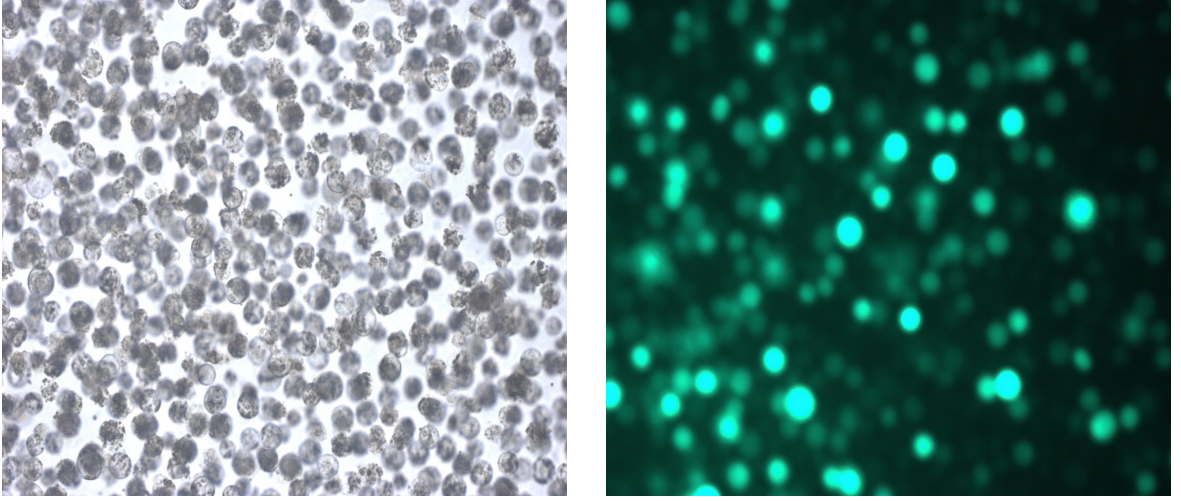
```

Şekil 12. Transkripsiyon bitiş noktalarının AMEV genomu üzerindeki yerleri. Üstte, 21 baz uzunluktaki 3'UTR, altta 31 baz uzunluktaki 3'UTR gösterilmiştir. Kesiksiz çizgi: Translasyonun bitişini (TAA); Kesikli çizgi: PCR-ankor primerin ucundaki oligo dT-ankor primerine komplementer sırayı; Uzun çizgi-nokta: PKSP5 primerini; \*: Doğru baz eşleşmelerini göstermektedir.

### 3.5. Protein Kinaz Geni (AMV197) Çıkarılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması

Tez çalışması boyunca, AMV197 kodlu genin fiziksel yapısı aydınlatıldı. Bu aşamadan sonra, genin fonksiyonel işlevini tespit edebilmek amacıyla, homolog rekombinasyonla genin virüs genomundan silinmesi sağlandı. Yaban tip virüs genomu kalıp olmak üzere, uygun primerler (PK2Fw, PKSURRv, PKSDRFw, PK1Rv) kullanılarak AMV197 kodlu genin yukarı ve aşağı kısımları çoğaltıldı. Çoğaltılan sıralar, pBlueScript SK(-) vektöre klonlandı. AMV197'nin askı bölgelerinin vektöre klonlanması tamamlandıktan sonra, sferoidin promotörü altında 28 kDa'luk GFP proteini üreten genin sırası, AMV197GFPF ve AMV197GFPR adlı primerler kullanılarak çoğaltıldı ve bu iki askı bölgesinin arasına klonlandı. Hazırlanan transfer vektörünün (pBS-AmΔPK/*gfp*),

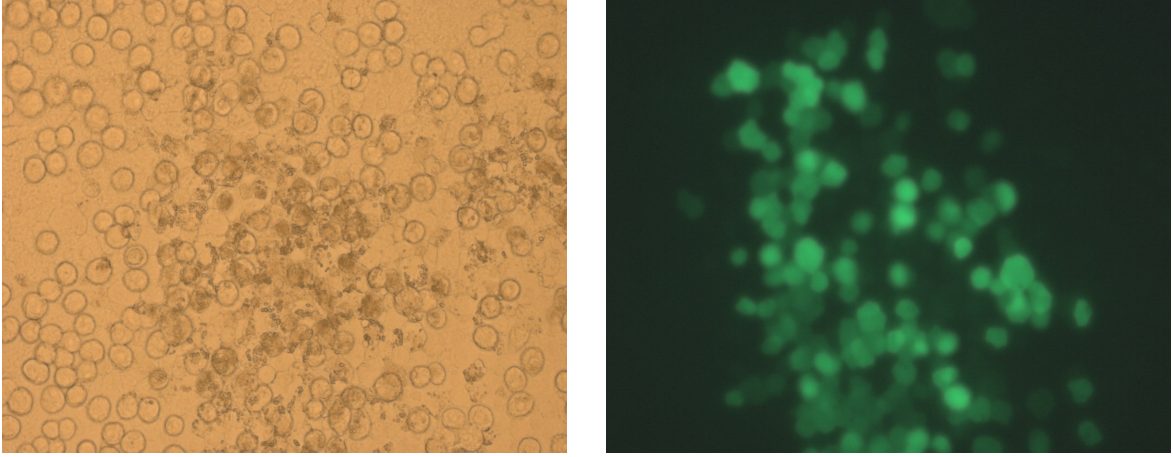
AMEV ile enfekte Ld652 hücrelerine transfeksiyonundan sonra, hücrelerde GFP proteininin ortaya çıkışı, Auxovert floresan inverted mikroskopta yeşil rengin oluşumuyla belirlendi (Şekil 13). Yeşil rengin görünmesi, *gfp* geninin AMEV'nin genomuna dahil olduğunu ve GFP proteininin oluşturulan rekombinant virüs (*vAmΔPK/gfp*) tarafından üretildiğini göstermektedir. Elde edilen transfeksiyon sıvısı çoğaltıldı ve 4 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 13. *pBS-AmΔPK/gfp* ile transfeksiyondan sonra Ld652 hücreleri. Halojen lamba altında görünümü solda ve floresan lamba altında GFP ifadesinin belirlenmesi sağda yer almıştır.

### 3.5.1. Rekombinant Virüsün Saflaştırılması ve Stokunun Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Transfeksiyon işleminden sonra, bu sıvı çoğaltıldı. Diğer yandan, oluşturulan ve çoğaltılan *vAmΔPK/gfp* virüsleri içeren süspansiyon, plak işlemine tabi tutuldu. Elde edilen plakların arasında, en güzel virüs üremesinin olduğu plaktan yeniden virüs çoğaltımı yapıldı ve arka arkaya yapılan plak deneyleri sayesinde, virüs süspansiyonu yalnızca *vAmΔPK/gfp* virüslerden oluşacak şekilde saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için yapılan plak deneyinin sonucunda, plak oluşumu Auxovert floresan inverted mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Yaklaşık üçüncü günde, ancak floresan mikroskop ile görülebilen GFP içeren plaklar gözlenmeye başladı (Şekil 14). Bu plaklardan alınan örneklerle yapılan ardışık dört plak işlemi sayesinde, *vAmΔPK/gfp* virüsler saflaştırıldı.



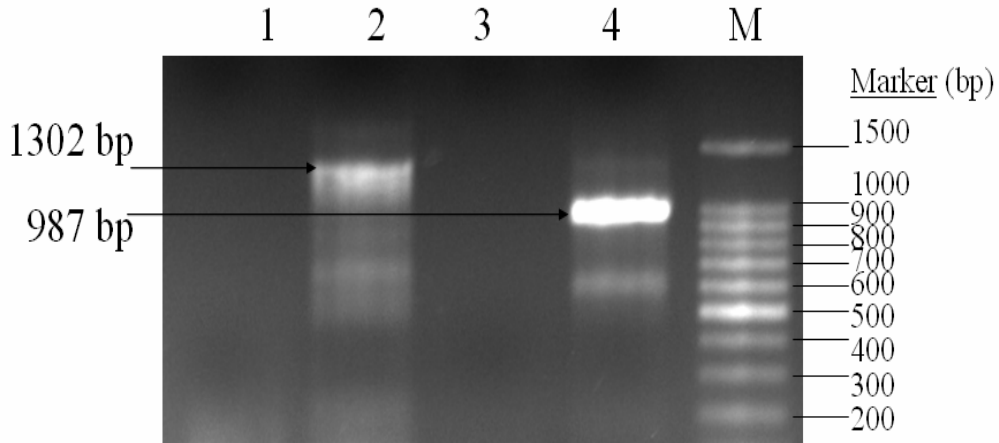
Şekil 14. Ld652 hücrelerinin *vAmΔPK/gfp* ile enfeksiyonu sonrasında oluşan plaklar. Halojen lamba altında görüntü solda ve aynı plağın floresan lamba altında GFP ifadesinin belirlenmesi sağda yer almıştır.

Saflaştırılan *vAmΔPK/gfp* virüslerin konsantrasyonu Terasaki hücre kültür kapları kullanılarak EPDA metoduna ve formülüne göre belirlendi. Formüle bağlı olarak elde edilen sonuca göre, *vAmΔPK/gfp*'nin stok konsantrasyonu  $1,166 \times 10^8$  pfu/ml'dir. Konsantrasyonu belirlenmiş virüs süspansiyonu, çalışmanın ilerleyen basamaklarında kullanıldı.

### 3.5.2. AMV197'nin AMEV Genomundan Silindiğinin PCR Analiziyle Doğrulanması

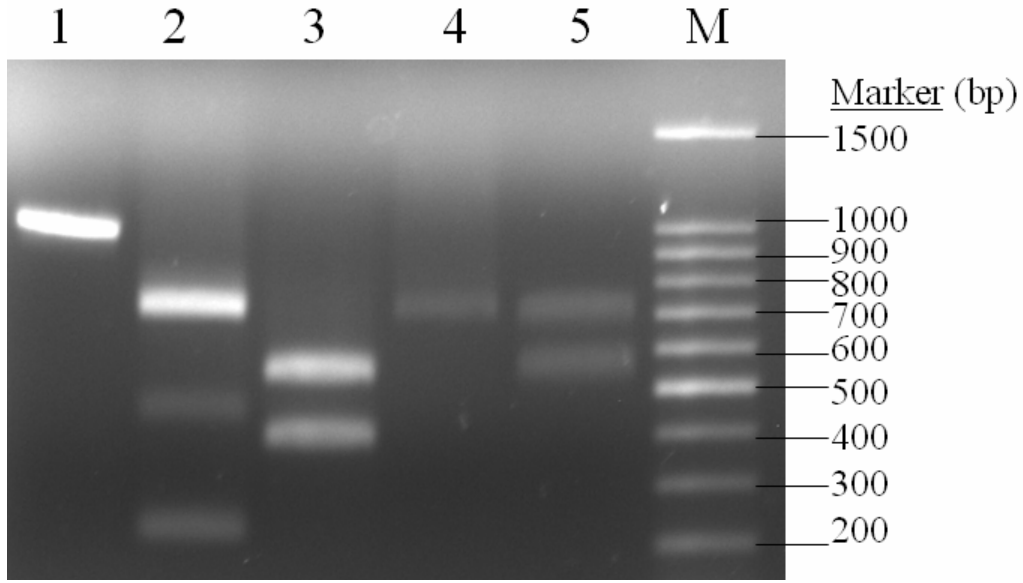
Rekombinant *vAmΔPK/gfp* virüsün inşasından sonra, homolog rekombinasyon sayesinde genomdaki delesyonun istenen sırada meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için, hem yaban tip AMEV'den hem de *vAmΔPK/gfp*'den genomik DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılmak üzere, iki farklı PCR reaksiyonu uygulandı. Reaksiyonlar sırasında kullanılan ileri primerlerden biri, transfer vektörün hazırlanması sırasında da ileri primer olarak kullanılan AMV197F adlı primer, diğeri ise genin yukarısına, ama AMV197F'ye göre daha yakına, yerleşen AMVFW adlı primerdir. Geri primeri olarak, her iki PCR reaksiyonunda da AMV197GFPR adlı primer kullanıldı. Bu primer, *gfp* genini çoğaltmak için kullanılan primerdir. Yapılan PCR reaksiyonlarının sonucunda, yaban tip AMEV kalıbıyla yapılan PCR işleminde, yalnızca ileri primerler için bağlanma sırası mevcut olduğundan, herhangi bir bant oluşmadı. Oysa, *vAmΔPK/gfp* virüs kalıbıyla yapılan PCR reaksiyonunda, her iki primer çifti için de

bağlanma sırası mevcut olacağından, 987 bp'lik (AMVFw / AMV197GFPR) ve 1302 bp'lik (AMV197F / AMV197GFPR) bantlar gözlemlendi (Şekil 15). Bu DNA ürünlerinin elde edilmesi, homolog rekombinasyonun virüs genomunda, doğru sırada meydana geldiğini gösterdi.



Şekil 15. Rekombinant virüs oluşumunun PCR yöntemiyle teyit edilmesi. 1: AMEV kalıbı ve AMV197F / AMV197GFPR primerleri; 2: vAmΔPK/*gfp* kalıbı ve AMV197F / AMV197GFPR primerleri; 3: AMEV kalıbı ve AMVFw / AMV197GFPR primerleri; 4: vAmΔPK/*gfp* kalıbı ve AMVFw / AMV197GFPR primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonlarını ve M, 100 bp'lik marker (Promega) bantlarını göstermektedir.

PCR reaksiyonları sonucunda, rekombinant vAmΔPK/*gfp*'ye ait DNA'dan beklenen bantların elde edildiği, bu DNA'ların restriksiyon analizinin yapılmasıyla da teyit edildi. Bunun için, rekombinant virüsün bilinen baz sırasına göre, 987 bp ve 1302 bp olması gereken PCR ürünleri, jelden temizlendi. Temizlenen her bir DNA, PCR ile çoğaltılan sırada olduğu bilinen, *Xma* I ve *Nco* I enzimleriyle ayrı ayrı kesilerek doğrulama işlemine devam edildi. Çoğaltılan 987 bp'lik DNA'nın *Xma* I enzimiyle kesiminden 247 bp ve 740 bp'lik bantlar ve *Nco* I enzimiyle kesiminden 422 bp ve 565 bp'lik bantlar beklenirken, 1302 bp'lik DNA'nın *Xma* I enzimiyle kesiminden 562 bp ve 740 bp'lik bantlar ve *Nco* I enzimiyle kesiminden 737 bp ve 565 bp'lik bantlar beklendi. Kesim sonucunda beklenen bantların mevcudiyeti, homolog rekombinasyonun yaban tip virüste, doğru yerde meydana getirildiğini ve böylece rekombinant vAmΔPK/*gfp*'nin oluşturulduğunu gösterdi (Şekil 16).



Şekil 16. Rekombinant virüs oluşumunun restriksiyon analizi ile teyit edilmesi. 1: Kesilmemiş 987 bp'lik PCR; 2: *Xma* I kesilmiş 987 bp'lik PCR; 3: *Nco* I kesilmiş 987 bp'lik PCR; 4: *Xma* I kesilmiş 1302 bp'lik PCR; 5: *Nco* I kesilmiş 1302 bp'lik PCR; 6: 100 bp'lik marker (Promega) bantlarını göstermektedir.

Diğer yandan, 1302 bp olduğu düşünülen PCR ürünü, pGEM-T Easy vektöre klonlandı ve klonun dizi analizi yaptırıldı. Rekombinant virüsün yapımında kullanılan transfer vektörü (pBS-Am $\Delta$ PK/*gfp*) hazırlanırken, *gfp* geninin pBS-Am $\Delta$ PK/*gfp* vektöre aktarılması sırasında, *gfp* geninin bulunduğu vektörün çoklu klonlama bölgesindeki kesim bölgelerinden bazı ek sıralar, pBS-Am $\Delta$ PK/*gfp* vektöre de aktarılmıştır. pBS-Am $\Delta$ PK/*gfp* vektörün hazırlanışı sırasında kullanılan bu sıralar bilindiğinden, 1302 bp'lik PCR ürününün pGEM-T Easy vektördeki klonun beklenen sırası Şekil 17'de gösterilmiştir. Şekildeki sıra, dizi analizi yaptırılan 1302 bp'lik PCR ürününün sırasıyla %100 uyumludur. Böylece, yaban tip AMEV genomundan AMV197 kodlu genin çıkarıldığı ve çıkarılan genin yerine, sferoidin promotörü altında *gfp* geni taşıyan DNA parçasının eklendiği, şüpheye yer bırakmayacak şekilde doğrulanmış oldu.

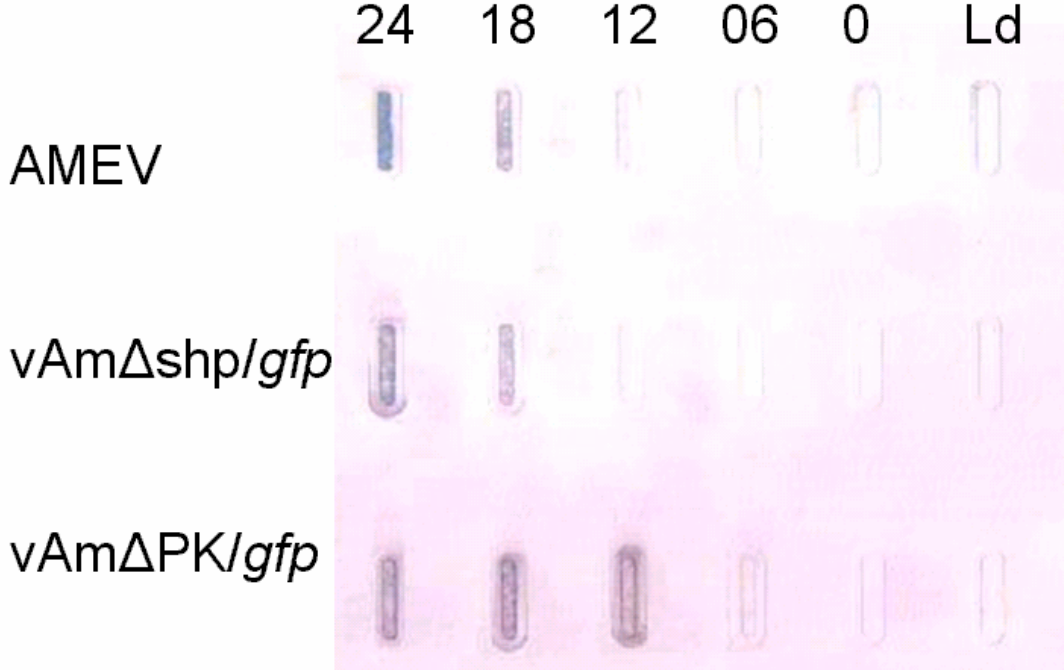
168901 atatcgataattatcaggattaattgatattccttgatataatttaaataaaatgatg  
 168961 ctatattttcttcctcgtcactattataaatttatattttgtatctttattaatgataaat  
 169021 gatatttttgtaataaatagtcataatttgtttcatctatttcttcttcatattttt  
 169081 ttttataattatataatattaataactaaaaataatattactattagtagtatataataa  
 169141 tcattttattattatataataatataaattgaaaatttattaaaataatttaataataat  
 169201 taaaaataatataatattttgatataatataataaattaattaaaatggagcctgcagga  
 attcgattgcatcgagagctctactgtcgaaacatctaacgattgtagattattaagattattgatg  
 gccaatatcataaatacattataatattattataatcaatcataaattttatataatattttat  
 ctaaaggactttttattttttatataatataataataaattgagtaacgtaccttagcaacggat  
 cccccgggctgcaggagcaagggcgaggaactgttctactggcgtggtcccaattctcgtggaactgg  
 atggcgaatggaatgggcaaaaattttctgtcagcggagagggggaaggtgatgccacatacggaaa  
 gctcaccctgaaattcatctgcaccactggaaagctccctgtgccatggccaactggctactacc  
 ctgacctatggcgtgcagtgttttccagataccagaccatatgaagcagcatgactttttcaaga  
 gcgccatgcccggggctatgtgcaggagagaaccatcttttcaaagatgacgggaactacaagac  
 ccgctgaagtcaagttcgaaggtgacaccctggtagaatacagaatcgagctgaagggcattgacttt  
 aaggaggatggaaacattctcggccacaagctggaatacaactataactccacaatgtgtacatca  
 tggccgacaagcaaaagaatggcatcaaggtcaactcaagatcagacacaacattgaggatggatc  
 cgtgcagctggccgaccattatcaacagaacactccaatcggcgacggccctgtgctcctcccagac  
 aaccattacctgtccaccagctgtccctgtctaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtcc  
 tgctggagtttgtgaccgctgtgggatcacacatggcatggacgagctgtacaagtgagaatttta  
 attaatcgatgcatcactagtgaattcgatatcaagcttgataaattagttttttgtaaaataaatt  
 aatatttttaa  
 170161 atatgtataaataatctatactttataataatatacattatcaaaatacctggatttaataa  
 170221 taatagtagtattttactataacattcgcgatatagaaaaaatttatgtatttttaatta  
 170281 tctttcgtacctaactgatataataatgtaattggtaataatagagctcttgaattaga

Şekil 17. Homolog rekombinasyondan sonra oluşan DNA dizisi. Gölge ve altı çizili sıralar, AMV197F ve PKSURFw primerlerini, mavi ve koyu sıralar AMV197GFPF ve AMV197GFPR primerlerini ve yeşil sıralar *gfp* genini göstermektedir. GFP proteininin üretimi, AMV197'e ait olan ilk ATG'den değil, *gfp* genine ait ikinci ATG'den, sferoidin promotörü sayesinde gerçekleşir.

### 3.5.3. Rekombinant Virüsün (vAm $\Delta$ PK/*gfp*) DNA Replikasyonunun Belirlenmesi

Rekombinant virüsün DNA replikasyonu, slot-blot Hibridizasyonu yöntemi ile DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Kat No: 11 745 832 910) kullanılarak belirlendi. Replikasyon işleminde hem AMEV hem de vAm $\Delta$ *shp/gfp* pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu yüzden, hibridizasyon işlemi için, her üç tip virüs için de geçerli olan prob seçildi. Her bir virüsten, 0., 6., 12., 18. ve 24. saatlerde alınan hücre lizati örnekleri membrana emdirildi. Membrandaki DNA'ların, döner durumdaki uygun sıcaklık sayesinde, işaretli prob ile hibridizasyonu sağlandı. Membranın renklendirme işlemi tamamlandıktan sonra, slot-blot hibridizasyonundan elde edilen sonuçlar kaydedildi. Sonuçlara göre, hem yaban tip AMEV'de hem de *spheroidin* geni bakımından kusurlu vAm $\Delta$ *shp/gfp*'de, viral DNA replikasyonu ilk olarak enfeksiyondan sonra 18. saatte görülmeye başladı ve 24. saatte replikasyon daha da yoğunlaştı. Buna rağmen, AMV197

bakımından kusurlu olan *vAmΔPK/gfp* için kullanılan örneklerde, ilk DNA replikasyonu 12. saatte belirlenmeye başladı (Şekil 18). DNA replikasyonu için 12. saat, hem yaban tip AMEV'ye hem de *vAmΔshp/gfp*'ye göre oldukça erken bir saattir.

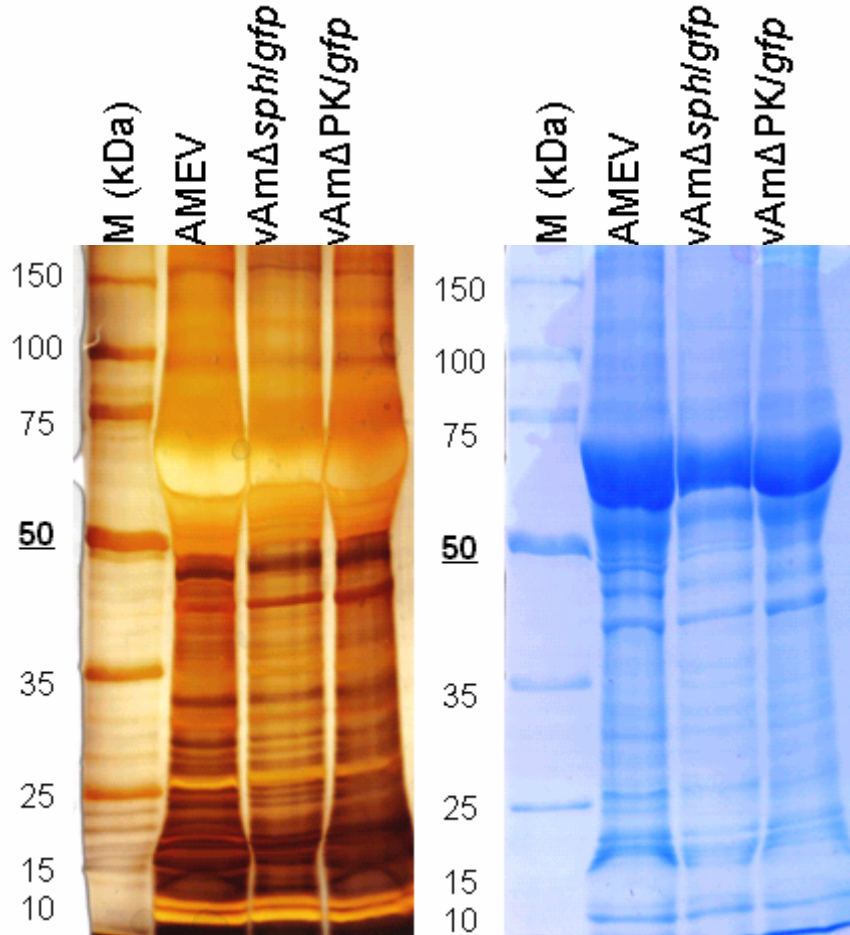


Şekil 18. Slot-blot hibridizasyonu ile DNA replikasyonu. Rekombinant *vAmΔPK/gfp*'nin DNA replikasyonu, slot-blot hibridizasyonu yöntemi kullanılarak, yaban tip AMEV ve *vAmΔshp/gfp* ile karşılaştırıldı.

#### 3.5.4. Rekombinant Virüsün (*vAmΔPK/gfp*) Protein Profilinin Belirlenmesi

Rekombinant virüsün protein profilini belirleme çalışmaları için, çeşitli denemeler yapıldı. Bu denemelerin her birinde, *vAmΔPK/gfp*'ye karşı, AMEV ve *vAmΔshp/gfp* (*shp* geni yerinde *gfp* geni içeren rekombinant virüs) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her üç virüs ile yapılan enfeksiyondan 7 gün sonra, hücre sıvıları toplandı. Yapılan santrifüj işleminden sonra virüs-hücre lizatından oluşan pellet, proteaz inhibitörleri içeren tamponda çözüldü. Bu süspansiyon, SDS-PAGE işlemine maruz bırakıldı. SDS-PAGE işleminden sonra, jel üzerindeki bantların yerleşiminde veya miktarında, kontrol virüslere göre herhangi bir farklılık tespit edilemedi. Yapılan diğer SDS-PAGE denemelerinde de, *vAmΔPK/gfp*'de, AMEV ve *vAmΔshp/gfp* virüslerine göre farklı protein bantları belirlenemedi. Sonuç olarak, virüs süspansiyonunun filtre edilerek SDS-PAGE yapıldığı

son işlemde de, iki farklı boyama metodu uygulanmasına rağmen, her üç tip virüse ait protein bantlarının ortak olduğu tespit edildi (Şekil 19).



Şekil 19. SDS-PAGE elektroforezi ile virüslerin protein içeriği. Rekombinant *vAmΔPK/gfp*'nin protein profili, yaban tip AMEV ve *vAmΔshp/gfp* ile karşılaştırıldı. Jelin gümüş boyaması yapılan hali solda ve CBB boyaması yapılan hali sağda yer almıştır.

### 3.5.5. Rekombinant Virüsün (*vAmΔPK/gfp*) Enfektivitesinin Belirlenmesi

Virüs enfektivitesinin belirlenmesi, virüs konsantrasyonunun yaban tip virüse göre kıyaslanması ile gerçekleştirilmiştir. Hem AMEV hem *vAmΔshp/gfp* (*shp* geni yerinde *gfp* geni içeren rekombinant virüs) hem de *vAmΔPK/gfp* ile enfekte edilen Ld652 hücrelerinden, enfeksiyondan 7 gün sonra her üç virüse ait virüs süspansiyonu elde edildi. Elde edilen süspansiyonların konsantrasyonları, EPDA deneyi sayesinde belirlendi.



Deneyler, dört tekrar olarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer olarak verildi. Elde edilen veriler, Tablo 4’de gösterildi.

Tablo 4’deki verilere dayanarak, yaban tip AMEV virüsünün, kontrol olarak kullanılan sferoidinsiz virüse (*vAm $\Delta$ *shp/gfp**) göre daha az enfektif olduğunu söyleyebiliriz. Bu durumda, hem *vAm $\Delta$ *shp/gfp** hem de *vAm $\Delta$ PK/*gfp** ile yapılan deney sırasında ortaya çıkan GFP üretiminin, her iki rekombinant virüste de aynı sferoidin promotörü tarafından sağlandığı bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak, GFP miktarının kıyaslanmasının yaban tip AMEV’deki sitopatik etkileri gözle belirlemeye çalışmaktan daha sağlıklı sonuç vereceğinden, testin pozitif kontrolünün *vAm $\Delta$ *shp/gfp** virüsüne göre yapılması sonucuna varıldı. Böylece, *vAm $\Delta$ *shp/gfp** virüsüne ait konsantrasyon  $13,58 \times 10^8$  pfu/ml ve bu çalışmanın ürünü olan protein kinaz geninden mahrum *vAm $\Delta$ PK/*gfp** virüsüne ait konsantrasyon ise  $0,39 \times 10^8$  pfu/ml olarak belirlendi. Böylece, *vAm $\Delta$ PK/*gfp** enfektivitesinin kontrole göre %61 oranında azaldığı tespit edildi.

Tablo 4. Rekombinant AMEV’nin Enfektivitesi.

<b>Virüs Konsantrasyonu (pfu/ml)</b>	
<b>AMEV</b>	$7,67 \times 10^8 \pm 5,15$
<b><i>vAm<math>\Delta</math><i>shp/gfp</i></i></b>	$13,58 \times 10^8 \pm 3,87$
<b><i>vAm<math>\Delta</math>PK/<i>gfp</i></i></b>	$0,39 \times 10^8 \pm 0,17$

#### 4. TARTIŞMA

Poksvirüslere ait bir çok enzime, örneğin DNA-bağımlı RNA polimeraza (Baroudy ve Moss, 1980; Shchelkunov vd., 1993), poli (A) polimeraza (Moss vd., 1975), mRNA guaniltransferaza ve mRNA metil transferaza (Martin vd., 1975; Barbosa ve Moss, 1978) dair çok çeşitli bilgiler olmasına rağmen, protein kinazlara ait bilgiler sınırlıdır. Poksvirüs protein kinazlarıyla ilgili ilk çalışmalar, vaksinya virüs B1R (Rempel ve Traktman, 1992; Lin vd., 1992) ve F10L (Lin ve Broyles, 1994) protein kinazlarına aittir. Bu çalışmaları, diğer poksvirüs protein kinazlarıyla (Fowlpox virüs (FWPV-*pk*, Poxviridae; Afonso vd., 2000) Myksoma virüs (MYXV-*pk*, Poxviridae; Cameron vd., 1999), *Molluscum contagiosum* virüs alt tip 1 (MOCV1-*pk*, Poxviridae; Senkevich vd., 1996), Variola major virüs (VARV-*pk*, Poxviridae; Massung vd., 1993)) ilgili çalışmalar takip etmiştir. Ancak literatürde, *Amsacta moorei* entomopoksvirüs (AMEV) protein kinaz (*pk*) genleri ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Protein kinazların katalitik bölgeleri, 30 kDa'a karşılık gelen 250-300 aminoaside kadar ulaşmaktadır. Katalitik bölgelerin tam sıraları, kesim enzimlerinin kullanıldığı deneyler sayesinde, korunmuş dizilerin incelenmesiyle tanımlanmıştır (Hanks vd., 1988). Katalitik bölgenin protein kinazlar içindeki yerleşimi sabit olmamakla beraber, tek alt birimden oluşan enzimlerin çoğunda, proteinin karboksil ucuna yakın olarak bulunur ve proteinin amino ucu düzenleyici rolü üstlenir. Çoklu alt ünitelere sahip olan protein kinazlarda ise, katalitik bölgenin neredeyse tamamını içeren polipeptitler mevcuttur. AMV197 katalitik bölgesi ise, 12. aminoasitten başlayarak neredeyse genin tamamını kaplamaktadır. Ayrıca, bu proteinin amino ucu, Hanks ve arkadaşları (1988) tarafından bazı katalitik bölge polipeptitleri için gösterilen ilk korunmuş glisine, 10 aminoasit kadar yakındır.

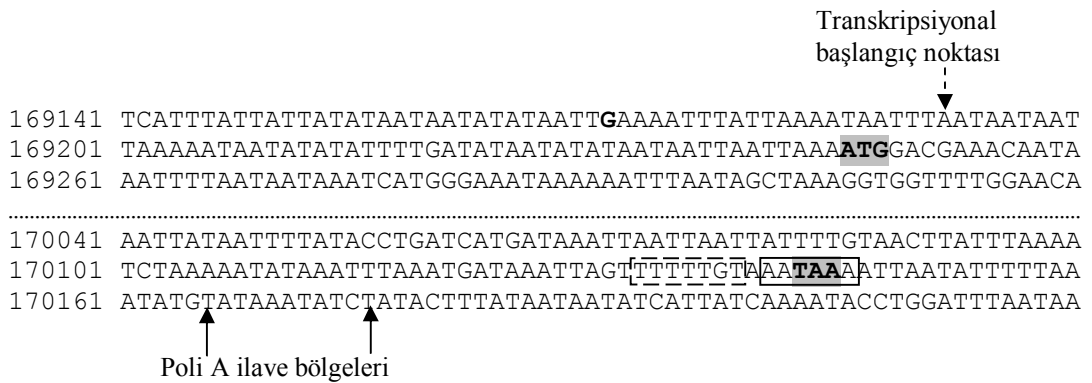
Protein kinazlarla ilgili genlerin büyük bir gurubunun DNA dizileri belirlenmiş ve aminoasit motifleri araştırılmıştır. Hanks ve arkadaşları (1988), PK protein ailesinin 65 farklı üyesi üzerinde yapılan çalışmaya dayanarak, protein kinazların katalitik bölgeleri için 11 korunmuş bölge rapor etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında AMV197'de, I., II., VI., VII. ve VIII. bölgeler net bir şekilde tanımlanırken, III. IV. IX. ve X. bölgeler sadece tahmin edilebilmiştir. Fakat, V. ve XI. bölgeler hakkında herhangi bir yorum yapılamamıştır.

AMV197, DNA sentez inhibitörünün (Ara-C) mevcudiyetinde, transkriptlerin varlığına göre, erken sınıfı gen olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, transkriptler, enfeksiyondan sonra 4. saatten itibaren görülmeye başlanmış ve 7. saatte en yüksek noktaya ulaşmıştır. Bu zaman dilimi, öncelikle poksvirüsler için genomun replikasyonu, DNA, RNA ve proteinin modifikasyonunda rol oynayan proteinler gibi, yapısal olmayan proteinlerin sentezi için uygundur (URL-2, 2010). Bir başka çalışmada, vaksinya virüs enfeksiyonundan sonra, 0., 0,5., 1., 2. ve 4. saatlerde izole edilen, poliadenillenmiş mRNA'lardan yapılan cDNA'ların, Applied Biosystems SOLID cihazı kullanılarak, dizi analizleri yapılmıştır (Yang vd., 2010). Bu çalışmada, dördüncü saate ait oluşturulan cDNA'lar, vaksinya virüs DNA'sının %97'sine tekabül etmektedir. Buna göre, virüse ait transkripsiyon, enfeksiyondan yaklaşık 4 saat sonra tamamlanmaktadır. Diğer bir durumda aynı işlem, sitozin arabinosid (Ara-C, DNA sentez inhibitörü) veya sikloheksimid (CHX, mRNA translasyon inhibitörü) varlığında tekrarlanmıştır. Bu kez, 2. saatte izole edilen mRNA'lardan oluşturulan cDNA'lar, bu inhibitörlerin yokluğuna benzer olarak, vaksinya virüs DNA'sının yaklaşık %60'ını oluşturmuştur. İnhibitör varlığında ancak erken genlerin transkripsiyonu gerçekleşeceğinden, 2. saatte belirlenen transkriptler, erken genlere aittir. Buna göre, inhibitörlerin mevcudiyetine rağmen gerçekleşebilen erken gen transkripsiyonu, enfeksiyondan sonra 2. saatten itibaren meydana gelmektedir. Bu sonuç, bu tez çalışması kapsamında, erken gene ait ilk transkriptlerin enfeksiyondan sonra 4. saatte görülmesiyle uyumsuz gibi görünmektedir. Oysa cDNA dizisinin belirlenmesi işlemi, çalışmamızda kullanılan RT-PCR'ye göre çok daha duyarlı bir teknik olduğundan, meydana gelen mRNA'ların daha geç bir saatte tespit edilmesinin normal olduğu düşünülmektedir.

Genin transkripsiyonel başlangıç ve bitiş noktaları, 5'/3' RACE analiziyle belirlendi. 5' RACE analizine göre, 5' UTR'nin 54 bp olduğu belirlendi. Ayrıca, promotor bölgesinde, değişken ve A-T nükleotidleri bakımından zengin sıralarla çevrelenen -21. nükleotidde üniversal bir G olduğu tespit edildi (Şekil 20). Bu sıranın, daha önce Davison ve Moss (1989b) tarafından tanımlanan vaksinya virüs erken promotor elementleriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

3' UTR sonuçlarına göre, AMV197 genine ait heterojen transkriptler mevcuttur. Bunlar, translasyon bitiş noktasının 21 bp ve 31 bp aşağısında sonlanır. Yani, AMV197 kesim noktalarından biri, genomun 170166. nükleotidinde iken, diğeri, birincinin 10 nükleotid aşağısında ve genomun 170176. nükleotidinde belirlenmiştir. Heterojen

transkriptlerin mevcudiyeti, vaksinya virüse ait timidin kinaz geninde de mevcuttur. Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada timidin kinaz genine ait, 590 bp ve 2140 bp arasında değişen mRNA'lar tespit edilmiştir (Bajzar vd., 1983). AMV197 transkriptlerinde de tespit ettiğimiz bu heterojenliğin, memelilerde yaygın olan transkript seçiminin esnekliğine (Pauws vd., 2001) benzer bir mekanizmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsan ve diğer memeli genomlarının dizi analizinin yapılması, poliadenilasyon ve alternatif poliadenilasyon altında yatan olayları araştırma fırsatı sunmuştur. Bu fırsatlar, bilgiye ulaşılma kolaylığı ve yeni teknikler sayesinde, insanda ve farede kodlanan transkriptlerin sayısının, genlerin sayısından 10 kat hatta daha fazla olduğunu göstermiştir (Carninci vd., 2005; Cheng vd., 2005). Bu transkript varyasyonları, alternatif olarak poliadenillenmiş mRNA'ları temsil etmektedir. Alternatif poliadenilasyon, gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynar. Bu mekanizma, farklı 3' UTR'lere sahip mRNA'lar üreterek, olgun transkriptlerin çeşitliliğini artırır. 3' UTR'lerde değişikliğe yol açabilen bu mekanizma, mRNA'nın kararlılığını, taşınabilirliğini ve protein üretim yeteneğini etkileyebilir (Chuvpilo vd., 1999).



Şekil 20. AMV197'nin transkriptomik yapısı. Translasyon başlangıç ve bitiş noktaları, gölgeli olarak işaretlenmiştir. Kesikli ok, AMV197'nin 5' ucunu, düz oklar, 3' uçlarını, kesikli kutu, transkripsiyon terminasyon sinyalini ve düz kutu poliadenilasyon sinyalini göstermektedir.

AMV197'deki translasyon bitiş noktası, AAUAAA poliadenilasyon sinyaliniyle üst üste gelmiştir (Şekil 20). mRNA'nın poliadenilasyonu, viral ve ökaryotik gen ekspresyonunun kontrolünde önemli bir rol oynar. Ökaryotik mRNA'ların hepsinde, AAUAAA sırasına ilave olarak ve bu sıranın aşağısında U/GU bakımından zengin bir sıra daha mevcuttur. Bu iki korunmuş sıra, mRNA'ların 3' işlenmesi için gereken düzenlemeden sorumludur. Olgunlaşmamış mRNA'nın kesim bölgesi, kesim bölgesinin

nükleotit içeriği ve düzenleyici sıraların durumuyla beraber tespit edilir. Kesim bölgesi, AAUAAA sırasından 11-24 nükleotit aşağıda ve U/GU bakımından zengin sıranın 10-30 nükleotit yukarısında bulunur (Chen vd., 1995). Bu durumda, çıplak mRNA'nın kesilmesi bu iki korunmuş sıranın arasından, bu işleme özel bir nükleaz ile gerçekleştirilir (Ryan vd., 2004). Kesim işleminden sonra bu serbest uca, 150-200 adenilat nükleotidlerini içeren poli (A) kuyruğun eklenmesi gerçekleşir (Gilmartin, 2005).

Terminasyon sinyali ((T)<sub>5</sub>NT), normalde poksvirüs erken mRNA'larının 3' UTR'lerinin yukarısında bulunmaktadır. Bu doğrultuda aranan AMV197'nin terminasyon sinyali, AMV197 mRNA'sının 3' UTR'sinin yukarısında bulunamadı. Yapılan ayrıntılı bir incelemeden sonra, korunmuş terminasyon sırası (TTTTTGT), AMV197'in kodlama sırasının içinde (ORF) bulunmuştur (Şekil 20). Terminasyon sinyalinin, AMV197 ORF'nin içinde bulunması, vaksinya virüs erken genleriyle ilgili bilgilerle de uyumludur ve poliadenilasyon sinyalinin yanına yerleşmiştir (Yuen ve Moss, 1987).

Oluşturulan rekombinant virüsün konsantrasyonu, yaban tip ve vAm $\Delta$ shp/gfp virüs ile karşılaştırıldı. Yapılan deney sonucunda, yaban tip virüs ile vAm $\Delta$ shp/gfp virüsün konsantrasyonu arasında fark belirlendi. Ancak, bu durumun gerçekte doğru olmadığı, yapılan çalışmalarda vAm $\Delta$ shp/gfp virüsün, yaban tip virüse göre herhangi bir enfektivite farkı sergilemediği belirlenmiştir (Palmer vd., 1995). Bu çalışmada elde edilen bu yüksek değer, GFP'den dolayı daha hassas ölçme yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumda kontrol olarak kullanılan virüslerden vAm $\Delta$ shp/gfp ile yapılan testin daha güvenilir olma ihtimali göz önünde bulundurulduğunda, vAm $\Delta$ PK/gfp'nin enfektivitesinin, kontrol virüse göre azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuca göre, *pk* geni virüs replikasyonu için zorunlu olmamakla birlikte, bu genin genomdan silinmesi durumunda, virüsün enfektivitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Herpes Simpleks Virüs-1 (HSV-1) tarafından kodlanan protein kinaz (Us3) üzerinde yapılan benzer çalışmalarda, 147. sıradaki serin aminoasidinin enfekte olmuş hücrelerde ve *in vitro*'da otofosforilasyon sırasında fosforillendiği bilinmektedir (Kato vd., 2008). Yapılan çalışmada, bu serin aminoasidinin yeri, protein kinaz fonksiyonunu bozacak bir aminoasit olan alanin ile değiştirilmiştir. Bu virüs (Us3S147A) ve yaban tip HSV-1 kullanılarak yapılan enfeksiyon sonucunda elde edilen virüs süspansiyonlarının konsantrasyonları, standart plak deneyi ile belirlenmiştir. Yaban tip HSV-1 ve Us3S147A tarafından üretilen yavru virüs miktarında önemli bir fark belirlenmemiştir. Bu verilere göre, her ne kadar mevcut çalışmada, protein kinaz kusurlu virüsün enfektivitesinin %61

oranında azaldığı belirlenmiş olsa da, bu çalışmaya benzer olarak, optimum HSV-1 replikasyonu için, bu fosforilasyonun zorunlu olmadığı gösterilmiştir (Kato vd., 2008).

Daha sonra, Sagou ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada, HSV-1 protein kinazı Us3'ün, 147. serin aminoasidinden fosforillenmiş halinin, fosforillenmemiş haline göre çok daha yüksek protein kinaz etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Us3 protein kinazda, bu 147. aminoasit olan serinin yerinin alanin ile değiştirilmesi sonucu oluşturulan yeni virüsün (Us3S147A), fare korneasındaki ve farelerde herpes stromatal keratit ve perioküler deri hastalığının gelişimindeki viral replikasyonu önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Us3'ün katalitik aktivitesinin enfekte olmuş hücrelerde Ser-147'nin otofosforilasyonu tarafından sıkı bir şekilde denetlendiğini ve otofosforilasyon sayesinde Us3'ün kontrolünün, *in vivo* ve HSV-1 patogenezisindeki viral replikasyonda hayati bir rol oynadığını göstermiştir (Sagou vd, 2009). Muhtemelen, Us3'ün, HSV-1'deki diğer bir protein kinaz olan UL13 tarafından fosforilasyonu, bazal Us3 protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde kısmi bir rol oynamaktadır. Çünkü UL13 yoksunu mutant virüsün fenotipi, Us3 katalitik aktivitesi sayesinde ayarlandığı gösterilen UL13 ve UL34 protein kinazların yerleşimiyle ilgili olarak, Us3 yoksunu mutant virüsün fenotipine benzerdir (Roux ve Blenis, 2004; Kato vd, 2006).

Bu çalışma göz önüne alındığında, AMEV'nin biyoinformatik analizlerine göre, AMV153 kodlu bir genin de bir serin/treonin protein kinaz olduğu varsayılmaktadır (Bawden vd., 2000). Bu gen üzerinde yapılmış henüz hiçbir çalışma yoktur. Muhtemelen, AMV197 geni silinen virüste (*vAmΔPK/gfp*), AMV153 kodlu gen, AMV197 kodlu genin eksikliğini telafi edecek şekilde görev yapmaktadır. Bu yüzden, *vAmΔPK/gfp* virüs için virüs üretiminde azalma olmakla beraber, virüsün hücre kültüründeki replikasyonunun mevcudiyeti, bu silinme işleminden etkilenmemiş olabilir.

DNA replikasyonunu belirleme işlemi için, DIG işaretleme sistemiyle işaretlenmiş prob ile birlikte slot-blot yöntemi kullanıldı. Daha önce slot-blot hibridizasyon yöntemiyle gerçekleştirilen AMEV'ye ait DNA replikasyonu çalışmalarında, AMEV DNA'sının enfeksiyondan sonraki yaklaşık 9. saatte belirlendiği rapor edilmiştir. Yaklaşık 23. saatte en yüksek seviyeye ulaşan DNA replikasyonu, bu saatten itibaren azalmıştır (Winter vd, 1995). Bu çalışmada, yaban tip DNA replikasyonunun ilk kez 18. saatte görülmeye başlaması, çalışmada kullanılan DIG ile işaretleme yönteminin hassasiyetiyle ilgili bir sorundur. Fakat rekombinant virüsün DNA replikasyonunun, kontrol virüslerin DNA

replikasyonuna göre daha erken meydana geldiği açıktır. Bu durumda, AMV197'nin yokluğunda DNA replikasyonunun daha erken başladığı tartışılmamalıdır. Bu bağlamda, deney sonucunda, *vAmΔPK/gfp*'nin DNA replikasyonunun, kontrol virüslere göre yaklaşık 6 saat kadar erken meydana geldiği belirlendi. Buna göre, AMV197 kodlu ORF'nin, henüz bilinmeyen nedenlerle DNA replikasyonunu geciktirici bir görevi olabileceği ve bu genin eksikliğinin, DNA replikasyonunu daha erken saatte meydana getirebileceği düşünülmektedir.

Rekombinant *vAmΔPK/gfp*'nin protein profilini belirlemek amacıyla, AMV197 geninin protein ürününün, rekombinant virüsteki eksikliği veya bu genin eksikliğine bağlı olarak üretilen, diğer proteinlerde meydana gelebilecek herhangi bir eksiklik veya fazlalığın olup olmadığı araştırıldı. Yapılan çalışma sonucunda yaban tip ve rekombinant virüs protein profilleri arasında herhangi bir farklılık belirlenemedi. Yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE yöntemi kullanılarak, AMEV'nin protein profili ve bu yöntemin izin verdiği ölçüde yapısal proteinleri belirlenmişti (Langridge ve Roberts, 1982). Tez çalışması ile uyumlu olacak şekilde, burada da AMV197'ye karşılık gelecek 35,5 kDa'luk protein bandı gözlenemedi. Diğer yandan, AMEV'nin proteomik çalışmalarını yapan Profesör Basil ARIF ile kişisel iletişim sonucunda, AMEV'nin 134 tane yapısal geni olduğu bilinmektedir. Belirlenen bu yapısal proteinler arasında, AMV197'nin olmaması, bu genin yapısal olmayan bir proteini kodladığını göstermiştir. Bu bilgi, yapısal olmayan genlerin ürünlerini SDS-PAGE ile tespit edemeyeceğimiz gerçeğiyle uyumludur. Bu yüzden, SDS-PAGE ile yapılan protein analizi çalışmalarından netice alınamamasının normal olduğu sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, AMEV'nin AMV197 kodlu ORF'sine ait genin, protein kinaz motifleri tespit edilmiş, transkripsiyon zamanı ve transkripsiyon sınıfı ile genin 3'/5' uçlarındaki proteine dönüşmeyen bölgelerinin sırası belirlenmiştir. Ayrıca, gen bakımından kusurlu virüs üretilmiş ve bu genin yaban tip virüsün replikasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

1. Virüs stokunun konsantrasyonu EPDA metodu ile yapılan hesaplama göre, AMEV ve *vAmΔshp/gfp* stok konsantrasyonları sırasıyla  $7,76 \times 10^8$  pfu/ml ve  $1,7 \times 10^8$  pfu/ml olarak belirlendi.

2. AMV197 kodlu genin biyoinformatik analizinin sonucunda;

a) AMV197'in serin/treonin protein kinazın katalitik bölgesinin 12.-299. aminoasitler arasında ve ATP bağlanma bölgesini oluşturan IAKGGFGTV motifinin ise 18.-26. aminoasitleri arasında olduğu belirlendi.

b) AMV197'de, protein kinazların katalitik bölgeleri için rapor edilen 11 korunmuş bölgeden, I., II., VI., VII. ve VIII. bölgeler net bir şekilde tanımlanırken, III. IV. IX. ve X. bölgeler sadece tahminen bulundu. Fakat, V. ve XI. bölgeler hakkında herhangi bir yorum yapılamadı.

3. AMV197 kodlu genin transkripsiyon analizi sonucunda;

a) Genin transkripsiyonunun Ld652 hücre kültüründe enfeksiyonu takip eden 2. ve 4. saatler arasında başladığı, enfeksiyondan sonraki 7. saatte, yoğunlaştığı ve daha sonra azalarak devam ettiği belirlendi.

b) AMV197 kodlu genin, DNA sentez inhibitörü Ara-C varlığında ve yokluğunda sentezlendiğinden dolayı erken bir gen olduğu belirlendi.

c) AMV197 geninin transkripsiyon başlangıç noktasının (5' UTR), ATG'den 54 baz yukarda olduğu tespit edildi.

d) AMV197'nin iki adet poliadenilasyon kesim noktasına sahip olduğu ve bu noktalardan birinin, TAA'dan 21 baz aşağıda, diğerinin ise 31 baz aşağıda sonlandığı bulunmuştur.

4. Homolog rekombinasyon yöntemi kullanılarak, virüs genomundan AMV197'nin silinmesi sağlandı.



5. Oluşturulan rekombinant  $vAm\Delta PK/gfp$  virüs ile yaban tip virüs karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda;

a)  $vAm\Delta PK/gfp$ 'nin enfektivitesinin, kontrole göre yaklaşık %61 oranında azaldığı belirlendi.

b) Viral DNA replikasyonunun yaban tip virüse göre, yaklaşık 6 saat daha erken meydana geldiği tespit edildi.

c) SDS-PAGE yapılan protein profili karşılaştırmasında yaban tip ve rekombinant virüs enfeksiyonları sonucu protein sentez profilinde herhangi bir farklılık tespit edilemedi.

## 6. ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmalara rağmen, genin fonksiyonu hakkında bilinmeyen hala çok fazla şey mevcuttur. Bilinmeyenlerin aydınlatılması için, yapılması gereken bazı çalışmalar önerilmektedir. Bu öneriler başlıklar halinde sıralanmıştır:

1. AMV197 kodlu gen, hem prokaryotik hem de ökaryotik gen ifade sistemlerine klonlanmalı ve elde edilen protein ürünün, serin/treonin protein kinaz fonksiyonu göstererek bilinen substratı fosforilleyip fosforillemediği, protein kinaz deneyi sayesinde araştırılmalıdır.

2. İfade edilen proteine özel antikolar ve virüsle enfekte hücre ekstratı kullanılarak, AMV197 gen ürünü protein ile reaksiyona girecek olan muhtemel virüs veya hücrenel kaynaklı substrat proteinleri tespit edilmelidir.

3. Tespit edilecek substrat proteinlerin, virüsün hücreyi enfeksiyonundaki rolü araştırılmalıdır.

4. AMV197 gen ürününün, GFP veya LacZ gibi bir işaret proteiniyle beraber üretilerek işaretlenmesi sağlanmalı ve işaretlenen gen ürünü proteinin AMEV virüste *in vivo* olarak bulunduğu yer tespit edilmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F. ve Rock, D. L., 2000. The genome of fowlpox virus, Journal of Virology, 74, 3815-3831.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G. ve Jessee, J., 1996. Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac® baculovirus expression system, Focus, 17, 53-58.
- Arif, B. M. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, The entomopoxviruses, E. Kurstak, Editör, Dekker, New York, 175-195.
- Bajszar, G., Wittek, R., Weir, J. P. ve Moss, B., 1983. Vaccinia virus thymidine kinase and neighboring genes: mRNAs and polypeptides of wild-type virus and putative nonsense mutants, Journal of Virology, 45, 62-72.
- Banham, A. H. ve Smith, G. L., 1992. Vaccinia virus gene B1R encodes a 34-kDa serine/threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions, Virology, 191, 803-812.
- Banham, A. H., Leader, D. P. ve Smith, G. L., 1993. Phosphorylation of ribosomal proteins by the vaccinia virus B1R protein kinase, Federation of European Biochemical Societies, 321, 27-31.
- Barbosa, E. ve Moss, B., 1978. mRNA (nucleoside-29)-methyltransferase from Vaccinia virus. Characteristics and substrate specificity, Journal of Biological Chemistry, 253, 7698-7702.
- Baroudy, B. M. ve Moss, B., 1980. Purification and characterization of DNA-dependent RNA polymerase from Vaccinia virions, Journal of Biological Chemistry, 225, 4372-4380.
- Bawden, A. L., Glassberg, K.J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W. ve Moyer, R.W., 2000. Complete genomic sequence of the Amsacta moorei entomopoxvirus: analysis ve comparison with other poxviruses, Virology, 274, 120-139.
- Beaud, G., Masse' T., Madjar, J. J. ve Leader, D. P., 1989. Identification of induced protein kinase activities specific for the ribosomal proteins uniquely phosphorylated during infection of HeLa cells with vaccinia virus, Federation of European Biochemical Societies, 259, 10-14.
- Beaud, G., Sharif, A., Topa-Masse, A. ve Leader D. P., 1994. The ribosomal protein S2/Sa kinase purified from HeLa cells infected with vaccinia virus corresponds to the B1R protein kinase and phosphorylates *in vitro* the viral single-stranded DNA-binding protein, Journal of General Virology, 75, 283-293.
- Bergoin, M., Veyrunes, J. C. ve Scalla, R., 1970. Isolation ve amino acid composition of the inclusions of *Melolontha melolontha* poxvirus, Virology, 40, 760-763.

- Bertholet, C., Stocco, P., Van Meir, E. ve Wittek, R., 1986. Functional analysis of the 59 flanking sequence of a vaccinia virus late gene, EMBO Journal, 5, 1951-1957.
- Bilimoria, S. L. ve Arif, B. M., 1979. Subunit protein and alkaline protease of entomopoxvirus spheroids, Virology 96, 596-603.
- Boucias, D. G. ve Pendland, J., 1998. Principles of Insect Pathology, Kluwer Academic Publishers, Boston, 537.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-51.
- Broyles, S. S., 2003. Vaccinia virus transcription, Journal General Virology, 84, 2293-2303.
- Buendia, B., Person-Fernandez, A., Beaud, G. ve Madjar, J. J., 1987. Ribosomal protein phosphorylation *in vivo* and *in vitro* by vaccinia virus, European Journal of Biochemistry, 162, 95-103.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. ve McFadden, G., 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus, Virology, 264, 298-318.
- Cann, A. J., 2005. Principles of Molecular Virology, 4. baskı, Academic Press, University of Leicester, UK, 43 s.
- Chuvpilo, S., Zimmer, M., Kerstan, A., Glockner, J., Avots, A., Escher, C., Fischer, C., Inashkina, I., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F. vd., 1999. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells, Immunity, 10, 261-269.
- Fantom Konsorsiyum; Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V. B., Brenner, S. E., Batalov, S., Forrest, A. R. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., Aidinis, V., Allen, J. E., Ambesi-Impombato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R. N., Bailey, T. L., Bansal, M., Baxter, L., Beisel, K. W., Bersano, T., Bono, H., Chalk, A. M., Chiu, K. P., Choudhary, V., Christoffels, A., Clutterbuck, D. R., Crowe, M. L., Dalla, E., Dalrymple, B. P., de Bono, B., Della Gatta, G., di Bernardo, D., Down, T., Engstrom, P., Fagiolini, M., Faulkner, G., Fletcher, C. F., Fukushima, T., Furuno, M., Futaki, S., Gariboldi, M., Georgii-Hemming, P., Gingeras, T. R., Gojobori, T., Green, R. E., Gustincich, S., Harbers, M., Hayashi, Y., Hensch, T. K., Hirokawa, N., Hill, D., Huminiecki, L., Iacono, M., Ikeo, K., Iwama, A., Ishikawa, T., Jakt, M., Kanapin, A., Katoh, M., Kawasaki, Y., Kelso, J., Kitamura, H., Kitano, H., Kollias, G., Krishnan, S. P. T., Kruger, A., Kummerfeld, S. K., Kurochkin, I. V., Lareau, L. F., Lazarevic, D., Lipovich, L., Liu, J., Liuni, S., McWilliam, S., Madan Babu, M., Madera, M., Marchionni, L., Matsuda, H., Matsuzawa, S., Miki, H., Mignone, F., Miyake, S., Morris, K., Mottagui-Tabar, S., Mulder, N., Nakano, N., Nakauchi, H., Ng, P., Nilsson, R., Nishiguchi, S., Nishikawa, S., Nori, F.,

- Ohara, O., Okazaki, Y., Orlando, V., Pang, K. C., Pavan, W. J., Pavesi, G., Pesole, G., Petrovsky, N., Piazza, S., Reed, J., Reid, J. F., Ring, B. Z., Ringwald, M., Rost, B., Ruan, Y., Salzberg, S. L., Sandelin, A., Schneider, C., Schönbach, C., Sekiguchi, K., Semple, C. A. M., Seno, S., Sessa, L., Sheng, Y., Shibata, Y., Shimada, H., Shimada, K., Silva, D., Sinclair, B., Sperling, S., Stupka, E., Sugiura, K., Sultana, R., Takenaka, Y., Taki, K., Tammoja, K., Tan, S. L., Tang, S., Taylor, M. S., Tegner, J., Teichmann, S. A., Ueda, H. R., van Nimwegen, E., Verardo, R., Wei, C. L., Yagi, K., Yamanishi, H., Zabarovsky, E., Zhu, S., Zimmer, A., Hide, W., Bult, C., Grimmond, S. M., Teasdale, R. D., Liu, E. T., Brusic, V., Quackenbush, J., Wahlestedt, C., Mattick, J. S., Hume, D.A., RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group); Kai, C., Sasaki, D., Tomaru, Y., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Suzuki, M., Aoki, J., Arakawa, T., Iida, J., Imamura, K., Itoh, M., Kato, T., Kawaji, H., Kawagashira, N., Kawashima, T., Kojima, M., Kondo, S., Konno, H., Nakano, K., Ninomiya, N., Nishio, T., Okada, M., Plessy, C., Shibata, K., Shiraki, T., Suzuki, S., Tagami, M., Waki, K., Watahiki, A., Okamura-Oho, Y., Suzuki, H., Kawai, J. ve Hayashizaki, Y., 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome, Science, 309, 1559-1563.
- Carter, J. B. ve Saunders, V. A., 2007. Virology principles and applications, School of Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, UK, 76 s.
- Charles, J. F., Delecluse, A. ve Nielsen-LeRoux, C., 2000. Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 522 s.
- Chen, F., MacDonald, C. C. ve Wilusz, J., 1995. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal, Nucleic Acids Research, 23, 2614-2620.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Paterl, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D. S. ve Gingeras, T. R., 2005. Transcriptional maps of 10 human chromosomes and 5-nucleotide resolution, Science, 308, 1149-1154.
- Ciccarone, V. C., Polayes, D. ve Luckow, V. A., 1997. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector, Cilt 13, U. Reisch, ed., Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Darling, A. J., Boose, J. A. ve Spaltro, J., 1998. Virus assay methods: accuracy and validation. Biologicals, 26, 105–110.
- Davison, A. J. ve Moss, B., 1989a. Structure of vaccinia virus late promoters. Journal of Molecular Biology, 210, 771-784.
- Davison, A. J. ve Moss, B., 1989b. Structure of Vaccinia virus early promoters, Journal of Molecular Biology, 210, 749–769.

- Dulbecco, R. ve Vogt, M., 1953. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 18, 273-279.
- Flexner, J. L. ve Belnavis, D. L., 2000. Microbial Insecticides, Sf: 35-62. Ed: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl, Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 392 s.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. ve Martin, G. R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85, 8998-9002.
- Gilmartin, G. M., 2005. Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends, Genes Development, 19, 2517-2521.
- Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P. ve Paoletti, E., 1990. The complete sequence of vaccinia virus, Virology, 179, 247-266.
- Goodwin, R. H., Adams, J. R. ve Shapiro, M., 1990. Replication of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in serum-free cultures of a gypsy-moth cell line, Journal of Invertebrate Pathology, 56, 190-205.
- Goodwin, R. H., Milner, R. J. ve Beaton, C. D., 1991. Atlas of Invertebrate Viruses, Entomopoxvirinae, J. R. Adams ve J. R. Bonami, Editörler, CRC Press, Boca Raton, FL, 259-285.
- Gruidl, M. E., Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1992. Mapping and molecular characterization of a functional thymidine kinase from *Amsacta moorei* entomopoxvirus, Virology, 186, 507-516.
- Guo, F. B. ve Yu, X. J., 2007. Re-prediction of protein-coding genes in the genome of *Amsacta moorei* entomopoxvirüs. Journal of Virological Methods, 146, 389-392.
- Hall, R. L. ve Hink, W. F., 1990. Physical mapping and field inversion gel electrophoresis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA, Archives of Virology, 110, 77-90.
- Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1991. Identification, cloning, and sequencing of a fragment of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA containing the spheroidin gene and three vaccinia virus-related open reading frames, Journal of Virology, 65, 6516-6527.
- Hall, R. L., Li, Y., Feller, J. A. ve Moyer, R. W., 1996. The *Amsacta moorei* entomopoxvirus spheroidin gene is improperly transcribed in vertebrate poxviruses, Virology, 224, 427-436.
- Hanks, S. K., 1987. Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84, 388-392.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. ve Hunter, T., 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science, 241, 42-52.

- Hanks, S. K. ve Hunter, T., 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification, Federation of European Biochemical Societies, 9, 576-596.
- Harrison, R. L. ve Bonning, B. C., 2000. Genetic engineering of biocontrol agents for insects, Ed: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl, Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 243-280.
- Howard, S. T. ve Smith, G. L., 1989. Two early vaccinia virus genes encode polypeptides related to protein kinases. Journal of General Virology, 70, 3187-3201.
- Hunter, T., 1987. A thousand and one protein kinases, Cell, 50, 823-829.
- Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F. ve Crook, N. E., 1998. Insect Viruses and Pest Management, John Wiley ve Sons, Chichester.
- Kaerlein, M. ve Horak, I., 1976. Phosphorylation of ribosomal proteins in HeLa cells infected with vaccinia virus, Nature, 259, 150-151.
- Kaerlein, M. ve Horak, I., 1978. Identification and characterization of ribosomal proteins in vaccinia virus-infected HeLa cells, European Journal of Biochemistry, 90, 463-469.
- Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Tanaka, M., Sata, T., Nishiyama, Y. ve Kawaguchi, Y., 2006. Herpes Simplex Virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31, Journal of Virology, 80, 1476-1486.
- Kato, A., Tanaka, M., Yamamoto, M., Asai, R., Sata, T., Nishiyama, Y. ve Kawaguchi, Y., 2008. Identification of a physiological phosphorylation site of the Herpes Simplex Virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity *in vitro* and influences its function in infected cells. Journal of Virology, 82, 6172-6189.
- King L. A., Wilkinson N., Miller D. P., Marlow S. A., 1998. Entomopoxvirus. Miller LK. Andrew Ball L. eds. *The Insect Viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1-25.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S. ve Sowadski, J. M., 1991. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, Science, 253, 414-420.
- Krebs, E. G., Graves, D. J. ve Fischer, E. H., 1959. Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase, Journal of Biological Chemistry, 234, 2867-2873.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Langridge, W. H. R. ve Roberts, D. W., 1982. Structural proteins of *Amsacta moorei*, *Euxoa auxiliaris*, and *Melanoplus sanguinipes* entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 39, 346-353.

- Langridge, W. H. R., 1983, Partial characterization of DNA from five entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 42, 369-375.
- Lin, S. Q., Wen, C. ve Broyles, S. S., 1992. The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase, Journal Virology, 66, 2717–2723.
- Lin, S. Q ve Broyles, S. S., 1994. Vaccinia protein kinase 2:a second essential serine/threonine protein kinase encoded by vaccinia virus, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91, 7653-7657.
- Liu, W. J., Yu, H. T., Peng, S. E., Chang, Y. S., Pien, H. W., Lin, C. J. Huang, C. J., Tsai, M. F., Huang, C. J. ve diğerleri, 2001. Cloning, Characterization, and Phylogenetic Analysis of a Shrimp White Spot Syndrome Virus Gene That Encodes a Protein Kinase, Virology, 289, 362-377.
- Martin, S. A., Paoletti, E. ve Moss, B., 1975. Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-)-methyltransferase from Vaccinia virions, Journal of Biological Chemistry, 250, 9322– 9329.
- Massung, R. F., Esposito, J. J., Liu, L. I., Qi, J., Utterback, T. R., Knight, J. C., Aubin, L., Yuran, T. E., Parsons, J. M. ve diğerleri, 1993. Potential virulence determinants in terminal regions of Variola smallpox virus genome, Nature, 366, 748-751.
- Merrihew, R. V., Clay, W. C., Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Dallas, W. S., Kost, T. A., 2001. Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. Journal of Virology, 75, 2, 903–909.
- Miller, L. K. ve Ball, L. A., 1998. The Insect Viruses, Plenum Press, New York, 413 s.
- Morrissey, J. H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity, Analytical Biochemistry, 117, 307-310.
- Moss, B., Rosenblum, E. W. ve Gershowitz, A., 1975. Characterization of a polyadenylate polymerase from Vaccinia virions, Journal of Biological Chemistry, 250, 4722–4729.
- Moss, B., 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development, Science, 252, 1662-1667.
- Moss, B., 2001. Poxviridae: The viruses and their replication, Fields Virology, David M. Knipe, Peter M. Howley Editörler, Cilt 2, 4. Baskı, Lippincott & Wilkins.
- Moyer, R. W., 1999. Encyclopedia of Virology, Entomopoxviruses (Poxviridae), R. G. Webster, A. Granoff, Editörler, Sf. 474-481, Academic Press, London.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. ve Summers, M. D., 1995. Editörler, Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Vienna & New York: Springer-Verlag.



- Neuhoff, V., Stamm, R. ve Eibl, H., 1985. Clear background and highly sensitive protein stain with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis, Electrophoresis, 6, 427-448.
- Palmer, C. P., Miller, D. P., Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M. ve King, L. A., 1995. Genetic modification of an entomopoxvirus: deletion of the spheroidin gene does not affect virus replication *in vitro*, Journal of General Virology, 76, 15-23.
- Pauws, E., van Kampen, A. H., van de Graaf, S. A., de Vijlder, J. J. ve Ris-Stalpers, C., 2001. Heterogeneity in polyadenylation cleavage sites in mammalian mRNA sequences: implications for SAGE analysis, Nucleic Acids Research, 29, 1690-1694.
- Ryan, K., Calvo, O. ve Manley, J. L., 2004. Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease, RNA, 10, 565-573.
- Rempel, R. E. ve Traktman P., 1992. Vaccinia virus B1 kinase: phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants and enzymatic characterization of recombinant proteins, Journal of Virology, 66, 4413-4426.
- Rosel, J. ve Moss, B., 1985. Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b, Journal of Virology, 56, 830-838.
- Roseman, N. A. ve Hruby, D. E., 1987. Nucleotide sequence and transcript organization of a region of the vaccinia virus genome which encodes a constitutively expressed gene required for DNA replication, Journal of Virology, 61, 1398-1406.
- Roux, P. P. ve Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions, Molecular Biology Reviews, 68, 320-344.
- Sagou, K., Imai, T., Sagara, H., Uema, M. ve Kawaguchi, Y., 2009. Regulation of the catalytic activity of Herpes Simplex Virus 1 protein kinase Us3 by autophosphorylation and its role in pathogenesis, Journal of Virology, 83, 5773-5783.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Boelens, W., Robanus-Maandag, E., Verbeek, J., Domen, J., van Beveren, C. ve Berns, A., 1986. The primary structure of the putative oncogene *pim-1* shows extensive homology with protein kinases, Cell, 32, 603-611.
- Senkevich, T. G., Bugert, J. J., Sisler, J. R., Koonin, E. V., Darai, G. ve Moss, B., 1996. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: Prediction of specific host response-evasion genes, Science, 273, 813-816.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2005. Entomopoksvirüsler ve biyolojik kontrol, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29, 4, 280-286.

- Shchelkunov, S. N., Marennikova, S. S., Blinov, V. M., Resenchuk, S. M., Totmenin, A. V., Chizhikov, V. E., Guturov, V. V., Safronov, P. F., Kurmanov, R. K. ve Sandaknchiev, L. S., 1993. Entire coding sequence of the variola virus, Doklady Akademi Nauk, 328, 629–632.
- Sriskantha, A., Osborne, R. J. ve Dall, D. J., 1997. Mapping of the *Heliothis armigera* entomopoxvirus (HaEPV) genome, and analysis of genes encoding the HaEPV spheroidin and nucleoside triphosphate phosphohydrolase I proteins, Journal of General Virology, 78, 3115-3123.
- Stanbridge, L. J., Dussupt, V. ve Maitland, N. J., 2003. Journal of Biomedical Biotechnology, 2, 79–91.
- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. *Insect Pathology*, Academic Pres, San Diego.
- Traktman, P., Anderson, M. K. ve Rempel, R. E., 1989. Vaccinia virus encodes an essential gene with strong homology to protein kinases, Journal of Biological Chemistry, 264, 21458-21461.
- URL-1. <http://www.thecanadianencyclopedia.com/index.cfm?PgNm=TCE&Params=A1ART0004013>, 21 Ekim 2010.
- URL-2. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>, 21 Ekim 2010.
- Vago, C., A new type of insect virus, 1963. Journal of Insect Pathology, 5, 275-276.
- Weir, J. P. ve Moss, B., 1984. Regulation of expression and nucleotide sequence of a late vaccinia virus gene, Journal of Virology, 51, 662-669.
- Winter, J., Hall, R. L., Moyer, R. W., 1995. The effect of inhibitors on the growth of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in *Lymantria dispar* (gypsy moth) cells. Virology, 211, 462–473.
- Yang, Z., Bruno, D. P., Martens, C. A., Porcella, S. F. ve Moss, B., 2010. Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 11513–11518.
- Yuen, L. ve Moss, B., 1987. Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of Vaccinia virus early genes, Biochemistry, 84, 6417-6421.

## ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Trabzon'un Yomra ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Çamlıca Mahallesi İlkokulunda tamamladı. Eğitimine verdiği arayı, 1995 yılında ortaokulu bitirme sınavlarına girip geçerek sona erdirdi. Aynı yıl, Açık Öğretim Lisesine başladı. Lise öğrenimini tamamladıktan sonra, 1998-1999 öğretim yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. Bu bölümden, 2002 yılında Fen Edebiyat Fakültesi birincisi olarak ve biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı, ancak yüksek lisans eğitimini tamamlamadan, 2004 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında doktora eğitimine geçiş yaptı. 2004-2010 yılları arasında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmakta olup iyi derecede İngilizce bilmektedir.

## BAŞLICA YAYINLARI

- Muratoğlu, H.**, Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2010. Transcriptional and structural analyses of *Amsacta moorei* entomopoxvirus protein kinase gene (AMV197, *pk*), *Annals of Microbiology*, 60, 523-530.
- Muratoğlu, H.**, Demirbağ, Z. ve Sezen, K. (Baskıda). An entomopathogenic bacterium, *Pseudomonas putida*, from *Leptinotarsa decemlineata*, *Turkish Journal of Biology*.
- Muratoğlu, H.**, Demirbağ, Z. ve Sezen, K. (Baskıda). The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col: Chrysomelidae), *Biology*.
- Muratoğlu, H.**, Demirbağ, Z. ve Sezen, K., 2011. Determination and pathogenicity of the bacterial flora associated to the Spruce Bark Beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), *Turkish Journal of Biology*, 35, 9-20.
- Muratoğlu, H.**, Katı, H., Demirbağ, Z. ve Sezen, K., 2009. High insecticidal activity of *Leclercia adecarboxylata* isolated from *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Chrysomelidae), *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7111-7115.

- Sezen, K., Katı, H., **Muratoğlu, H.**, Demirbağ, Z., 2010. Characterization and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from hazelnut pests and fields, Pest Management Science, 66, 543-548.
- Sezen, K., Katı, H., Nalçaciođlu, R., **Muratoğlu, H.** ve Demirbağ, Z., 2008. Identification and pathogenicity of bacteria from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* Fabricius (Coleoptera: Scolytidae), Annals of Microbiology, 58, 173-179.
- Sezen, K., Muratoğlu, H., Nalçaciođlu, R., Katı, H., Mert, D. ve Demirbağ, Z., 2008. Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 36, 77-84.