

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

REKOMBİNANT BÖCEK İRİDOVİRÜSÜNÜN OLUŞTURULMASI VE
KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Arzu ÖZGEN

EYLÜL 2015

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**REKOMBİNANT BÖCEK İRİDOVİRÜSÜNÜN OLUŞTURULMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Arzu ÖZGEN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

DOKTOR (BİYOLOJİ)

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18 / 08 / 2015

Tezin Savunma Tarihi : 15 / 09 / 2015

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon 2015

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Rekombinant Böcek İridovirüsünün Oluşturulması ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “doktora” tezi olarak hazırlanmıştır. Tez kapsamında bir rekombinant invertebrate iridovirüs oluşturulmuş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Tez sonucunda oluşturulan bilgiler daha ileri çalışmalara temel teşkil etme niteliğindedir.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan tez izleme jürisi üyelerim sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji grubu hocalarıma, tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından faydalanmama imkan veren Biyoloji Bölüm Başkanlığına, laboratuvar arkadaşlarımdan Zeynep ERBAŞ ve Aydın YEŞİLYURT’a ve bu süreç esnasında bana gösterdikleri engin sabırdan dolayı aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince gerçekleştirdiğim çalışmalardaki 113Z748 numaralı proje kapsamındaki desteklerinden dolayı TÜBİTAK’a teşekkür ediyorum.

Arzu ÖZGEN
Trabzon 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Rekombinant Böcek İridovirsnn Oluşturulması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 18/08/2015

Arzu ÖZGEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. İridovirüsler	3
1.2.1. İridovirüslerin Keşfi	3
1.2.2. İridovirüslerin Sistematiği	4
1.2.3. <i>Iridoviridae</i> Familyasının Özellikleri.....	8
1.2.4. İridovirüslerde Genom Organizasyonu ve Replikasyonu.....	9
1.2.5. <i>Iridovirus</i> Cinsi.....	12
1.2.5.1. <i>Chilo</i> Iridescent Virüs (CIV)	13
1.2.5.1.1. Virion Yapısı.....	14
1.2.5.1.2. Transkripsiyonel Regülasyon	17
1.2.5.1.3. Konak Çeşitliliği ve Patolojisi.....	18
1.2.5.1.4. Rekombinant CIV Oluşturulması ve Önemi	19
1.3. Apoptosis	20
1.3.1. Apoptosis İnhibitör Genleri	22
1.4. Tezin Amacı	23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	25
2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini	25
2.2. Virüsün Larvada ve Hücre Kültüründe Çoğaltılması ve Saflaştırılması ...	25
2.3. Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
2.4. Biyoinformatik Analiz	27
2.5. Transkripsiyonel Analiz	27

2.5.1.	Toplam RNA İzolasyonu.....	27
2.5.2.	Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	28
2.6.	Rekombinant Virüs Oluşturulması	28
2.6.1.	Transfer Vektörünün Hazırlanması	29
2.6.1.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
2.6.1.2.	Elektrokompotent Bakteri Hücrelerinin Hazırlanması	31
2.6.1.3.	Elektrotransformasyon.....	32
2.6.1.4.	Plazmid DNA İzolasyonu ve Klonların Seçimi.....	32
2.6.1.5.	Transfer Vektörünü Oluşturacak DNA Fragmentlerinin Birleştirilmesi...	34
2.7.	Transfeksiyon; Homolog Rekombinasyonun Sağlanması.....	35
2.8.	Plak Deneyi	36
2.9.	Rekombinant Virüsün Saflığının Araştırılması	37
2.10.	Rekombinant Virüsün Çoğaltılması ve Stok Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	37
2.11.	Rekombinant Virüsün Yaban Tip Virüs ile Karşılaştırılması	38
2.11.1.	Tek-Basamak Büyüme Eğrilerinin Karşılaştırılması.....	38
2.11.2.	Restriksiyon Profillerinin Karşılaştırılması	39
2.11.3.	Toplam Protein Profillerinin Karşılaştırılması	39
2.11.4.	Western Blot Analizi	39
2.11.5.	DNA Replikasyonlarının Slot-Blot Hibridizasyonu ile Karşılaştırılması .	40
2.12.	<i>Galleria mellonella</i> Larvalarının Rekombinant CIV ile Enfekte Edilmesi	42
3.	BULGULAR	43
3.1.	Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyonunun Tayini.....	43
3.2.	CIV 157L Geninin Biyoinformatik Analizi	44
3.3.	CIV 157L Geninin Transkripsiyonel Analizi	44
3.4.	Rekombinant <i>Chilo</i> Iridescent Virüs'ün Oluşturulması	45
3.4.1.	Transfer Vektörünün Oluşturulması.....	45
3.4.2.	Transfeksiyon: CIV157L Geni Çıkartılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması	48
3.4.3.	Plak Deneyi ile Rekombinant CIV'nin Seçimi ve Saflaştırılması.....	49
3.4.4.	Rekombinant Virüsün Saflığının PCR Analiziyle Doğrulanması	50
3.4.5.	Rekombinant Virüsün Yaban Tip Virüs ile Karşılaştırılması	51
3.4.5.1.	Tek-Basamaklı Büyüme Eğrilerinin Karşılaştırılması	51

3.4.5.2.	Viral DNA'ların Restriksiyon Profillerinin Karşılaştırılması	52
3.4.5.3.	Toplam Protein Profillerinin Karşılaştırılması	52
3.4.5.4.	Western Blot Analizi	53
3.4.5.5.	Viral DNA Replikasyonlarının Slot-Blot Hibridizasyonu ile Karşılaştırılması.....	54
3.4.6.	<i>Galleria mellonella</i> Larvalarının Rekombinant CIV ile Enfekte Edilmesi	55
4.	TARTIŞMA.....	56
5.	SONUÇLAR.....	60
6.	ÖNERİLER	61
7.	KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

REKOMBİNANT BÖCEK İRIDOVİRÜSÜNÜN OLUŞTURULMASI VE
KARAKTERİZASYONU

Arzu ÖZGEN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
2015, 74 sayfa

Chilo iridescent virus (CIV), zararlı böcekler arasında oldukça geniş konak spektrumuna sahip olan *Iridoviridae* familyasına ait bir böcek virüsüdür. DNA genomunun dizin analizi gerçekleştirilmiş ve genom uzunluğu 212,482 nükleotit olarak belirlenmiştir. Hücre kültürüne uyarlanabilmiş ve çok sayıda hücre suşunda düşük seviyede de olsa replike olduğu belirlenmiştir. Virüs genomuna yabancı bir geni yerleştirebilmek için genomda bir yer açılması yani genomdan mevcut bir genin/bölgenin çıkarılması gerekmektedir. Ancak genomdan çıkarılacak genin yokluğu virüs replikasyonunu veya virüse ait önemli diğer bir mekanizmayı etkilememelidir. Biyoinformatik analizlere göre apoptozis inhibitör genleri arasında bulunmasına rağmen ORF 157L'nin fonksiyonel olmadığı belirlenmiştir. Bu tezde, ilk defa bir rekombinant iridovirüsün oluşturulması ve karakterize edilmesi gerçekleştirilmiştir. Homolog rekombinasyon ile oluşturulan rekombinant (rCIVΔ157L-*gfp*) iridovirüs CIV mcp pormotoru altında bir raportör gen olan yeşil floresan proteini geni (*gfp*)'ni başarılı bir şekilde ifade etmiştir. 157L geni yerine yerleştirilen *gfp*'nin virüs replikasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Rekombinant CIV ile enfeksiyon esnasında viral replikasyon ve üretim yaban tip CIV ile benzer bir durum oluşturmuştur. Sonuç olarak CIV 157L gen bölgesinin biyolojik mücadele ve biyoteknolojik amaçla yabancı DNA'ların yerleştirilebileceği bir bölge olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: *Chilo iridescent* virüs, yeşil floresan proteini, rekombinant virüs, 157L, apoptozis

PhD. Thesis

SUMMARY

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT
INSECT IRIDOVIRUS

Arzu ÖZGEN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
2015, 74 page

Chilo iridescent virus (CIV) is an insect virus belongs to the *Iridoviridae* family and has wide host spectrum among pest insects. Sequence analysis of the DNA genome was carried out and length of the genome was determined as 212,482 base pair. CIV was able to be adapted to the cell culture and determined to be replicated in a number of cell strains though at low levels. For placing a foreign gene into virus genome a suitable place should be opened means a gene or region must be deleted from the genome. However deleting a gene from the genome should not effect the viral replication or any other mechanism of the virus. Based on bioinformatics analysis, ORF 157 was determined to be non-functional although it exist among apoptosis inhibitor gene. In this thesis, construction and characterization of a recombinant insect iridovirus is generated first time. This recombinant (rCIV Δ 157L-*gfp*) generated by homologous recombination in cell culture successfully expressed the reporter gene *gfp* (green fluorescent protein gene) under control of the CIV *mcp* promoter at the 157L locus. This study also showed that virus replication was not affected by replacing the 157L gene with *gfp*. Virus replication and production during rCIV Δ 157L-*gfp* infection was similar to that of wt-CIV. Consequently, it can be said that the CIV 157L locus can be used as a site for insertion of foreign DNAs for insect biocontrol and biotechnological.

Key words: *Chilo* iridescent virus, green fluorescent protein, recombinant virus, 157L, apoptosis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Ağır iridovirüs enfeksiyonunda tipik renk oluşumu.....	3
Şekil 2.	İridovirüslerin filogenetik ilişkileri	4
Şekil 3.	İridovirüslerde viral yapının şematik olarak gösterilişi.....	8
Şekil 4.	<i>European catfish</i> virüs ile enfekte fathead minnow hücrelerinin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilmiş görüntüsü.....	9
Şekil 5.	<i>Frog virüs-3</i> DNA'sının replikasyon modeli.....	11
Şekil 6.	CIV ile enfekte BRL-AG-3A hücrelerinin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.....	14
Şekil 7.	<i>Chilo iridescent</i> virüs'deki trimerik kapsomerlerin organizasyonu.....	15
Şekil 8.	<i>Chilo iridescent</i> virüs'ün 3Å çözünürlükte 3 boyutlu görüntüsü.	16
Şekil 9.	Apoptotik hücrelerde gözlemlenen morfolojik değişimlerin şematize edilmiş hali	21
Şekil 10.	Apoptosis inhibitör protein (IAP) ailesi üyelerinin moleküler yapısı.....	23
Şekil 11.	Transfer vektörü ve viral DNA arasındaki homolog rekombinasyon olayı	36
Şekil 12.	<i>Chilo iridescent</i> virüs'ün (CIV) BRL-AG-3A hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etkiler	43
Şekil 13.	ORF 157L'nin biyoinformatik analizi.....	44
Şekil 14.	CIV157L muhtemel apoptosis inhibitör geninin transkripti.	45
Şekil 15.	GFP içeren rekombinant transfer vektörünün oluşturulması için CIV157L'ye ait aşağı ve yukarı bölgenin PCR ile çoğaltılmış jel görüntüsü	46
Şekil 16.	GFP içeren rekombinant transfer vektörünün oluşturulması için majör kapsid protein promotörü ve yeşil floresan proteini (gfp)'ne ait jel görüntüsü.	46
Şekil 17.	Transfer vektör oluşturmak için gerekli olan DNA dizilerinin klonlama vektörlerinden restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkarılması	47
Şekil 18.	Yapılandırılan transfer vektörün klonlama sırasına göre restriksiyon enzimleri ile doğrulanması.	48
Şekil 19.	CIV ile enfekte BRL-AG-3A hücrelerine transfer vektörünün transfeksiyonu	49

Şekil 20. rCIV- Δ 157L- <i>gfp</i> ile BRL-AG-3A hücrelerinin enfeksiyonu sonrasında oluşan plak görüntüsü.....	49
Şekil 21. Saf rekombinant CIV (rCIV- Δ 157L- <i>gfp</i>) oluşumunun P1/P4 ve P9/P10 primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle doğrulanması	50
Şekil 22. Yaban tip CIV ve rCIV- Δ 157L- <i>gfp</i> 'ye ait tek basamaklı büyüme eğrisi	51
Şekil 23. Yaban tip CIV ve rCIV- Δ 157L- <i>gfp</i> 'ye ait viral DNA'nın restriksiyon analizi.....	52
Şekil 24. Yaban tip CIV ve rCIV- Δ 157L- <i>gfp</i> 'ye ait toplam protein profili	53
Şekil 25. rCIV- Δ 157L- <i>gfp</i> 'de <i>gfp</i> (28 kDa) üretiminin Western blot analizi ile gösterilmesi.	54
Şekil 26. Slot-blot hibridizasyonu ile DNA replikasyonu	54
Şekil 27. Rekombinant CIV ile enfekte edilen <i>Galleria mellonella</i> larvaları floresan mikrokobu altında görüntünmesi.	55

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Iridoviridae</i> familyasının cinslerini birbirinden ayıran özellikler	6
Tablo 2. Tüm genom dizin analizi yapılmış iridovirüsler	7
Tablo 3. <i>Iridovirus</i> cinsine ait türler	12
Tablo 4. Apoptozis ve Genler	22
Tablo 5. Çalışmada kullanılan primerler	29
Tablo 6. PCR reaksiyon karışımı ve PCR koşulları.....	30
Tablo 7. Ligasyon Reaksiyon Karışımı	31
Tablo 8. Restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu	33

SEMBOLLER DİZİNİ

cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	: İki kere damıtılmış su
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit kDa : Kilodalton
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ORF	: Açık okuma zinciri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: H iyon konsantrasyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
vd.	: ve diğerleri
°C	: Santigrat derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlı olarak kabul edilebilmenin temel kriterlerini tam olarak karşılamadıkları için virüsler cansız varlıklar olarak kabul edilirler. Bunun yanında virüsler canlı varlıklarla önemli olan bazı özellikleri de paylaşırlar. Virüsler de nükleik asitler (DNA veya RNA) ve proteinler gibi canlılarda bulunan bazı ortak bileşiklere sahiptirler ve konak hücreyi kullanarak sayılarını arttırabilirler. Yine de virüsler yaşamlarını sürdürebilmeleri için canlı varlıklara bağımlı olduklarından zorunlu hücre içi patojenlerdir. Virüsler insan da dahil olmak üzere mikroorganizmalardan bitki ve hayvanlara kadar tüm canlı varlıklarda hastalığa ve ölüme sebep olurlar. Ancak virüsler bazı durumlarda insanlık için faydalıdır ve buna iyi bir örnek böcek virüsleridir. Böcekler pek çok sayıda virüs tarafından enfekte edilirler ve bu enfeksiyonlar onların ölümlerine sebep olabilir. Pek çok böcek türü insanlık için önemli olan tarımsal ve endüstriyel ürünlere zarar verdiği için pest (zararlı böcek) olarak adlandırılır. Bu zararlı böceklerin pek çoğu viral enfeksiyonlara karşı oldukça hassastırlar ve bu virüsler biyolojik mücadele ajanları olarak kullanılırlar. Böcek virüsleri çok büyük bir çeşitliliğe sahip olmalarına rağmen böcek popülasyonlarında en çok göze çarpanları bakulovirüs, askovirüs, cypovirüs, entomopoksvirüs, iridovirüs, ve polydnavirüsdür. Bu entomopatojenik virüsler potansiyel mücadele ajanları olarak kullanılmakta veya düşünülmektedirler (Ibarra vd., 2009). Ayrıca, virüsler moleküler ve hücre biyolojide hücrelerin işlevlerini anlamak için kullanılırlar (Lodish vd., 2008). Örneğin genetikte, DNA'nın replikasyonu, transkripsiyon, RNA'nın işlenmesi, translasyon, proteinlerin taşınması ve immünoloji gibi temel hücre mekanizmalarının anlaşılmasında virüslerin büyük katkısı olmuştur. Genetikçiler çeşitli hücrelerin içine ya da genomuna yabancı genleri sokmak için virüsleri taşıyıcı araç (vektör) olarak kullanırlar. Bu, hücrenin yabancı bir bileşiği üretmesini sağlamak veya bir genin genomda yer almasının etkisinin anlaşılmasında kullanılan yararlı bir yöntemdir. Bu yöntem kanser tedavisi ve gen terapisinde de kullanılır (Matsuzaki vd., 2005). Endüstriyel anlamda virüsler aşı, antikor ve tedavi amaçlı birçok proteinin üretilmesinde de kullanılmaktadırlar (Gleba vd., 2011).

Son zamanlarda virüsler nanoteknoloji alanında da umut vaat etmektedir. Organik nanopartiküller olarak kabul edilen virüsler konakçı hücrelerin yüzeyine tutunmak ve hücre içerisine girmek için özel tasarlanmış yapılar taşır (Fischlechner vd., 2007). Virüsler boyut, şekil ve iyi tanımlanmış kimyasal yapıları ile malzeme bilimi ve elektronik alanlarında nano materyallerin düzenlenmesi için şablon olarak kullanılmaktadır (Soto vd., 2006).

Önemli bir grubu oluşturan İridovirüsler böcek, balık, amfibi ve reptilleri içine alan omurgasızları ve poikilotermik omurgalıları enfekte eden çift zincir DNA genomuna sahip virüslerdir (Goorha vd., 1984; Williams vd., 2005). *Chilo iridescent* virüs (CIV) *Iridoviridae* familyasının *Iridovirus* cinsine ait bir böcek virüsüdür. CIV aynı zamanda “*Invertebrate iridescent virus 6*” olarak da bilinir. Zararlı böceklerde enfeksiyona neden olan CIV, *Iridovirus* cinsinin tip türüdür. Bu tür ülkemizde özellikle çay, pamuk ve fındıkta zarara neden olan böceklere karşı geliştirilebilir potansiyel biyokontrol ajanlarının başında gelmektedir. CIV’nin potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak görülmesine rağmen en önemli dezavantajı enfekte ettiği konağı öldürme hızının yavaş olmasıdır (Williams vd., 2005). Bu durum virüsün biyopestisit olarak kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır.

CIV’ye ait moleküler bilgiler genomik, transkriptomik ve proteomik temelli çalışmalar olup oldukça sınırlıdır (D’Costa vd., 2004; Nalçacıoğlu vd., 2007; Dizman vd., 2012; Bigot vd., 2013). CIV’nin moleküler biyolojisi hakkında elde edilecek daha çok bilgi iridovirüslerin böcekler üzerindeki patolojisini anlamamıza yardımcı olacaktır. Viral bir genin *in-vivo* olarak virüsün replikasyonuna ve patogenesisine olan katkısını belirlemek için bu genin virüs genomundan çıkarılması (knockout virüs oluşturulması) moleküler biyolojideki en önemli stratejidir (Guangchun vd., 2011). Bu işlem için en kolay yaklaşım heterolog işaret genin virüs genomuna sokulmasıdır. Yeşil floresan proteini (GFP) gibi floresan proteinleri ifade eden rekombinant virüslerin oluşturulması virüs-konak etkileşimleri (Hollinshead vd., 2001; de Oliveira vd., 2008), virüs partiküllerinin hareketliliği ve yayılması (Doceul vd., 2010) dahil olmak üzere virüs enfeksiyonunu ve patogenezi anlamayı büyük ölçüde kolaylaştırmıştır (Ward ve Moss, 2001; Husain ve Moss, 2003; Greber ve Way, 2006; Hernaez vd., 2006; Brandenburg ve Zhuang, 2007; Ohkawa vd., 2010).

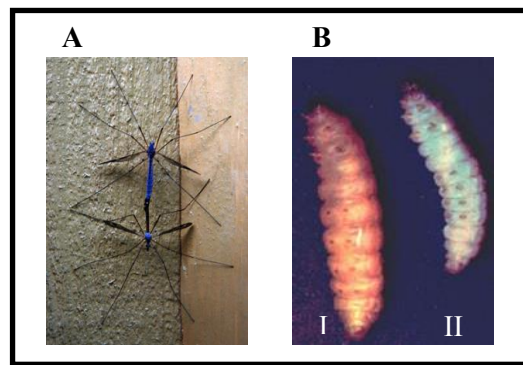
Bu tez çalışmasında CIV’nin moleküler yapısının aydınlatılması, virüs replikasyonundaki rolünün anlaşılması ve biyoteknolojik kullanımına katkılar sağlaması amacıyla, virüse ait açık okuma zincirlerinden (ORF) biri olan 157L geni virüs

genomundan homolog rekombinasyon ile silinmiştir. Oluşturulan rekombinant CIV, *Anthonomus grandis* (BRL-AG-3A) hücrelerinde saflaştırılmış ve replikasyonu çalışılmıştır.

1.2. İridovirüsler

1.2.1. İridovirüslerin Keşfi

İridovirüsler ilk olarak 1954 yılında İngiltere’de Cambridge Üniversitesi mensubu olan Claude F. Rivers adlı bilim adamının yaptığı bir arazi çalışması sırasında bazı *Tipula paludosa* larvalarının epidermisinin hemen altında parlak mavi bir renk oluşumunun gözlenmesi ile keşfedilmiştir (Şekil 1). Daha sonra Nick Xeros adlı başka bir araştırmacı bu larvalardan ilk iridovirüsü (*Tipula paludosa* iridovirus; IV1) izole etmiştir. Böylece, Xeros tarafından 1954 yılında iridovirüsler ile ilgili ilk yayın Nature dergisinde “*Tipula paludosa* larvasında ikinci bir virüs hastalığı” başlığı ile gerçekleştirilmiştir (Xeros, 1954). Ardından başka böcek türlerinde de belirgin iridovirüs enfeksiyonları tespit edilmiştir. İridovirüs enfeksiyonlarının tespit edildiği böcekler arasında önemli bazı zararlıların bulunması, bu virüslerin potansiyel biyolojik kontrol materyalleri olarak kullanılabileceklerini düşündürmüştür.

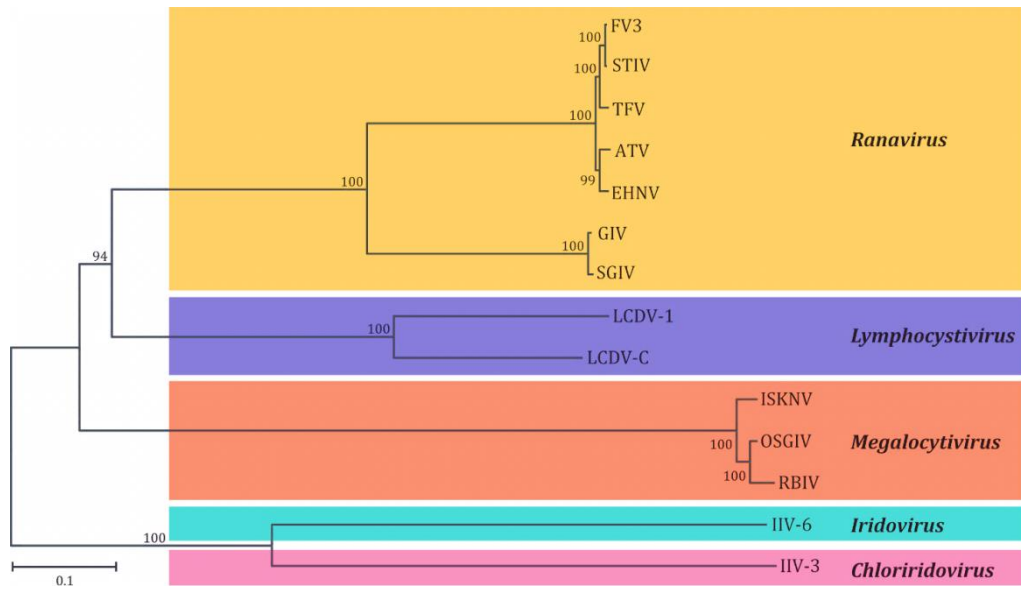


Şekil 1. Ağır iridovirüs enfeksiyonunda tipik renk oluşumu. A: Çayır sineklerinde iridovirus enfeksiyonu sonucu mavileşmiş vücut rengi (Boumans ve Aarnes, 2010), B: *Invertebrate iridescent* virüs enfeksiyonu. I: *Invertebrate iridescent* virüs ile enfekte olmamış *Galleria mellanolla* larvası II: *Invertebrate iridescent* virüs ile enfekte olmuş *G. mellanolla* larvasında ağır enfeksiyonun sebep olduğu mavi-yeşil vücut rengi (URL-1).

1.2.2. İridovirüslerin Sistematığı

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

Virüslerin sınıflandırılmasını yapan ve uluslararası bir kuruluş olan “Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi” (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından yapılan son açıklamalara göre bugün *Iridoviridae* familyası altında *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* olmak üzere 5 cins bulunmaktadır (King vd., 2012) (Tablo 1). Bu sınıflandırma virion parçacığının boyutuna, konak spektrumuna, hastalığın DNA metiltransferazın varlığından veya yokluğundan dolayı meydana gelmesine, genomun GC içeriğine ve majör kapsid proteininin filogenetik analizine göre yapılmıştır. İridovirüslerde ortak olan 26 genin kullanılarak yapıldığı filogenetik analiz familyada bulunan 5 cinsin birbirlerinden nasıl ayrıldığını ve birbirleri ile olan yakınlık derecelerini net bir şekilde göstermektedir (Şekil 2).



Şekil 2. İridovirüslerin filogenetik ilişkileri. *Iridoviridae* familyasının cinsleri arasındaki ilişki, 26 ortak gen dizisine göre analiz edilmiştir (King vd., 2012).

Iridoviridae familyasının üyeleri (iridovirüsler) omurgasızları (birincil olarak böcekler) ve soğukkanlı omurgalıları (balıklar, kurbağalar ve sürüngenler) enfekte etmektedir. Bunun yanısıra sucul kabuklu hayvanları (crustacea) ve yumuşakçaları da enfekte ettikleri tahmin edilmektedir (Williams vd., 2005). Enfekte ettikleri konaklara ve genomik DNA'nın metilasyon seviyesine göre 5 iridovirüs cinsi genel olarak omurgasız ve omurgalıları enfekte edenler şeklinde iki gruba ayrılır (Chinchar vd., 2008). *Iridovirus* ve *Chloroiridovirus* cinsleri omurgasızları (böcekler, crustacealar) enfekte eder ve genomik DNA metillenmesi yoktur. *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* ve *Megalocytivirus* cinsleri ise balıklar, kurbağalar ve sürüngenler gibi soğukkanlı omurgalı hayvanları enfekte eder ve virüs genomunda bulunan bir DNA metiltransferaz tarafından sitozin nükleotitlerinin yaklaşık %25'i metillenir (Chinchar vd., 2008). Ancak bir ranavirus türü olan Singapore grouper iridovirüs (SGIV) DNA metiltransferaz enzimi kodlamadığı için kendi DNA'sını metilleyemez (Song vd., 2004). Cinslerin ayırımında konak spektrumu ve genomun metilasyonu dışında farklı kriterler de kullanılmaktadır. Bunlar genomun GC içeriği, seroloji, virion morfolojisi, partikül büyüklüğü, histopatolojisi ve hastalığın klinik belirtiler olarak sıralanabilir. En son yapılan majör kapsid proteini ve diğer viral proteinlerin aminoasit dizilerinin analizi de bu sistematik ayırımı doğrulamaktadır ve bir cins içindeki türlerin yüksek seviyede ortak özellikler paylaştıklarına işaret etmektedir. Örneğin, aynı viral cinsin üyeleri majör kapsid proteinlerinin aminoasit dizilimi seviyesinde %70'den daha fazla benzerlik gösterirken farklı cinslere ait türler arasındaki bu benzerlik %50'den daha az olmaktadır (Do vd., 2005a, 2005b). *Iridoviridae* familyasında ki cinsleri birbirinden ayıran özellikler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *Iridoviridae* familyasının cinslerini birbirinden ayıran özellikler

Familiya	<i>Iridoviridae</i>				
Cinsler	<i>Iridovirus</i>	<i>Chloriridovirus</i>	<i>Lymphocystivirus</i>	<i>Ranavirus</i>	<i>Megalocytivirus</i>
Genom Büyüklüğü	197-220 kbp	≈135 kbp	103-186 kbp	≈105 kbp	105-118 kbp
DNA metilasyonu	yok	yok	var	var	var
GC içeriği	%27	%54	%27-29	%49-55	%53-55
Virion Büyüklüğü	120-130 nm	≈180 nm	200-300 nm	≈150 nm	≈ 150 nm
Enfekte ettiği konak türleri	Böcekler Crustacealar Muhtemelen yumuşakçalar izopodlar	Sivrisinekler İki kanatlılar (Diptera)	Deniz ve tatlı su balıkları Yassı Balıklar	Soğuk Kanlı Omurgalılar (Kurbağalar Kaplumbağalar Sürüngenler Kemikli Balıklar)	Deniz balıkları

Her ne kadar iridovirüs cinslerinin sistematığı basit görünse de aynı cinsin üyeleri arasındaki majör kapsid proteinleri ve diğer korunmuş proteinlerin dizi analizi benzerliklerinin yüksek oranda oluşu viral türlerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Örneğin birkaç ranavirüs türü arasında majör kapsid proteini aminoasit benzerliği %90'ın üzerindedir. Bu durumda viral türlerin ayırt edilmesinde viral proteinlerin profilleri, DNA restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (RFLP), enfekte ettiği konak türleri, klinik bulgular ve nükleotit ve aminoasit dizi analizlerindeki farklılıklar gibi kriterler göz önünde bulundurulmaktadır (Mao vd., 1997; Chinchar ve Mao, 2000; Chinchar vd., 2005). İridovirüs izolatlarının birçoğunun DNA dizi analizinin yapılmamış olması izolatların sınıflandırılmalarını zorlaştırmaktaydı; fakat son zamanlarda birçok iridovirüsün tüm genom dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi yapılan iridovirüsler Tablo 2'de verilmiştir.

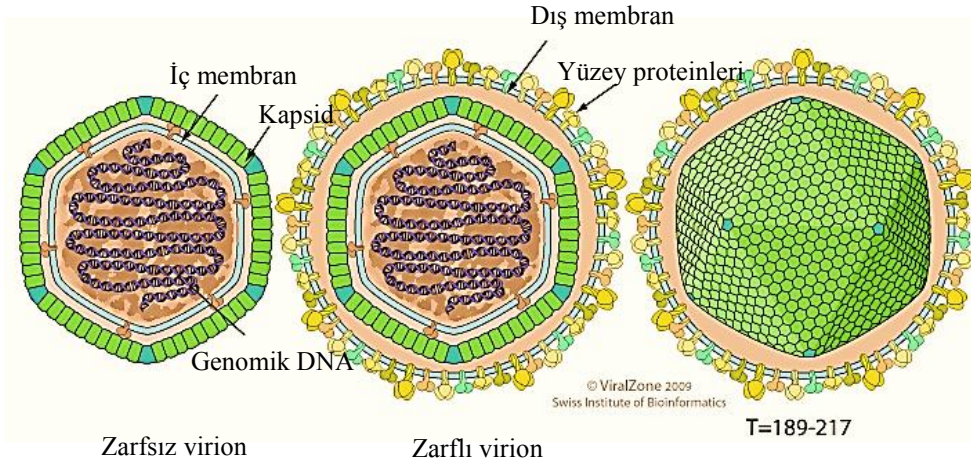
Tablo 2. Tüm genomu dizin analizi yapılmış iridovirüsler.

Virüs Cinsi	Türler	Genom Büyük- lüğü (bp)	ORF Sayısı	%G+C	GenBank Erişim Numarası	Kaynak
<i>Iridovirus</i>	<u>IIV-6*</u>	212,482	463	28,63	AF303741	Jakob vd., 2001
	IIV-9	205,791	193	30,9	GQ918152	Wong vd., 2011
	IIV-22	197,700	167	28	NC_023615	Piegu vd., 2013
	IIV-22A	196,455	174	55,204		Piegu vd., 2014
	IIV-25	204,815	177	30,3	NC_023613	Piegu vd., 2014b
	IIV-30	198,533	176	28,1	HF920636	Piegu vd., 2014a
	IIV-31	220,222	203	35,09	HF920637	Piegu vd., 2014c
<i>Chloriridovirus</i>	IIV-3*	191,132	126	47,9	DQ643392	Delhon vd., 2006
	AMIV	163,023	148	39		Huang vd., 2015
<i>Lymphocystivirus</i>	<u>LCDV-1*</u>	102,653	110	29,1	L63545	Tidona ve Darai, 1997
	LCDV-C	186,250	239	27,2	AY380826	Zhang vd., 2004
<i>Ranavirus</i>	<u>TFV</u>	105,057	105	55,01	AF389451	He vd., 2002
	<u>ATV</u>	106,332	95	54	AY150217	Jancovich vd., 2003
	<u>FV3*</u>	105,903	99	55,1	AY548484	Tan vd., 2004
	SGIV	140,131	162	48,6	AY521625	Song vd., 2004
	GIV	139,793	120	49	AY666015	Tsai vd., 2005
	STIV	105,890	105	55,1	EU627010	Huang vd., 2009
	<u>EHNV</u>	127,011	100	54	FJ433873	Jancovich vd., 2010
	<u>ESV</u>	127732	136	54,2	JQ724856	Mavian vd., 2012
	RGV	105,791	106	55	JQ654586	Lei vd., 2012
<i>Megalocytivirus</i>	LYCIV	111,767	-	54	AY779031	Yayınlanmamış
	<u>ISKNV</u>	111,362	125	54,8	AF371960	He vd., 2001
	RBIV	112,080	118	53	AY532606	Do vd., 2004
	RSIV*	112,414	93	53	AB104413	Nakajima ve Kunita, 2005
	OSGIV	112,636	116	54	AY894343	Lu vd., 2005
	TRBIV	110,104	115	55	GO273492	Shi vd., 2010

Altı çizili yazılan virüs isimleri ICTV tarafından tanınan virüsleri belirtmektedir. * İlgili cinse ait tip türü göstermektedir. IIV-6, Invertebrate iridovirüs tip 6; IIV-9, Invertebrate iridovirüs tip 9; IIV-22, Invertebrate iridovirüs tip 22; IIV-22-A, Invertebrate iridovirus; IIV-25, Invertebrate iridovirüs tip 25; IIV-30, Invertebrate iridovirüs tip 30; IIV-31, Invertebrate iridovirüs tip 31; IIV-3, Invertebrate iridovirüs tip 3; AMIV, Anopheles minimus iridovirüs; LCDV-1, Lymphocystis disease virüs 1; LCDV-C, Lymphocystis disease virüs-China; TFV, tiger frog virüs; ATV, Ambystoma tigrinum virüs; FV3, Frog virüs 3; SGIV, Singapore grouper iridovirüs; GIV, grouper iridovirüs; STIV, soft-shelled turtle iridovirüs; EHNV, Epizootic haematopoietic necrosis virüs; ESV, European sheatfish ranavirüs; RGV, Rana grylio iridovirüs; LYCIV, large yellow croaker iridovirüs; ISKNV, Infectious spleen and kidney necrosis virüs; RBIV, rock bream iridovirüs; RSIV, red seabream iridovirüs; OSGIV, orange spotted grouper iridovirüs; TRBIV, turbot reddish body iridovirüs.

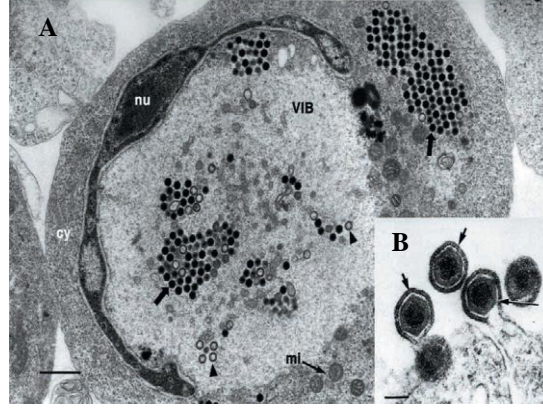
1.2.3. *Iridoviridae* Familyasının Özellikleri

Morfolojik olarak 120-200 nm çapında ikozahedral simetride lineer, çift iplikli tek DNA genomuna sahip olan iridovirüsler ayrıca büyük DNA virüslerindedirler. İridovirüs ailesi üyeleri 140 kbp (Ranavirüs cinsi) ile 200 kbp (İridovirüs cinsi) arasında değişen çeşitli boyutlarda ki viral genoma sahiptirler. İridovirüslerin kapsid ile viral öz arasında uzanan lipid bir membrana sahip olmaları onları diğer DNA virüslerinden ayıran bir özelliktir (Şekil 3). Virüs partikülleri hücreden çıkış şekline göre zarflı (hücre membranından tomurcuklanma ile salınım) veya çıplak (liziz ile salınım) olabilir (Chinchar vd., 2008, Jankovich vd., 2012).



Şekil 3. İridovirüslerde viral yapının şematik olarak gösterilişi (ViralZone, 2009).

İridovirüslerin enfeksiyonu sonucu sitoplazmada oldukça yoğun bir virüs toplanma bölgesi görülür. Bu bölge (virojenik stroma) virüs proteinleri ve DNA'larının en yoğun olduğu, virüs partiküllerinin bir araya toplandığı yani virüs inşasının gerçekleştiği bölgedir. İkozahedral partiküller sitoplazmada çoğunlukla 120-200 nm (nanometre) çapında bir dizi olacak şekilde sıralanır. Bu dizi "parakristal dizi" olarak adlandırılır (Şekil 4) ve iridovirüsleri diğer DNA virüslerinden ayıran önemli bir özelliktir.



Şekil 4. A: *European catfish* virüs ile enfekte fathead minnow hücrelerinin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilmiş görüntüsü. Nükleus (nu); virüs inklüzyon cisimcikleri (VIB); zarfsız virüs parçacıklarının oluşturmuş olduğu parakristalin diziler (ok ile gösterilmiştir); sitoplazma (cy); mitokondri (mi); Bar: 1 μ m (Hyatt vd., 2000). B: *Frog virus 3* (FV-3) parçacıklarının plazma membranından tomurcuklanmasının transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilmiş görüntüsü; oklar viral zarfı göstermektedir; Bar: 200 nm (Devauchelle vd., 1985).

İridovirüs ailesi mensupları halkasal permutasyon (circularly permuted) ve genomun uç kısımlarında dizi tekrarları (terminal redundancy) bulunduran bir genoma sahip olmaları nedeniyle hayvan virüsleri arasında benzersizdirler (Goorha ve Murti, 1982; Delius vd., 1984). Örneğin, alfabetik harf dizilimi viral genom dizilimini temsil ettiğinde her bir virüsün genom dizilişi **ABCDE ...UVWXYZABCDE, CDEFG ...WXYZABCDEF, FGHIJ ...ZABCEDFGHIJ** şeklinde olacaktır (Chinchar vd., 2008). Bu nedenle aynı cins üyeleri arasında gen sırası oldukça değişken olabilir.

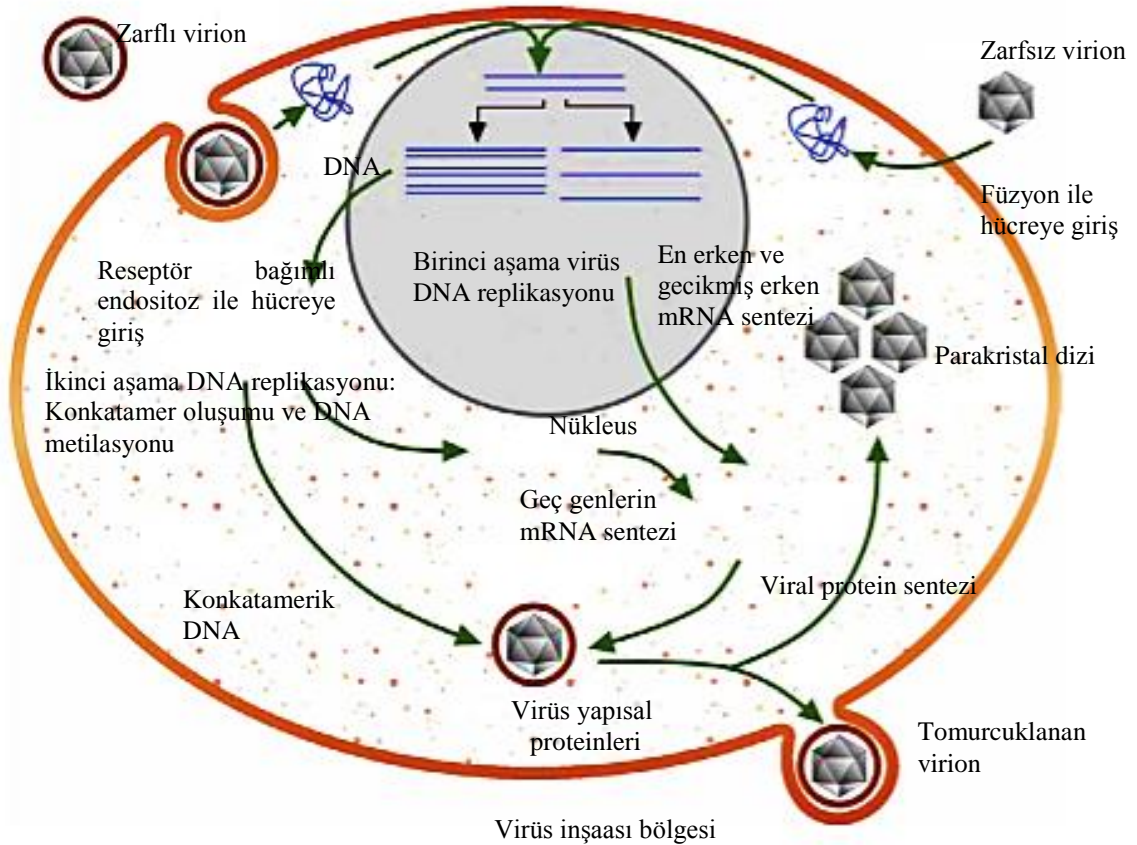
1.2.4. İridovirüslerde Genom Organizasyonu ve Replikasyon

FV3 (Frog virüs-3, *Ranavirus* cinsinin tip türü) dışındaki birçok iridovirüs grubu incelenmiş olmasına rağmen bu çalışmalardan bir kaçı replikasyon mekanizması üzerine odaklanmıştır. Dolayısıyla iridovirüs replikasyonu hakkındaki bildiklerimizin çoğu FV3 virüsü ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir ve ailenin diğer üyelerinde de bu replikasyon stratejisinin kullanıldığı varsayılmaktadır. Bu stratejinin *Ranavirus* cinsi

üyeleri arasında doğru olduğu kabul edilse de diğer cins üyeleri üzerinde de çalışmalar yapılarak bu bilgiler pekiştirilmelidir (Chinchar vd., 2008).

İridovirüslerde hem çıplak hem de zarflı virionlar enfeksiyon oluşturduğu için, en az iki farklı konak reseptör proteini bulunmaktadır. Konak hücreye bağlandıktan sonra zarflı virionlar reseptör aracılı endositoz ile hücreye girerken çıplak virionlar ise plazma membranına füzyon yaparak hücreye girerler (Williams vd., 2005). Kapsidin soyulmasının ardından, virüse ait DNA özü (elektron mikroskopunda yoğun görünen virüsün en iç kısmını oluşturan, proteinlerle ilişkili DNA), DNA sentezinin ilk aşamasının, en erken genlerin (IE) ve gecikmiş erken genlerin (DE) sentezinin yapıldığı yer olan nükleusa yönlendirilir (Jankovich vd., 2012). Bir veya daha fazla virüs yapısal proteini en erken ve erken genlerin transaktivatör proteini olarak rol oynar ve konağa ait RNA polimeraz II'nin aktivasyonunu sağlar. En erken ve gecikmiş erken genler DNA polimeraz ve konağa ait RNA polimeraz II'nin homoloğu gibi regülatör proteinleri ve katalitik enzimleri kodlar. Virüsün kodladığı DNA polimeraz sitoplazmada translasyona uğradıktan sonra nükleusa girer ve virüs genomunun birinci aşamada replikasyonunu sağlar (Goorha, 1982). Yeni sentezlenmiş virüs DNA'sı sitoplazmaya gönderilir ve ikinci aşama DNA replikasyonu olarak adlandırılan süreç başlar (Goorha ve Dixit, 1984). Bu süreçte virüs DNA'sı oldukça büyük konkatamerik bir yapı oluşturacak şekilde replike olur. Konkatamerik formdaki virüs DNA'sı sitoplazmada virojenik stroma içinde bulunur ve geç genlerin transkripsiyonu da bu bölgede gerçekleşir. RNA polimeraz II'nin iki adet büyük alt ünitesi bütün iridovirüslerce kodlanmaktadır. Geç genlerin transkripsiyonu için virüsün ürettiği RNA polimeraz kullanılır veya hücrenin RNA polimerazın nükleustan sitoplazmaya geçişini sağlayacak bir mekanizma kullanılmaktadır. İridovirüsler iki aşamalı DNA replikasyonuna sahip oldukları için (DNA replikasyonunun önce nükleusta sonra sitoplazmada devam etmesinden dolayı) nükleositoplazmik virüslerdendir. Geç genlerin translasyonundan sonra virojenik stromada virionlar oluşur. Virionların oluşumu ile ilgili özel basamaklar bilinmemektedir. Üretilen konkatamerik DNA'nın hacim bağımlı (headfull) mekanizma ile kapsid içine paketlenildiği düşünülmektedir. Böylece virüse ait genom hem terminal tekrarlara hem de halkasal permütasyona sahip olur. Bu sayede genom %10-30 oranında diploid olmaktadır. Böylece bazı genler bir çift olarak bulunur ve genlerin bir kopyasında oluşacak mutasyon sonucu kötü etkilerden virüs korunur veya yeni bir fonksiyon kazanır. Yeni sentezlenmiş virionlar virojenik stromadan ayrılarak sitoplazmanın başka bir bölgesinde büyük parakristal diziler oluşturacak şekilde birikirler

veya plazma membranından zarf kazanarak tomurcuklanırlar. Parakristal dizi oluşturan virüsler hücrenin lizizi sonucu zarf kazanmadan salınırlar. Her iki tip virüs partikülü enfektif olmasına rağmen spesifik enfektivite zarflı virüslerde çok daha yüksek (150 kata kadar) olduğu için zarf proteinlerinden bir veya birkaçının virüsün konak hücreye girişinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Braunwald vd., 1979; Gendrault vd., 1981). FV3 DNA'sı için replikasyon modeli Şekil 5'te şematik olarak gösterilmiştir (Chinchar vd., 2011). Bunlarla birlikte iridovirüslerde saflaştırılmış virüs DNA'sı hücreye transfekte edildiğinde CIV ve FV3'te gösterildiği gibi enfeksiyon oluşturamamaktadır; fakat virion ile birlikte transfekte edilen saflaştırılmış virüs DNA'sının enfeksiyon oluşturduğu gösterilmiştir (Willis vd., 1979; Willis ve Granoff, 1985; Cerutti vd., 1989; Nalçacıoğlu vd., 2003).



Şekil 5. *Frog virüs-3* DNA'sının replikasyon modeli. Bu şekil ICTV'nin 9. Raporundan alınmıştır (Chinchar vd., 2002).

1.2.3. *Iridovirus* Cinsi

Iridovirus cinsi, ICTV'nin en son 2012'de yapmış olduğu toplantıda almış olduğu kararlar doğrultusunda iki tür ve henüz sınıflandırılmamış 11 türü kapsamaktadır (Tablo 3) (Jankovich vd., 2012). Ancak son zamanlarda tüm genom dizi analizi yapılan türler ile bu cinsin altında kesin kabul edilen türlerin sayısı artacaktır.

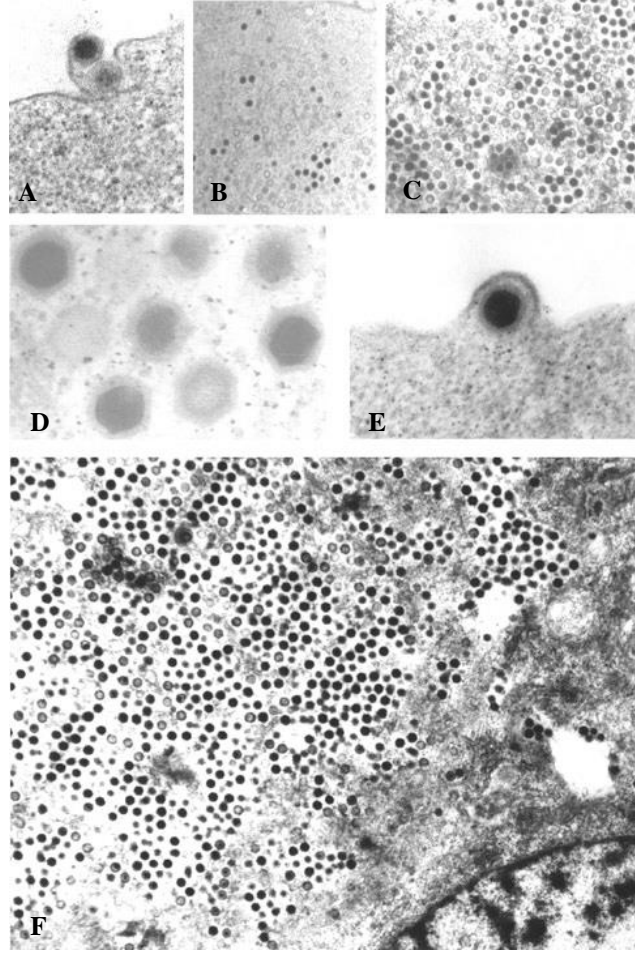
Tablo 3. *Iridovirus* cinsine ait türler

Virüs	Kısaltma	Konak Türü (Ordo) ^a	İzolasyon Bölgesi
ICTV tarafından kabul edilen türler			
<i>Invertebrate iridescent virus 1</i> (<i>Tipula</i> iridescent virüs, TIV)	IIV-1	<i>Tipula paludosa</i> (D)	İngiltere
<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (<i>Chilo</i> iridescent virüs, CIV)	IIV-6	<i>Chilo suppressalis</i> (L)	Japonya
ICTV tarafından henüz tür olarak doğrulanmamış fakat Iridovirüs cinsi ile ilişkili olabileceği düşünülen türler			
<i>Anticarsia gemmatalis iridescent virus^b</i>	AGIV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (L)	Amerika
<i>Invertebrate iridescent virus 2^b</i>	IIV-2	<i>Sericesthis pruinosa</i> (C)	Avustralya
<i>Invertebrate iridescent virus 9^b</i>	IIV-9	<i>Wiseana cervitana</i> (L) ^c	Yeni Zelanda
<i>Invertebrate iridescent virus 16^b</i>	IIV-16	<i>Costelytra zealandica</i> (C)	Yeni Zelanda
<i>Invertebrate iridescent virus 21^b</i>	IIV-21	<i>Helicoverpa armigera</i> (L) ^d	Malawi
<i>Invertebrate iridescent virus 22^b</i>	IIV-22	<i>Simulium sp.</i> (D)	İngiltere
<i>Invertebrate iridescent virus 23^b</i>	IIV-23	<i>Heteronychus arator</i> (C)	Güney Afrika
<i>Invertebrate iridescent virus 24^b</i>	IIV-24	<i>Apis cerena</i> (Hy)	Kaşmir
<i>Invertebrate iridescent virus 29^b</i>	IIV-29	<i>Tenebrio molitor</i> (C)	Amerika
<i>Invertebrate iridescent virus 30^b</i>	IIV-30	<i>Helicoverpa zea</i> (L)	Avustralya
<i>Invertebrate iridescent virus 31^b</i>	IIV-31	<i>Armadillidium vulgare</i> (Is) ^e	Amerika

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

1.2.5.1. *Chilo* Iridescent Virüs (CIV)

Iridovirus cinsinin tip türü olan *Chilo* iridescent virüs (CIV), sistematik açıdan omurgasız iridescent virüs tip-6 (*Invertebrate Iridescent Virus Type-6*, IIV-6) olarak adlandırılmaktadır. CIV, lepidopter grubuna dâhil olan kök delici *Chilo suppressalis* (pirinç sap kurdu) böceğinden izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu, 1966). IIV-6 önemli zararlı böcek türlerinde ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu için, bu böcek iridovirüsü potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak değerlendirilmektedir (Henderson vd., 2001). CIV'nin avantajlarından biri, *Anthonomus grandis* (boll weevil) böceğinden oluşturulmuş hücre kültüründe (BRL-AG-3A) (Şekil 6) kolayca büyütülüp çoğaltılabilesidir (D'Costa vd., 2012). Bu hücreler kullanılarak ilk rekombinant CIV yapımı gerçekleştirilmiştir (Özgen vd., 2014). Ayrıca CIV *Choristoneura fumiferana* (IPRI-CF-124T) (D'Costa vd., 2001; D'Costa vd., 2004), *Drosophila melanogaster* (*Drosophila* S2) (Bronkhorst vd., 2012; Bronkhorst vd., 2014; İnce vd., 2014) ve *Bombyx mori* (SPC-BM-36) (Naçacıoğlu vd., 2003; Naçacıoğlu vd., 2007) hücre kültürlerinde replike olabilmekte ve çalışılabilmektedir. Bunların yanında CIV'nin *Pieris rapae*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella* ve *Aedes albopictus* hücre kültürlerinde de replike olabildiği tespit edilmiştir (Constantino vd., 2001).

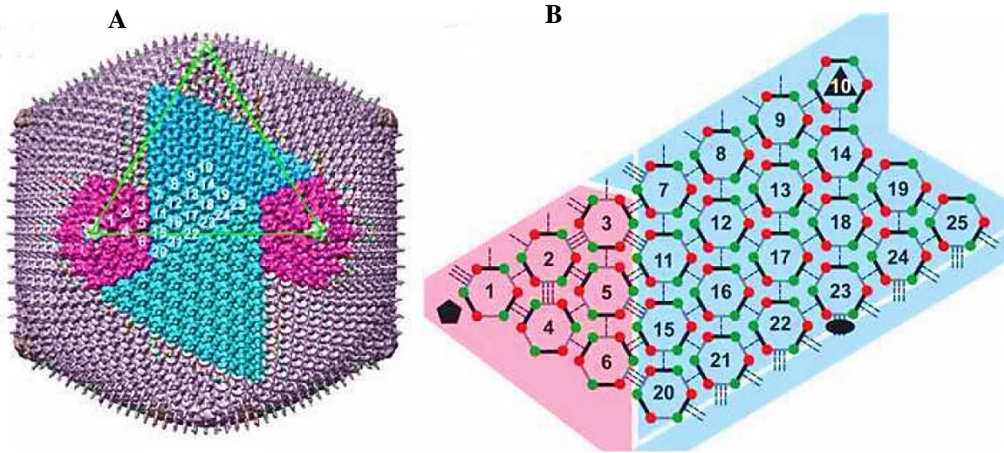


Şekil 6. CIV ile enfekte BRL-AG-3A hücrelerinin transmisyon elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. Hücreler 0. (A), 48. (B), 72. (C, D, E) ve 96. (F) saatlerde toplanmıştır. A: virüs parçacıklarının pinositoz ile hücreye girişi (0. saat), B ve C: çok sayıda virüs parçacıklarının gelişme aşamaları (48. ve 72. saat), D: virüs parçacıklarının morfolojisi (72. saat), E: virüs parçacığının sitoplazmik membrandan tomurcuklanarak ayrılması (72. saat), F: hücre sitoplazmasında iridovirüs enfeksiyonu ile karakteristik virojenik stroma (VS) ve çok sayıda olgunlaşmış virion (96. saat). Bar: A, D ve E ; 100 nm, B, C ve F; 200 nm (D' Costa vd., 2012).

1.2.5.1.1. Virion Yapısı

CIV virionu yaklaşık olarak 1850 Å çapında, ikozahedral (20 eşkenar üçgen yüz) görünümünde olup, yapısında genomu çevreleyen bir lipid tabaka ve onu da çevreleyen bir protein örtü (kapsid) bulundurmaktadır. CIV virionları iki (kenarlara göre), üç (eşkenar yüzlere göre) ve beş (köşelere göre) eksen boyunca katlandığında benzer yapılar

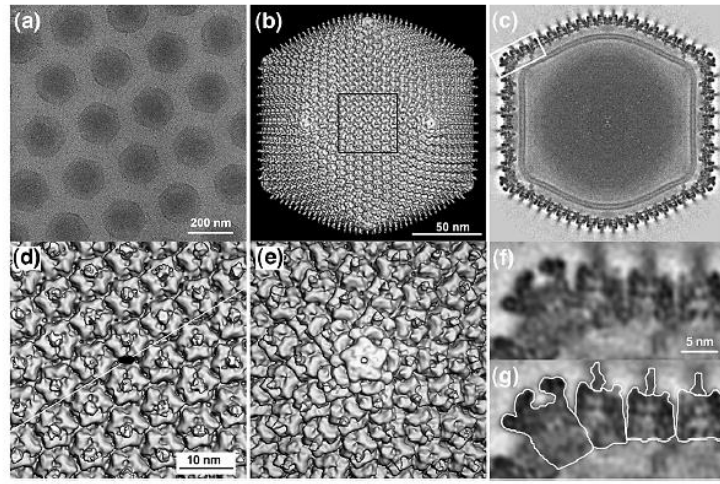
oluşturmaktadır. (Jankovich vd., 2012). Her virion 12 pentasimetron (köşelerde bulunan beşgenler) ve 20 trisimetrondan (eşkenar üçgen) oluşan ikozahedral yapıdadır (Üçgenleşme sayısı, $T = 147$, $h=7$, $k=7$) (Şekil 7). Trisimetronların (20 tane eşkenar üçgen) her birinde 55 kapsomer bulunur (toplam $55 \times 20 = 1100$ kapsomer). Bu kapsomerler aralarında 7,5 nm uzaklık olacak şekilde paketlenmiştir. İki trisimetron arasında 60 derecelik bir açı vardır. Bununla birlikte, virionun köşelerinde bulunan pentasimetronların (12 tane beşgen) her birinde 30 kapsomer vardır ($30 \times 12 = 360$). Bu şekilde her virionda toplam 1460 ($10 \times (T-1)$) tane kapsomer bulunur. Bu kapsomerlerden herbiri altıgen şeklindedir. Altıgen şekle sahip olmaları sebebiyle bu kapsomerlere heksavalent kapsomer denir. Heksavalent kapsomerler dış yüzeyde kovalent olmayan bağlarla bir arada olan trimerik Majör kapsid protein (MCP) ve iç yüzeyde de disülfid bağlarıyla bağlı ikinci bir trimerik MCP'den oluşur (Yan vd., 2009).



Şekil 7. *Chilo iridescent* virüs'deki trimerik kapsomerlerin organizasyonu. A: CIV kapsidi 20 trisimetron (biri açık ve diğeri koyu mavi renkli) ve 12 pentasimetrona (pembe renkli) sahiptir. İkozahedronun bir üçgen yüzeyi yeşil çizgi ile gösterilmiştir. B: Bir asimetrik birim içerisindeki kapsomerler arası etkileşimlerin şematik olarak gösterilişi (Yan vd., 2009).

CIV virionlarının özü, liflerle (fibrillerle) kaplı ikozahedral bir örtü içinde 212,482 nükleotit çiftinden oluşan, virion kütlelerinin %12'sini oluşturan, lineer, çift zincir elektronca yoğun bir nükleoprotein (DNA/protein) filamentinden oluşur. Diğer *Iridoviridae* familyasına mensup virüsler ve T4 fajında olduğu gibi (*Myoviridae*) CIV genomu halkasal permutasyon özelliği gösterir (Schnitzler vd., 1987) ve genomun yaklaşık

%12'si terminal tekrarlarından oluşur (Schnitzler vd., 1987). Genomda en az altı replikasyon orijini tespit edilmiştir (Sonntag vd., 1994). CIV virionları LC-MS/MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) analizinde iki veya daha fazla peptidin varlığına göre 46; tek peptidin varlığına göre ise 54 yapısal proteinden oluşur (İnce vd., 2010). 54 yapısal proteinden 36'sı diğer iridovirüs ve askovirüslerdeki proteinlerle homoloji gösterir. P50 (51,4 kDa, 467 amino asid, majör kapsid proteini, MCP) toplam protein kütesinin yaklaşık yarısı (%40) kadardır. Diğer yapısal proteinlerin lokalizasyonları ve organizasyonları bilinmemektedir (Şekil 8).



Şekil 8. *Chilo iridescent* virüs'ün 3Å çözünürlükte 3 boyutlu görüntüsü. (a) CIV virionları. CIV öz bölgesi (dsDNA genomu ve DNA bağlanma proteinleri) kapsidi tamamen doldurmamaktadır, (b) CIV'nin ikili simetri açısından görünüşü, (c) Şekil b'de işaretli bölgenin kesiti, yaklaşık 40Å kalınlığındaki iç lipid tabaka ve öz bölge, (d) Şekil b'de işaretli bölgenin büyütülmüş hali. İnce beyaz çizgi iki trisimetronun birleştiği bölgeyi gösteriyor, siyah leke 2'li simetrisinin katlandığı bölge (e) pentamerik kapsomerin büyütülmüş hali. Bu kompleks hegzavalent kapsomerlerden daha büyük olması, ortada bir boşluğun olması ve fibrilinin olmaması ile kolayca ayrılır. (f) Şekil c'deki işaretli bölgenin büyütülmüş hali, (g) Şekil f ile aynı pentamerik kapsomer, üç kapsomer ve kapsomerlerin fibrilleri çizgilerle gösterilmiş (Yan vd., 2009).

CIV virionlarının %9'u lipittir (Kelly ve Vance, 1973). Virion özü fonksiyonu bilinmeyen transmembran proteinler içeren bir lipid membran ile sarılıdır. Virüse ait bu

DNA özü ile kapsid arasında bulunan iç lipid membran fosfatidilinositol ve digliseridlerce zengindir ve konak hücrenin lipid membranından farklı bir bileşeni vardır. Bu durum CIV'nin kendi lipid membranını sentezlediğini gösterir (Balange-Orange ve Devauchelle, 1982).

CIV virionlarının yapısında bulunan proteinler konak makromoleküler sentezini durdurmakta (Cerutti ve Devauchelle, 1980), virüse ait erken genlerin transaktivasyonunu sağlamaktadır (Nalçacıoğlu vd., 2003; İnce vd., 2013). Yapısal proteinlerden iridoptin adı verilen bir proteinin, protein kinaz aktivitesine sahip olduğu ve apoptosize (Paul vd., 2007; Chitnis vd., 2011) sebep olduğu bilinmektedir. İridoptinin konak makromoleküler sentezini inhibe ederek böceklerde toksisiteye sebep olduğu tespit edilmiştir. Böylece ilk kez virüse ait bir toksin geni tespit edilmiş ve patenti alınmıştır (Bilimoria, 2009). Ayrıca yapısal proteinlerden bir kısmı protein kinaz (Monnier ve Devauchelle, 1980), nükleotit fosfohidrolaz (Monnier ve Devauchelle, 1976), RNA polimeraz (Kelly ve Tinsley, 1973) gibi enzimatik aktivitelere sahiptir. *Anthonomus grandis* (pamuk kozalak kurdu) üzerine yapılan çalışmalar sonucunda CIV yapısal proteinlerinin böcekte metamorfik değişimlere ve ölüme sebep olduğu tespit edilmiştir (Bilimoria, 2001).

1.2.5.1.2. Transkripsiyonel Regülasyon

CIV'de gen ifadesi basamaklı bir şekilde düzenlenmekte olup ifade edilen genler en erken (α , IE), gecikmiş erken (β , DE) ve geç (γ , L) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır (D'Costa vd., 2001; D'Costa vd., 2004). En erken ve gecikmiş erken grubu genler DNA sentezinden önce ifade edilirler. En erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duymaz iken, gecikmiş erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duyar. Geç grubu genler ise hem protein sentezine hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duyar. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda CIV'de gen sınıflarının tespiti için DNA sentez inhibitörü olarak 100 $\mu\text{g/ml}$ cytosine-1- β -D-arabinofuranoside (Ara-C) veya 5 $\mu\text{g/ml}$ aphidicolin (APH); protein sentez inhibitörü olarak ise 200 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (CHX) kullanılmaktadır. CIV genomunda Northern blot hibridizasyon analizine göre tespit edilen 137 transkriptten 37 tanesi en erken, 34 tanesi gecikmiş erken ve 65 tanesi geç olarak karakterize edilmiştir (D'Costa vd., 2004). Kütle spektroskopisinin (MS) kullanıldığı proteomik analize göre ise, ifade edildiği belirlenen 95 proteinden 37 tanesi virion proteinlerinden oluşmaktadır. Bu virion proteinlerinden 22 tanesi en erken, 8 tanesinin gecikmiş erken ve 7 tanesinin geç gen

sınıfına dahil olduğu tespit edilmiştir (İnce vd., 2014). 41 virion proteininin sınıfı RT-PCR (geri transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle tespit edilebilmiş ve bunlardan 23 tanesinin en erken, 8 tanesinin gecikmiş erken ve 7 tanesinin ise geç gen sınıfına dahil olduğu belirlenmiştir (İnce vd., 2013). RT-PCR ile belirlenen 4 tane geç genin (234R, 274L, 317L, 401R) MS ile erken gen sınıfına girmesi; yine RT-PCR ile belirlenen erken genlerin (268L, 453R) MS ile geç sınıfa dahil olması ve 8 tane geninde en erken ve gecikmiş erken olma durumlarının MS ve RT-PCR'a göre farklılıklar göstermesi gibi, bu iki çalışmada bazı tutarsızlıklar görülmektedir. Bu bulgular daha önce de belirtildiği gibi (İnce vd., 2014) qRT-PCR (kantitatif geri transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) ile teyit edilebilirler. Ayrıca DNA polimeraz enzimini kodladığı düşünülen 037L (DE) ve majör kapsid proteinini kodlayan 274L (L) proteinlerin transkripsiyonel ve promotor analizi yapılmıştır (Nalçacıoğlu vd., 2003; Nalçacıoğlu vd., 2007). Lusiferaz deneyi ile yapılan çalışmalarda CIV promotorlarının aktif olabilmesi için viral proteinlere ihtiyaç duydukları, virion proteinleri yokken transfeksiyon yapıldığında promotorların aktif olmadığı gösterilmiştir (Nalçacıoğlu vd., 2007).

CIV mRNA'ları poli A kuyruğuna sahip değildir (İnce vd., 2013). Şimdiye kadar iridovirüslerde poli A kuyruğu sadece, TIV (Tipula iridescent virüs)'in iki adet mRNA'sında ve LCDV-1 virüsünün fonksiyonu bilinmeyen bazı genlerinde tespit edilmiştir. CIV ORF'lerinin aşağı bölgelerinde (3'-ucu) poliadenilasyon sinyali bulunmaz (İnce vd., 2013). CIV mRNA'ları şapka taşıyıcı ve ribonükleotid redüktaz (RNR) geninin bir intesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Bigot vd., 2013).

1.2.5.1.3. Konak Çeşitliliği ve Patolojisi

CIV'nin organizmalara enjeksiyon yolu ile inokülasyonu sonucunda konak çeşitliliği araştırılmış ve 6 ordoya ait (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera) 100'den fazla böcek türünü enfekte ettiği tespit edilmiştir (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; McLaughlin vd., 1972; Ohba, 1975; Ohba ve Aizawa, 1979; Henderson vd., 2001). CIV sivrisineklerin 13 türünü ağız yoluyla enfekte edebilmektedir ve sivrisineklerde çoğunlukla ölümcül olmayan enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Williams ve Thompson, 1995). Aynı zamanda CIV çok sayıda böcek olmayan eklem bacaklıları da enfekte etmektedir (Ohba ve Aizawa, 1979).

CIV Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera ve Hemiptera başta olmak üzere farklı ordolara ait birçok böcek hücre kültüründe *in vitro* olarak replike olmaktadır (Ohba 1975; Monnier ve Devauchelle, 1976; Monnier ve Devauchelle, 1980; Constantino vd., 2001). CIV'nin sürüngen hücrelerinde de replike olduğu belirlenmiştir (Mc. Intosh ve Kimura, 1974). *Ostrinia nubilalis* hemositlerinden geliştirilen hücre kültüründe CIV'nin replike olamadığı; fakat *Ostrinia nubilalis* larvalarını çok kolay enfekte ettiği, yağ hücreleri ve hemositleri de içeren birçok farklı hücre ve dokuda replike oldukları belirlenmiştir (Belloncik vd., 1988). Bu durum virüsün *in vivo* ve *in vitro*'da farklı yollarla enfeksiyon oluşturduğunu göstermektedir (Martinez vd., 2003). CIV'nin ölümcül olmayan enfeksiyonu böcek popülasyonlarında çok yaygındır ve bu enfeksiyon şekli enfekte olan böceklerde yaşam süresini, vücut büyüklüğünü, üreme kapasitesini çok ciddi bir ölçüde düşürmektedir. Iridovirüslerin virülansını belirleyen faktörlerle ilgili bilgiler çok az bilinmektedir; fakat ölümcül olmayan enfeksiyonun virüsün vertikal transmisyonuna izin verdiği ve böcek popülasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Williams vd., 2005; Williams ve Ward, 2010; İnce, 2012).

1.2.5.1.4. Rekombinant CIV Oluşturulması ve Önemi

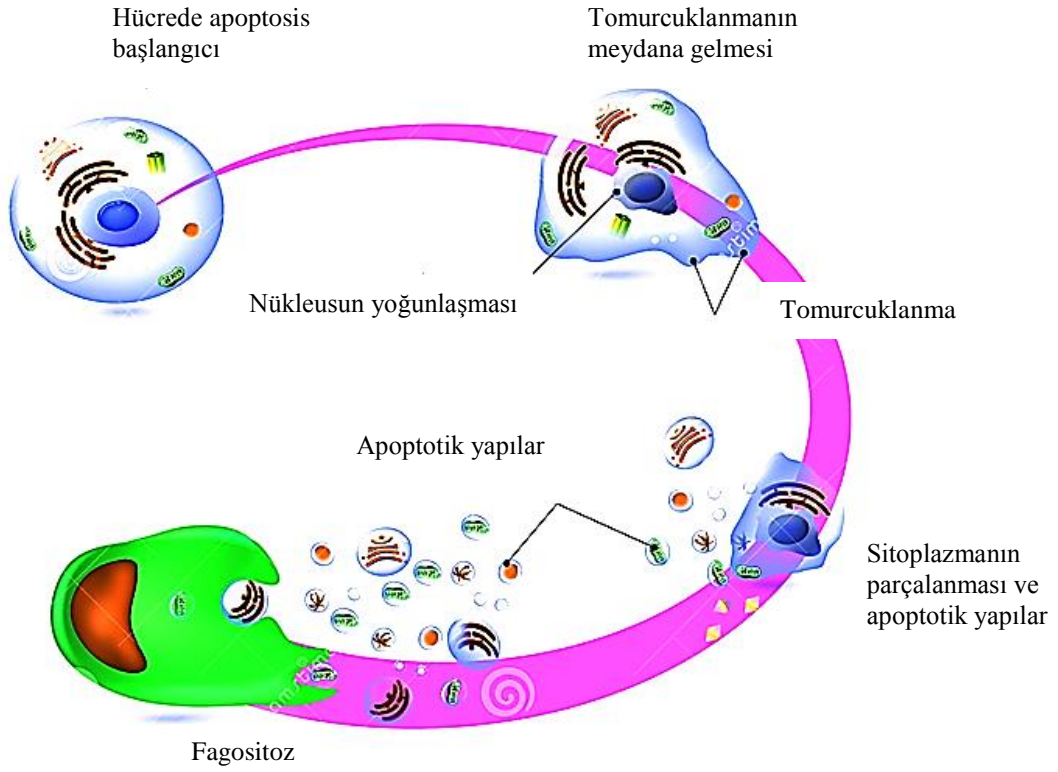
CIV, çok sayıda zararlı böcek üzerinde patojenite oluşturabilmesi nedeni ile biyopestisit olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Ancak, CIV ile ilgili en önemli olumsuzluk konağı öldürme sürecinin yavaş olmasından dolayı enfekte böceklerin ölümlerinin geç olmasıdır. Bu durum virüsün biyopestisit olarak kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır. Bu gibi sorunları çözebilmek amacıyla farklı organizmaların genlerini ifade eden rekombinant virüslerin oluşturulduğu çalışmalar mevcuttur. Örneğin, böcek virüslerinde patojenitenin arttırılmasına yönelik pek çok çalışma bakülovirüsler üzerinde yapılmıştır. Ancak biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilme potansiyelindeki Iridovirüslerde böyle bir çalışma mevcut değildir.

Literatürde virüs genomuna dışarıdan yerleştirilen genler arasında toksinler, peptid hormonlar, enzimler ve transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır (Feng vd., 2001). Virüslere yerleştirilen toksinler arasında, böcek spesifik akrep nörotoksinleri (AaZT, AaIT, LqhIT2) (Maeda vd., 1991; McCutchen vd., 1991; Harrison ve Boning, 2000a), akar neurotoksini (Txp-I) (Tomalski ve Miller, 1991), ve yaban arısı toksini (Tomalski ve Miller, 1993) bulunmaktadır. Bu toksinler genomuna yerleştirilerek oluşturulan

rekombinant virüslerde artmış insektisidal aktivite gözlenmiştir. Virüs genomuna bir genin klonlanabilmesi için virüsün genomunda mevcut olan genlerden birinin veya genomdan bir bölgenin çıkarılması gerekmektedir. Bu konuda da CIV için çeşitli alternatifler mevcuttur. Bu alternatiflerden bir tanesi virüs genomundaki muhtemel apoptosis inhibitör genlerinden biri olduğu düşünülen 157L açık okuma zinciridir (ORF). CIV genomunun analiz edildiği makaleye göre bu ORF, bir bakülovirüs olan *Cydia pomonella* granülovirüsün apoptosis inhibitor genine %17'lik bir benzeliği nedeni ile potansiyel apoptosis inhibitor geni olarak nitelendirilmiştir. Ancak bu benzerlik çok düşük bir benzerliktir. Nitekim 157L ORF'si apoptosis inhibitör genlerinin ihtiva etmeleri gereken BIR (Baculovirus inhibitor of apoptosis repeats) domainini ihtiva etmemektedir. Daha önceden yapılmış olan bir çalışmada 157L ORF'sinin apoptosis inhibisyon olayında rol almadığını da teyit etmektedir (İnce vd. 2008).

1.3. Apoptosis

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptosis, gelişim sırasında, sağlıklı organizmalarda görülen normal hücresel bir süreçtir. Apoptosisin gelişim ve doku homeostazisini sağlamasının yanında hücrenin savunma mekanizmasında da (örneğin; antiviral savunma) önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Yunbo, 2008). Apoptosis sinyali alan bir hücrede kromatin yoğunlaşmaya başlar. Aynı şekilde sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülür. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan parçalara bölünür. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapıları ortaya çıkarır. Bu durum apoptotik cisimciklerin fagositozu için bir uyarıdır ve apoptotik cisimcikler bu sinyalin uyarısı ile makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (Lipponen vd, 1994; Wyllie vd., 1980). Apoptosis esnasında meydana gelen, nükleusun yoğunlaşması, hücrenin parçalanması, apoptotik yapıların oluşması ve çevre hücreler tarafından bu yapıların yutulması gibi değişiklikler (Şekil 9), bu tür hücre ölümünün sıkı bir programın kontrolü altında olduğunu göstermektedir. Bu program, normal hücre sayısını ve kompozisyonunu devam ettirmek için hem embriyo hem de yetişkin yaşamı boyunca büyük bir önem taşımaktadır.



Şekil 9. Apoptotik hücrelerde gözlemlenen morfolojik değişimlerin şematize edilmiş hali (URL-2).

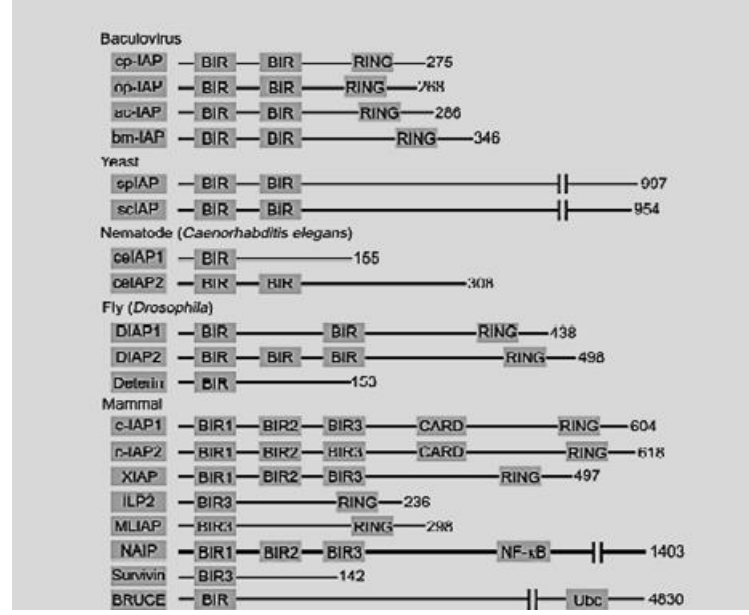
Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarın sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarınlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (Gürbilek vd., 2004) IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL (Bender vd., 2005) sFas proteinleri, virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Erdoğan, 2003). Organizmada apoptozisi uyarın ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Tablo 4) (Öktem, 2001).

Tablo 4. Apoptozis ve Genler

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none"> •Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 •c-abl geni •ras onkogeni •çözünebilir fas •p35 •A20 	<ul style="list-style-type: none"> •Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk 1 •c-myc •p53, p21 •fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST •interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) •LOH (MTS1/CDK41)

1.3.1. Apoptosis İnhibitör Genleri

Virüs enfeksiyonlarında savunma mekanizması olarak, virüs replikasyonunu engellemek amacıyla konağın apoptozise gittiği bilinen bir durumdur. Ancak bazı virüslerde hücrenin apoptozise gitmesini engelleyecek genler bulunmaktadır. Örneğin Bakulovirüsler viral enfeksiyonla indüklenen apoptosisi inhibe edebilecek iki anti-apoptotik gene sahiptirler. Bu iki gen *p35* ve *iap* (inhibitor of apoptosis) isimleri ile bildirilmiştir (Miller, 1997). *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) *p35* proteininin ekspresyonu *Drosophila*'da (Hay vd., 1995) nematodlarda (Sugimoto vd., 1994) ve memelilerde (Martinou vd., 1995) hücre ölümünü engellemiştir. *P35* proteini kaspazların aktivitesini inhibe ederek apoptosisi bloke eder. Kaspazlar apoptosis sürecinin merkezinde rol alan sistein proteazlardır. *p35* kaspazın bir substratı (Zhou vd., 1998) olarak hareket eder ve kaspazları Asp⁸⁷ aminoasitlerinden 10 ve 25 kDa'luk fragmentler halinde keser ve bunun bir sonucu olarak kaspaz aktivitesini inhibe eder (Bertin vd., 1996, Green ve Reed, 1998). IAP ailesi proteinleri N-terminallerinde bir ile üç arasında baculovirus IAP tekrar (BIR; baculovirus IAP repeat) motiflerini bulundurmalarına göre gruplandırılmışlardır. Bazı IAP'lar ayrıca C-terminallerinde RING finger domaini bulundururlar (Schimmer, 2004). BIR motifleri yaklaşık olarak 70 aminoasitten oluşmakta ve karakteristik olarak CX2CX16HX6C dizisini içermektedirler. Filogenetik olarak BIR motifleri BIR1, BIR2 ve BIR3 şeklinde üç alt sınıfa ayrılır. IAP ailesi üyelerinin moleküler yapısı Şekil 10'de gösterilmektedir.



Şekil 10. Apoptosis inhibitör protein (IAP) ailesi üyelerinin moleküler yapısı (Wei vd., 2008).

IAP ailesi proteinlerinin anti-apoptotik fonksiyon gösterebilmeleri için BIR domainine ihtiyaç duymalarına rağmen, BIR domaini içeren tüm proteinler anti-apoptotik fonksiyona sahip değildirler. Tüm IAP'lar oldukça yüksek derecede korunmuş dizilere sahiptirler. Bakulovirüs IAP'ları ile böcek IAP'ları arasındaki yakın ilişki, bakulovirüs IAP'larının konak hücrelerinden gen transferi ile kazanılmış olabileceğini akla getirmektedir. Hatta bazı bakuloviral IAP'lar memeli hücrelerini de baskılayabilirler (Huang vd., 2000).

1.4. Tezin Amacı

Biyolojik mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılan mikrobiyal insektisitlerin bir grubunu böcek virüsleri oluşturmaktadır. *Chilo iridescent* virüs (CIV) ziraatte zararlı bazı böcekleri enfekte etmektedir. CIV bu zararlıların kontrolünde kullanılma potansiyeline sahip olduğu için mikrobiyal patojen olarak ekonomik ve ekolojik öneme sahiptir. Günümüzde gelişen teknoloji sayesinde mikrobiyal patojenleri moleküler seviyelerde inceleme ve hedefe yönelik şekillerde düzenleme imkanları mevcuttur. Örneğin virüs genomunda ki bir genin fonksiyonunun araştırılması için hedef geni ihtiva etmeyen rekombinant bir virus oluşturulabilir. Sözkonusu genin virüsün hayat döngüsünde önemli

bir rolünün olmadığı belirlenirse dahada ileriye gidilerek bu genin yerine virüs genomuna virülansı artırıcı yabancı bir gen yerleştirilebilir. Nitekim bu tez çalışmasında da CIV genomundaki bir okuma zincirinin (ORF157L) yerine bir işaret geni yerleştirilerek rekombinant virüs oluşturulup fonksiyonel analizi yapılmıştır.

CIV genomundaki ORF157L muhtemel apoptosis inhibitör geni biyoinformatik analizlere göre (Jakob vd., 2001) potansiyel bir apoptosis inhibitör proteini (IAP)'ni kodlamaktadır. Ancak 157L geni fonksiyonel olabilmesi için gerekli olan BIR domainini taşımamaktadır. Bu durum yine CIV genomunda bulunan ve BIR domaini taşıyan 193R apoptosis inhibitör geninin tersine 157L'nin apoptosisin inhibe edilmesinde aktif rol almadığını düşündürmüştür (Ince vd., 2008). Bu sebeple 157L gen lokusu, CIV genomundan silinerek yerine bir başka genin konulabileceği ideal bir bölge olarak görülmüştür. Ancak bu durumun deneysel olarak teyit edilmesi gerekmektedir. Dolayısı ile bu tez çalışmasında CIV genomundaki 157L gen bölgesi viral genomdan homolog rekombinasyon ile silinerek çıkartılmış ve yerine yine CIV genomunda yer alan majör kapsid proteinini geninin (274L) promotörü altına klonlanmış yeşil floresan proteini geni (*gfp*) yerleştirilmiştir. Oluşturulan rekombinant CIV, BRL-AG-3A hücrelerinde saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücrelerin ve Virüsün Temini

Chilo iridescent virüs (CIV; *insect iridescent virus type-6*) Dr. C. Joel Funk'tan (USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona) temin edildi (1999). Uzun yıllardan beri laboratuvarımızda çalışılmaktadır.

Chilo iridescent virüsü çalışmak için hücre kültürü olarak, *Anthonomus grandis*'den türetilmiş BRL-AG-3A hücre suşu kullanıldı. Bu hücreler Prof. Dr. Guy Smagghe'den (Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Ghent, Belgium) temin edildi. Hücreler 28°C'ye ayarlanmış etüvde %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma, Kat No: F-0643) katkılı Hink'in TNM-FH besiyerinde özel hücre kültürü kapları (Corning) içerisinde büyütüldü (Hink, 1970). Her 4 günde bir 1:5 oranında altkültürü yapıldı.

2.2. Virüsün Larvada ve Hücre Kültüründe Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Çalışmanın başlangıcında virüsün çoğaltılması için *Galleria mellonella* (büyük balmumu güvesi) larvaları kullanıldı. Larvalar virüsle, 30 G1/2 iğne kalınlığına sahip enjektör ile enjeksiyon yoluyla enfekte edildi. Enfekte edilen larvalar 27 °C'de 3 hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enfeksiyonun geliştiği larvalar -20 °C'de muhafaza edildi.

Virüsün saflaştırılması Marina ve arkadaşlarının (1999) geliştirdikleri metoda göre gerçekleştirildi. Donmuş 1 adet larva 1 ml steril ddH₂O'da homojen hale getirildi. Homojenat, virüsün saflaştırılması esnasında sırasıyla 490 ×g, 960 ×g ve 1.250 ×g'de 10'ar dk (dakika) santrifüj edilerek doku parçalarından ve kaba partiküllerden arındırıldı. Ardından 15.300 ×g'de santrifüj edilerek virüs çökelti haline getirildi. Çökelti 500 µl steril ddH₂O'da çözüldü ve %30'luk sukroz çözeltisi üzerine bırakılarak 15.300 ×g'de 30 dk santrifüj edildi. Oluşan çökelti 1 kez yıkandı ve 1 ml steril ddH₂O'da çözüldü. Bu şekilde saflaştırılan virüs 0,45 µm'lik filtreden süzülerek steril tüplerde toplandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

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

Virüsün hücre kültüründe çoğaltılması işlemi için konak olarak BRL-AG-3A hücre kültürü kullanıldı. İlk olarak hücreler ard arda sekiz pasaj boyunca yaban tip virüs ile enfekte edildi ve enfeksiyon verimliliği takip edildi. Ardından sekizinci pasajda toplanan virüsler ile hücreler büyük ölçekli hücre kültürü kaplarında (75 cm²'lik flasklar) enfekte edildi. Enfekte edilmiş hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak 2500 ×g'de 15 dk santrifüj edildi. Bu şekilde besiyeride bulunan hücreler çöktürüldü. Konsantre virüs stoku hazırlamak için süpernatant ~20000 ×g'de 30 dk santrifüj edildi.

2.3. Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Virüsün konsantrasyonu Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) metoduna göre belirlendi. Bunun için 60 gözlü hücre kültürü kapları (Terasaki kapları; Corning) kullanıldı. 10 adet mikrosantrifüj tüpü, 1'den 10'a kadar numaralandırıldı ve bunlara 100'er µl besiyeri bırakıldı. Virüs, 9. tüpe kadar büyüme besiyerisi içerisinde 1/10 oranında seyreltilti. 10. tüp, kontrol olarak kullanıldı ve buna virüs eklenmedi. 1,5-2 × 10⁶ hücre/ml olarak süspansiyon haline getirilen BRL-AG-3A hücrelerinden, 10 tüpün her birine 90 µl (mikrolitre) 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 süspansiyonun 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. TCID₅₀ 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 TCID₅₀ formülü ve elde edilen değerler kullanılarak hesaplandı. Her bir virüs için deneyler 3 kez tekrar edildi ve kontrol olarak enfekte edilmemiş BRL-AG-3A hücreleri kullanıldı (D'Costa vd., 2012).

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

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

$a = \log n$,

$b = n$. seyreltiğin % değeri,

$c = n$. değer altındaki % değeri,

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

2.4. Biyoinformatik Analiz

CIV'de apoptosis inhibitör (IAP) genlerinin varlığı tüm genomun dizin analizi yapılması ile belirlenmiştir (Jakob vd., 2001). Buna göre 157L (152 aminoasit), 193R (208 amino asit) ve 332L (234 amino asit) CIV genomundaki muhtemel üç apoptosis inhibitör gen olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda 157L kodlu genin aminoasit sırası GenBank veri tabanından temin edilmiş ve Conserved Domain Search Service (CD Search)/ncbi programı kullanılarak 157L geni biyoinformatik olarak incelenmiştir.

2.5. Transkripsiyonel Analiz

2.5.1. Toplam RNA İzolasyonu

CIV'ye ait muhtemel apoptosis inhibitör geninin (ORF157L) BRL-AG-3A hücrelerindeki transkriptinin varlığını belirlemek için CIV ile enfekte olmuş hücrelerden enfeksiyondan sonra 24. saatte Trizol (Ambion) kullanarak firma tarafından tavsiye edilen yöntemle göre RNA izolasyonu yapıldı. Bunun için BRL-AG-3A hücreleri daha önce belirtildiği şekilde 6 gözlü hücre kültürü kaplarında CIV ile enfekte edildi. RNA izolasyonu için enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve her göze 1 ml Trizol ilave edildi. Trizol pipetlenerek hücrelerin tabandan kopması ve parçalanması sağlandı. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerlerine 0,2 ml kloroform ilave edildi. Nazikçe alt üst edildi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Karışım 12.000 $\times g$ 'de, 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe transfer edilerek üzerine 0,5 ml izopropanol ilave edildi ve yine nazikçe alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildikten sonra 12.000 $\times g$ 'de 4 °C'de 10 dk santrifüj yapıldı. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve çökelti 1 ml %70'lik etanol ilave edilerek yıkandı. 7.500 $\times g$ 'de 4 °C'de 5

dk santrifüj edildi. Elde edilen RNA çökeltisi havada 10-15 dk kurutulduktan sonra RNaz ihtiva etmeyen 30 µl ddH₂O'da çözülerek -20 °C'de muhafaza edildi. İzole edilen RNA -80 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

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

2.5.2. Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

İzole edilen RNA Tablo 5'de belirtilen özel primerler (P9/P10) kullanılarak geri transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizine tabi tutuldu. Bunun için, CIV BRL-AG-3A hücrelerinden izole edilen RNA'lardan 2'şer µg tüplere bırakıldı. Bunların üzerine 10 ünite superscript III revers transkriptaz, 10 ünite RNAsin ve 12,5 µM (mikromolar) *iap* için özel primerlerin her ikisindedeki konuldu. Reaksiyon 20 µl'lik hacim içinde 37 °C'de 1 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen cDNA'ların 2'şer µl'si özel "geri" ve "ileri" primerler (CIV157L trFw, CIV157L trRv) kullanılarak PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Ayrıca kontrol olarak BRL-AG-3A hücrelerinden izole edilen toplam RNA kullanıldı.

2.6. Rekombinant Virüs Oluşturulması

Biyoinformatik analizlere ve daha önce yapılmış çalışmalara dayanarak apoptosis inhibisyon olayında rol almadığını düşündüğümüz ORF157L geninin virüs genomundan homolog rekombinasyon ile çıkarılması işlemi, bir işaret geni olan yeşil floresan proteini geni (*gfp*; green fluorescent protein) ile yerlerinin değiştirilmesi şeklinde gerçekleştirildi. Bunun için, ilk olarak ORF157L geninin askı bölgelerini içeren bir ara vektör oluşturuldu. Oluşturulan bu ara vektördeki askı bölgelerinin arasına yine CIV'ye ait majör kapsid proteini geninin (*mcp*) promotörü altında ifade edilecek *gfp* geni yerleştirilerek, hedef transfer vektörü oluşturuldu. İkinci olarak, BRL-AG-3A hücrelerine yaban tip virüsün enfeksiyonu ve ardından transfer vektörün transfeksiyonu gerçekleştirildi. Böylece hücre içerisinde homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi ve rekombinant virüsün oluşması için

gerekli ortam sağlanmış oldu. Oluşan rekombinant virüs seri plak deneyleri ile seçilip saflaştırıldı, PCR ile doğrulandı ve dizin analizi yapıldı.

2.6.1. Transfer Vektörünün Hazırlanması

Muhtemel apoptosis genini kodlayan CIV157L geninin baş kısmından 626 ve son kısmından 611 bp (baz çifti) DNA fragmentleri askı bölgeleri olarak belirlendi. Bu bölgeleri CIV genomundan PCR ile çoğaltmak için P1/P2, P3/P4 primerleri tasarlandı. CIV'e ait mcp promotörü dizisi ile birlikte başlangıç kodonundan itibaren mcp ORF'sine ait 18 bp'i çoğaltmak için P5/P6 ve *gfp* genini bulunduğu pDU20gfp transfer vektöründen çoğaltmak için ise *gfp* gen dizisinin ileri primerinde başlangıç kodonu hariç olacak şekilde P7/P8 primerleri dizayn edildi. Primerlere, üretilen PCR ürünlerinin pBlueScript SK(-) vektörüne klonlanmasına imkan sağlayan uygun enzim kesme bölgeleri eklendi (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışmada kullanılan primerler^a

No.	Primer adı	Primer dizisi (5'-3')
P1	CIV 157L Ups Fw	ATGCGGCCGCGCTGGATTTGATTCATCTGG (<i>NotI</i>)
P2	CIV 157L Ups Rv	CGGAATTCTGTAGATACAATGATTAATTTG (<i>EcoRI</i>)
P3	CIV 157L Dwn Fw	CCCAAGCTTATATTCCTATTAATAAAGTTGTG (<i>HindIII</i>)
P4	CIV 157L Dwn Rv	CCGCTCGAGGGAGAGATACATAATGGAAC (<i>XhoI</i>)
P5	CIV MCP Prom Fw	CGGAATTC CAATACATAACAATCTTTCATTAT (<i>EcoRI</i>)
P6	CIV MCP -GFP Rv	CAGCCCGGGGATCCGTTGACGAAGAAATAGACATCTTTG
P7	CIV MCP -GFP Fw	CAAAGATGTCTATTTCTTCGTCAACGGATCCCCGGGCTG
P8	GFP Rv	CCCAAGCTT TCACTTGTACAGCTCGTCC (<i>HindIII</i>)
P9	CIV157L trFw	CCGCAATTA ACTTTGATTTTAAA
P10	CIV157L trRv	GGGCATGTATTTAATCTATTGAA

^a Enzim kesim bölgeleri altı çizili olarak belirtilmiş ve primerin sonunda parantez içerisinde adı yazılmıştır

2.6.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hazırlanan primerler kullanılarak, öncelikle CIV157L'nin baş ve son kısmından belirlenen 626 ve 611 bp'den oluşan diziler P1/P2, P3/P4 primerleri kullanılarak yaban tip CIV DNA'sından PCR ile çoğaltıldı. Ardından 5' UTR bölgesinde yüksek aktivite gösteren

mcp promotor bölgesi ve başlangıç kodonu dahil *mcp* ORF gen bölgesinden 18 bp içeren toplam 297 bp'den oluşan dizi P5/P6 primerleri kullanılarak yaban tip CIV DNA'sından PCR ile çoğaltıldı. Daha sonra *gfp* geni başlangıç kodonu hariç olacak şekilde pDU20gfp transfer vektöründen P7/P8 primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Sonrasında *mcp* promotörü ve kısmi ORF'sinden oluşan 297 bp'lik dizi ile başlangıç kodonu hariç 735 bp'lik *gfp* gen dizisi P5/P8 primerleri kullanılarak toplamda 1032 bp DNA dizisi olacak şekilde füzyon PCR yapıldı. Füzyon PCR yapılırken bir önceki cümlede bahsettiğimiz 279 ve 735 bp'lik DNA dizilerine ait her iki kalıp aynı PCR tüpüne 10 ng/μl olacak şekilde konuldu ve reaksiyon karışımı hazırlandı.

PCR işlemi için, 3'→5' ekzonükleaz (hataları doğrulama) aktivitesine sahip Phusion DNA polimeraz enzimi (FINNZYMES, Kat No: F-530S) kullanıldı. PCR reaksiyon karışımı ve PCR koşulları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. PCR reaksiyon karışımı ve PCR koşulları

PCR Karışımı		PCR Koşulları	
DNA	1 μl (10 ng)	98 °C'de	30"
İleri primer	1.5 μl (1mM)	98 °C'de	10"
Geri primer	1.5 μl (1mM)	55 °C'de	30"
dNTP	1.5 μl (10 mM)	72 °C'de	Fragmente spesifik
MgCl ₂	0.5 μl (50 mM)	72 °C'de	10'
5X HF buffer	10 μl	4 °C'de	∞
dH ₂ O	33.5 μl		
Fusion enzim	0.5 μl		

} 35 döngü

PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. İstenilen büyüklükteki bantlar jelden kesilip, Nucleospin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel, Kat No: 11457) kiti ve bu kitte belirtilen prosedür kullanılarak jelden temizlendi. Temizlenen DNA'ların konsantrasyonları nanodrop (Thermo) kullanılarak ölçüldü. Jelden temizlenmiş ve konsantrasyonu belirlenmiş DNA fragmentlerinin pJET 1.2/blunt (Fermentas, Kat No: K1232) klonlama vektörüne her bir farklı uzunluktaki DNA fragmenti için, "ligasyon hesaplama motoru" kullanılarak ligasyonu gerçekleştirildi (Tablo 7).

Tablo 7. Ligasyon Reaksiyon Karışımı

Ligasyon Bileşenleri	Miktar
2x reaksiyon tamponu	10 µl
PCR ürünü	x µl (PCR ürününün uzunluğuna özel)
pJET1.2/blunt klonlama vektörü	1 µl (50 ng)
ddH ₂ O	... - 8 µl
T4 DNA ligaz	1 µl
Toplam hacim	20 µl

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan ligasyon reaksiyon karışımları 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek bakteri hücrelerine transformasyona hazır hale getirildiler.

2.6.1.2. Elektrokompotent Bakteri Hücrelerinin Hazırlanması

Petriye ekilmiş *E. coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C’de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden 1000 ml LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C’de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dk buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C’de 4.000 ×g hızında 15 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti %10’luk soğuk gliserolde çözüldü ve 4.000 rpm’de 4 °C ’de 15 dk santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10’luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompotent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl’lik hacimlerde) ve –80 °C’de saklandı.

2.6.1.3. Elektrotransformasyon

PCR ürünlerinin pJET 1.2/blunt klonlama vektörüne ligasyonu sonucu oluşturulan plazmidlerin hücreye aktarılması için elektrokompotent *E. coli* DH10 β hücreleri kullanıldı. Yukarıdaki işleme göre hazırlanan elektrokompotent *E. coli* DH10 β hücrelerinin bulunduğu tüpler alınarak buza yerleştirildi elektrokompotent hücrelerin üzerine 1-3 μ l ligasyon ürünü bırakıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dk buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nin elektriksel tetik kısmına yerleştirilerek elektrik uygulandı. Kuvvetler cihazdan alınarak içlerine 1 ml LB besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra tüm karışım steril bir cam tüpe bırakılarak 37 °C'de 200 rpm'de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktararak 6000 \times g'de 3 dk santrifüj yapıldı. Ependorfta 100 μ l kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 100 μ g/ml ampisilin içeren LB agar petrilere yayıldı. Gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda içerisinde plazmid alan hücrelerin koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.6.1.4. Plazmid DNA İzolasyonu ve Klonların Seçimi

Plazmid DNA'larını izole etmek için 100 μ g/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmid DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Bunun için gece kültürleri 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 μ l kalacak şekilde döküldü ve çökelti kalan süpernatant içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 300 μ l 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 μ l 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 μ l %100'lük etanol ilave edilerek 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 μ l ddH₂O'da çözüldü.

İzolasyonu gerçekleştirilen rekombinant plazmidlerin CIV157L'nin baş bölgesini, son bölgesini ve majör kapsid proteini promotörü ile *gfp* geninin füzyon edildiği DNA bölgesini içerip içermedikleri restriksiyon analizi ile kontrol edilerek doğrulandı.

Restriksiyon analizi için rekombinant plazmidler hazırlanan primerlerin uçlarındaki restriksiyon tanıma bölgelerine uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edildiler. Restriksiyon enzimi ile gerçekleştirilen bir kesim reaksiyonu Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Plazmid	7 µl
10× restriksiyon enzimi reaksiyon tamponu	4 µl
Restriksiyon enzimi	1 µl
ddH ₂ O	28 µl
Toplam hacim	40 µl

Tablo 8'de belirtildiği gibi hazırlanan reaksiyon karışımları 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından reaksiyon karışımları %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı ve jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. Jelde görüntülenen DNA bantlarının doğruluğunun dizin analizi ilede teyit edilmesi gerekmektedir. Bunun için klonlanan DNA fragmanını içerdiği belirlenen klonlardan 2 tanesinden 5 ml ampisilinli LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültürler, 14.000 rpm'de 2 dk boyunca çöktürüldükten sonra "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega, Kat No: A1360 USA) kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Plazmit DNA konsantrasyonları nanodropda ölçülerek belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek Macrogen Firmasına (Hollanda) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi. Dizi analizi için pJET 1.2 ileri ve geri primerleri kullanıldı.

2.6.1.5. Transfer Vektörünü Oluşturacak DNA Fragmentlerinin Birleştirilmesi

pJET 1.2 küt uç klonlama vektöründe CIV157L ORF'sinin 611 bp'lik aşağı kısmını ihtiva eden plazmid (pJd1), çoğaltılan primerlerdeki kesme bölgeleri (*HindIII* ve *XhoI*) kullanılarak kesildi. Aynı anda pBlueScript SK (-) vektörü de aynı enzimler ile kesildi. Kesim reaksiyonları daha önce belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kesim reaksiyonu sonucunda her bir tüp içeriği %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Kesim sonucu oluşan DNA bantları jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı. Ürünün jelden temizlenmesi, DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) ve bu kitede bulunan yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Jelden temizlenen DNA fragmentlerinin miktarı nanodropta belirlendi ve ligasyon reaksiyonu ligasyon hesaplama motoru kullanılarak oluşturuldu. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ligasyon reaksiyonu *E. coli* DH10 β elektrokompotent hücrelerine transform edildi. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerden gece kültürleri hazırlandı. Plazmid DNA'larının izolasyonu için, hızlı miniprep metodu kullanıldı. İzole edilen plazmid DNA'ların CIV157L geninin aşağı bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları yine *HindIII* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek DNA fragmentinin içlerindeki varlığı araştırıldı. Kesim sonucu yaklaşık 611 bp büyüklüğündeki DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. Bunlardan bir tanesi pBS-D1 olarak isimlendirildi ve takip eden aşamada CIV157L'nin yukarı kısmına ait DNA fragmentini klonlamak için kullanıldı.

CIV157L'nin yukarı kısmına ait DNA fragmentini içeren pBS-D1 ve pJET 1.2 blunt klonlama vektöründe CIV157L ORF'sinin 626 bp'lik yukarı kısmını ihtiva eden plazmid (pJu3), primerlerdeki enzimler (*NotI* ve *EcoRI*) kullanılarak kesildi. Kesilen DNA fragmentleri jelden temizlendi ve uygun şekilde ligasyonları sağlandı. Ligasyon ürünü, *E. coli* DH10 β elektrokompotent hücrelerine aktarıldı. Oluşan kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidlerin doğrulanması için restriksiyon enzimleriyle (*NotI* ve *EcoRI*) kesim işlemi yapıldı. Kesim sonucu yaklaşık 626 bp büyüklüğünde ki DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi. Belirlenen klonlardan bir tanesi pBS-DU3 olarak isimlendirildi ve füzyon yapı haline getirilmiş CIV *mcp* promotörü ve *gfp* genine ait DNA fragmentini klonlamak için kullanıldı.

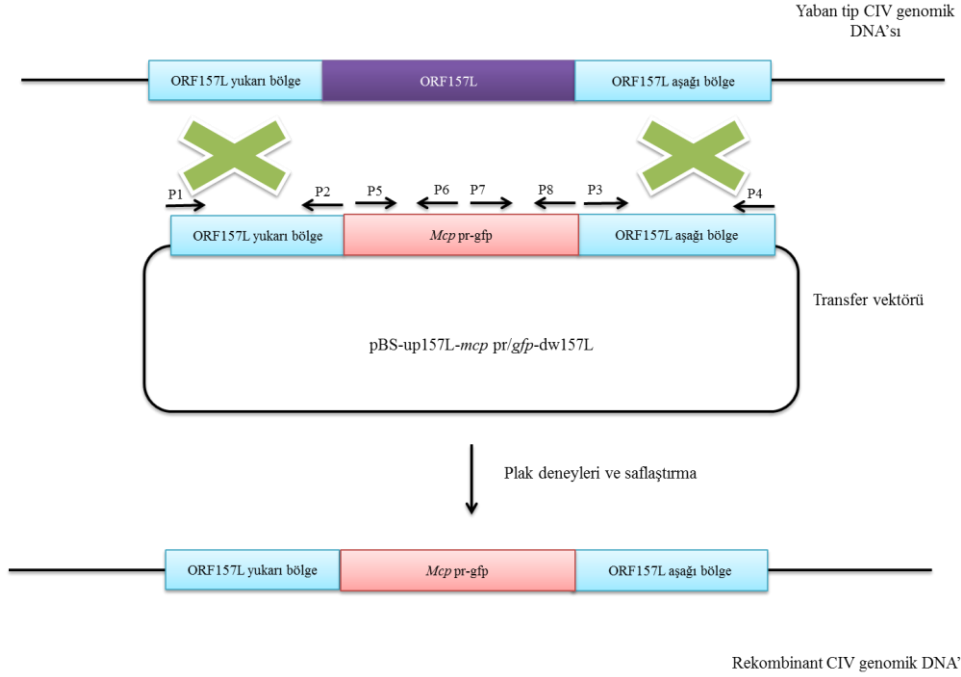
CIV157L'nin yukarı ve aşağı kısımlarına ait DNA fragmentini içeren pBS-DU3 ve pJet 1.2 blunt klonlama vektöründe füzyon yapı halinde klonlanmış olan CIV *mcp* promotörü ile *gfp* genine ait DNA fragmentini içeren plazmid (pJmg6), primerlerdeki

enzimler (*EcoRI* ve *HindIII*) kullanılarak kesildi. Kesilen DNA fragmentleri jelden temizlenerek ligasyonları sağlandı. Ligasyon ürünü, *E. coli* DH10 β elektrokompotent hücrelerine aktarıldı. Transfeksiyon sonucu oluşan kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve klonlanan DNA fragmentinin varlığı yine restriksiyon enzimleri ile kontrol edildi. Elde edilen doğru klonlardan bir tanesi seçildi ve pBS-up157L-*mcp* pr/*gfp*-dw157L olarak adlandırıldı. Bu şekilde transfer vektörü oluşturuldu ve transfeksiyon deneyinde kullanılmak amacıyla bu plazmidten midiprep kiti (PureLink HiPure Plasmid, Invitrogen) kullanılarak bol miktarda izole edildi.

2.7. Transfeksiyon; Homolog Rekombinasyonun Sağlanması

İnşa edilen transfer vektöründe bulunan *gfp* geninin viral genomda 157L geni yerine yerleşebilmesi için transfeksiyon yapıldı. Bunun için BRL-AG-3A hücreleri altı gözlü hücre kültürü kaplarına her bir gözü %80 dolduracak şekilde bırakıldı ve kaplar yaklaşık 4 saat hücrelerin tutunmaları için inkübatörde 28 °C bekletildiler. Daha sonra hücrelerin üzerindeki sıvı alındı ve 5 μ g/ml konsantrasyonunda yaban tip CIV ile inoküle edildiler. Virüsün hücrelere tutunması için, hücreler 2 saat boyunca 2 rpm hızına ayarlanmış sallayıcı platform üzerinde bekletildiler. İki saatin sonunda, her bir gözdeki enfeksiyon sıvısı uzaklaştırıldı, katkısız TNMFH besiyeri ile yıkandı ve 2 ml FBS'li besiyeri eklenerek 28 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin bitimine doğru transfeksiyon karışımı hazırlandı. Bir tüpe 5 μ g DNA (pBS-up157L-*mcp* pr/*gfp*-dw157L) son hacim 100 μ l olacak şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltildi. Bir başka tüpe ise 85 μ l FBS'siz besiyeri ve 15 μ l lipofektin (Invitrogen, Kat No: 18292-011) bırakıldı. Her iki tüp oda sıcaklığında 20 dk bekletildi ve bekleme süresinin sonunda, tüp içerikleri birbirine karıştırıldı. Bu karışım 20 dk daha oda sıcaklığında bekletildi. Bu arada hücrelerin üzerinden enfeksiyon sıvısı alındı ve hücreler FBS'siz besiyeriyle yıkandı. Hazırlanan 200 μ l'lik transfeksiyon karışımı ve 800 μ l FBS'siz besiyeri hücrelerin üzerine bırakıldı. Tekrar 5 saat oda sıcaklığında 2 rpm'de sallandı. 5 saatin sonunda eski besiyeri çıkarıldı ve 2 ml FBS'li besiyeri eklenerek 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre zarfında hücrelerde transfer vektörü ve yaban tip viral DNA arasında homolog rekombinasyonun oluşması sağlandı. İnkübasyon sırasında, Auxovert floresan inverted mikroskop ile bakılarak hücrelerde yeşil rengin oluşumu, bir başka deyişle *mcp* promotörü altında GFP proteininin ifadesinin ortaya

çıkışı beklendi. Yaklaşık 5 gün sonra, ortamdaki GFP proteinin çokluğuna bakılarak hücreler besiyeriyle toplandı ve $2500 \times g$ 'de 15 dk santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak muhafaza edildi. Transfer vektörü ve viral DNA arasında homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi olayı Şekil 11'de şematize edilmiştir.



Şekil 11. Transfer vektörü ve viral DNA arasındaki homolog rekombinasyon olayı.

2.8. Plak Deneyi

Transfeksiyon işleminden sonra elde edilen virüs süspansiyonu, hem rekombinant (rCIV- Δ 157L-*gfp*) hem de yaban tip CIV'leri içermektedir. Karışık viral süspansiyondan rekombinantları seçmek için BRL-AG-3A hücreleri kullanılarak plak deneyi gerçekleştirildi (Dulbecco ve Vogt, 1953). Bunun için, BRL-AG-3A hücreleri, gözler %80 dolu olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına bırakıldı ve tabana tutunması için yaklaşık 4-5 saat $28 \text{ }^\circ\text{C}$ etüvde bekletildi. Transfekte hücrelerin üzerinden topladığımız transfeksiyon sıvısından son hacim 900 μl olacak şekilde seyreltikler (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) hazırlandı. Her bir seyreltik farklı bir gözdeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Hücre-virüs karışımı, 2 saat 2 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. Bu arada %2,5 olacak şekilde Sea

plaque agaroz ddH₂O'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. Üzerlerinden enfeksiyon sıvısı alınan hücrelerin üzerine 2,5 ml agaroz besiyeri karışımı bırakıldı. Agarozun tamamen donması için, kapağı açık şekilde bekletildi. Agaroz donduktan sonra 6 gözlü kabın kapağı kapatıldı. Hücre kültür kabı, ddH₂O 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 öbekler alındı ve bunlar buradaki rekombinant virüsün sayısının artırılması amacı ile BRL-AG-3A hücrelerinde enfeksiyon için kullanıldı. Çoğaltılan virüs kullanılarak tekrar plak deneyi yapıldı. Plak deneyi bu şekilde 7 kez tekrarlandı.

2.9. Rekombinant Virüsün Saflığının Araştırılması

En son plak deneyinden alınan virüsün saflığını (yaban tip virüsten tamamen arınmış olduğunu) kontrol etmek ve 157L geninin CIV genomundan tamamen silindiğini doğrulamak için PCR analizi yapıldı. BRL-AG-3A hücreleri 7. plaktan alınan virüs ile enfekte edildiler. Kontrol olarak yaban tip virüs ile enfekte ve enfekte olmamış BRL-AG-3A hücreleri kullanıldı. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücreler toplandı ve 2500 ×g'de 15 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı oluşturan ve virüs ihtiva eden BRL-AG-3A hücrelerinden doku PCR kiti (The Phire Animal Tissue Direct PCR; Finnzymes) kullanılarak PCR yapıldı. P1/P4 ve P9/P10 primerleri (Bakınız Şekil 14) kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden temizlendi. Jelden temizlenen PCR ürünlerinin dizi analizi yaptırıldı.

2.10. Rekombinant Virüsün Çoğaltılması ve Stok Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Saf olduğu belirlenen rekombinant virüs (rCIV-Δ157L-*gfp*) stok oluşturmak amacı ile BRL-AG-3A hücrelerinde çoğaltıldı. Hücreler rCIV-Δ157L-*gfp* rekombinant CIV ile büyük ölçekli hücre kültürü kaplarında (75 cm²'lik flasklar) enfekte edildi. Yaban tip virüs

için de aynı ölçekdeki hücre kültür kaplarında enfeksiyon yapıldı. Hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. Elde edilen her bir virüse ait süspansiyon 2500 ×g'de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant ~20000 ×g'de 30 dk santrifüj edilerek virüs konsantre edildi.

Virüs konsantrasyonu doku kültüründe ki hücrelerin %50'sini enfekte eden doz (Tissue Culture Infectious Dose; TCID₅₀) metoduna göre belirlendi.

2.11. Rekombinant Virüsün Yaban Tip Virüs ile Karşılaştırılması

Oluşturulan rekombinant virüs ile yaban tip virüs BRL-AG-3A hücre kültürü kullanılarak oluşturdukları enfeksiyon, restriksiyon profili, toplam protein profili ve DNA replikasyonu bakımından karşılaştırıldılar.

2.11.1. Tek-Basamak Büyüme Eğrilerinin Karşılaştırılması

Rekombinant virüsün hücre kültüründeki enfektivitesini yaban tip virüs ile karşılaştırmak için tek basamak büyüme eğrisi oluşturuldu. Bunun için hücreleri hem yaban tip CIV ile hem de rekombinant CIV ile hücre başına enfektif 1 virüs (MOI=1) olacak şekilde enfekte edildi, 2 saat süren tutunmadan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler FBS katkısız besiyeriyle yıkanarak tutunmayan virüsler uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine %10 FBS içeren TNM-FH besiyeri ilave edildi. Hücreler 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 ve 72. saatte toplandı ve 2500 ×g'de 15 dk santrifüj edildi. Virüs içeren süpernatantlar, yaban tip ve oluşturulan rekombinant virüslerin enfektivite ve üretim bakımından hücre kültüründe karşılaştırılması amacıyla kullanıldı. Bu karşılaştırma işlemi virüs konsantrasyonunun hesaplanması ile gerçekleştirildi. Konsantrasyon hesabı için de yukarıda anlatıldığı gibi TCID₅₀ metodu kullanıldı. Deneyler 3 kez tekrar edildi ve ortalama alındı. Kontrol olarak enfekte edilmemiş BRL-AG-3A hücreleri kullanıldı. Elde edilen veriler kullanılarak grafik çizildi.

2.11.2. Restriksiyon Profillerinin Karşılaştırılması

Rekombinant virüs ile yaban tip virüs DNA'ları restriksiyon profilleri çıkarılarak karşılaştırıldı. Bunun için BRL-AG-3A hücreleri yukarıda tarif edildiği gibi hem yaban tip CIV ile hem de rekombinant CIV ile enfekte edildi. Enfeksiyonu takip eden dördüncü günde virüs ihtiva eden süpernatantlar elde edildi. Restriksiyon analizinde kullanılmak amacıyla DNA izolasyon kitinin (Analytikjena/Biometra) prosedürüne uygun olarak viral DNA'lar izole edildi. Viral DNA (2,5 µg) *EcoRI* ve *NcoI* (Promega) restriksiyon enzimleri kullanılarak 37 °C'de 4 saat kesildi ve kesilmiş viral DNA %1'lik agaroz jelde 20 volt da 24 saat boyunca yürütüldü. DNA fragmentleri EtBr (50 ng/ml) kullanılarak 15 dk boyandı ve görüntüsü Kodak MI Jel görüntüleme cihazıyla kaydedildi.

2.11.3. Toplam Protein Profillerinin Karşılaştırılması

BRL-AG-3A hücreleri hem yaban tip hem de rekombinant CIV ile MOI=5 olacak şekilde enfekte edildi ve enfeksiyondan 3 gün sonra hücreler toplandı. Pelletler toplam protein profillerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Eşit miktardaki hücresel lizatları üzerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dk bekletildi. Daha sonra hücre ekstraktları %12'lik SDS-PAGE'e Laemmli (1970) yüklendi. Jele 30 mA (miliamper) akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (%0.125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile (Neuhoff vd, 1985) 1 saat boyandı ve hemen ardından yıkama çözeltisinde (%36 Metanol, %9 Asetik Asit) 1-2 saat yıkandı. Jel görüntüsü, tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.11.4. Western Blot Analizi

BRL-AG-3A hücreleri hem yaban tip hem de rekombinant CIV ile MOI=1 olacak şekilde enfekte edildi. Enfeksiyonun 48. saatinde hücreler toplandı ve 2500 ×g'de 15 dk santrifüj edildi. Eşit miktardaki hücresel lizatları yukarıda belirtildiği gibi %12'lik SDS-PAGE jele yüklendi. Yürütme işlemi, 30 mA'lık akım altında ve protein marker eşliğinde

uygulandı. Semi-Dry elektroforetik cihaz kullanılarak poliakrilamid jeldeki proteinler immobilon membrana aktarıldı. Bunun için Immobilon-P membranı ve whatman kâğıtları poliakrilamid jel büyüklüğünde kesildi. Membran ve kâğıtlar elektroblotlama tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glycine, %0,0375-w/v SDS) ıslatıldıktan sonra cihaza 2 whatman kâğıdı, 1 immobilon-P membranı, poliakrilamid jel ve 2 whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildiler. Cihaz 40 mA'de 1 saat çalıştırıldı ve böylece blotlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından membran PBS de hazırlanmış %0,3'lük süt tozunda 2 dk yıkandıktan sonra 3 saat oda sıcaklığında yine PBS' de hazırlanmış %3'lük süt tozu içinde bloke edildi. Ardından 3 kere 10'ar dk %0,3'lük süt tozunda yıkandı. 1:1000 oranında olacak şekilde sulandırılmış Anti-gfp antikor (Abcam, ab6673) içeren %0,3'lük süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak 1 saat boyunca inkübe edildi. Tekrar 3 kere 10'ar dk %0,3'lük süt tozu içinde yıkandı. Ardından 1 saat Anti IgG-Alkalin Fosfataz antikor (1:1000 sulandırma) (Sigma, A-3562) içeren %0,3'lük süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak 1 saat boyunca inkübe edildi. Sonra tekrar 3 kez 10'ar dk %0,3'lük süt tozu içinde ve 2 kezde 10'ar dk AP (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5, 1X) tamponu içinde yıkama gerçekleştirildi. Son olarak membran 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stock solution, Roche, 11681451001) içeren 10 ml AP tamponu içinde boyandı. Reaksiyon, membranın bolca dH₂O ile yıkanmasıyla durduruldu.

2.11.5. DNA Replikasyonlarının Slot-Blot Hibridizasyonu ile Karşılaştırılması

Yaban tip ve rekombinant CIV'in DNA replikasyonları 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 hem rekombinant CIV ile homoloji sağlaması gerekmektedir. Bunun için, majör kapsid proteini açık okuma zincirinin içerisindeki bir bölgeden yararlanıldı. Yaklaşık olarak 400 bp'lik bir bölge uygun primerler kullanılarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldü. İstenilen büyüklükteki DNA bandı jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) kullanılarak gerçekleştirildi. Temizlenen DNA %1'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 dk 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 dk bekletildi ve reaksiyon durduruldu. Hazırlanan prob, kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Probun hazırlanmasının ardından, BRL-AG-3A hücreleri, her bir gözde 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücreler, tutunma işlemi tamamlandıktan sonra, MOI=5 olacak şekilde, yaban tip ve rekombinant CIV ile ayrı ayrı enfekte edildi. Enfekte edilen hücrelerden, 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde örnekler alındı. Belirlenen sürelerde, hücreler ve hücre sıvısı tamamen alınıp 2500 \times g de, 15 dk, 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan pellet, 800 μ l, 0,5 M sodyum hidroksit içinde lizis edildi. Lizis işleminden sonra 80 μ 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 μ l alınıp yeni bir tüpe bırakıldı. Tüpler, 10 dk kaynayan suda bırakıldı ve kaynatma işleminden sonra hemen buza alınarak soğutuldu. Diğer yandan, membran uygun ölçülerde kesildi, 6xSSC (saline-sodium citrate) tamponunda (20xSSC için; 175,3 gr NaCl, 88,2 gr $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) 5 dk yıkandı ve slot-blot aletinde iki levhanın arasına yerleştirildi. Kaynatılan örnekler, belli bir düzen içinde kuyucuklara yerleştirildi. Vakum yapılarak, kuyucuklardaki örneklerin membrana geçmesi sağlandı. Slot-blot aletinden çıkarılan membran, 2xSSC ile 2 dk yıkandı ve üç kat kurutma kağıdının arasında, oda ısısında 30 dk 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 (%0,1 w/v N-lauroylsarcosine, %0,02 w/v SDS, 1/10 blocking solution, 10 \times vial 6, 10 ml 5XSSC) -20 °C'den çıkarılıp eritildi, kaynayan su içinde 10 dk kaynatıldı ve hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Örneklerin emdirildiği membran, hibridizasyon şişesine alındı. Soğutulan hibridizasyon tamponu, şişedeki membranın üzerine boşaltıldı. Hibridizasyon

fırınına yerleştirilen şişe, 45 °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. Probun eklendiği tampon, kaynayan su içinde 10 dk 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 45 °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 problemler uzaklaştırıldı. Yıkanan membran, bloklama solüsyonundan geçirildi. Ardından Anti-DIG (20 ml blotlama solüsyonu içerisinde vial 4) içerisine bırakıldı. DIG ile Anti-DIG solüsyonunun bağlanması sağlandıktan sonra, membran yeniden yıkama işlemine tabi tutuldu. Membran, tespit tamponunda (0,1 M Maleik asit, 0,15 M NaCl, pH 7,5) yıkama işleminden sonra, renk tamponunda renk oluşumu gözleninceye kadar karanlıkta bırakıldı.

2.12. *Galleria mellonella* Larvalarının Rekombinant CIV ile Enfekte Edilmesi

Rekombinant virüsün böcekte enfeksiyonunu gözlemleyebilmek için *Galleria mellonella* larvalarına enjeksiyon yapıldı. Larvalar rekombinat ve yaban tip virüsler ile 30 G1/2 iğne kalınlığına sahip enjektör ile enfekte edildi. Enfekte edilen larvalar 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. Larvalardaki enfeksiyon gelişimi floresan mikroskobu altında görüntülendi.

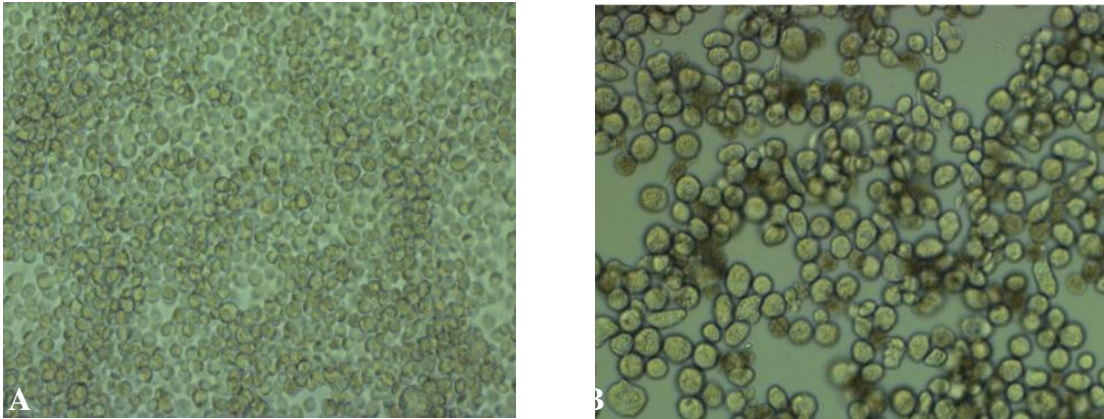
3. BULGULAR

3.1. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Chilo iridescent virüs (CIV) öncelikle *Galleria mellonella* (büyük balmumu güvesi) larvalarında çoğaltıldı. Virüs ile enfekte edilen larvalar üç hafta boyunca oda sıcaklığında bekletildiler. Bu arada larvalarda hareket sınırlılığı, büyüme yavaşlaması, beslenmede azalma gibi belirtiler tespit edildi. Bu süre sonunda larvalar alınıp $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildiler.

Hücre kültüründe BRLAG-3A hücrelerini CIV ile enfekte edebilmek için enfeksiyonlu *Galleria mellonella* larvalarından CIV izole edildi. Konsantrasyon spektrofotometre ile ölçüldü ve $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi.

Larvadan izole edilen CIV kullanılarak BRL-AG-3A hücreleri enfekte edildi. Enfeksiyonu takip eden 2. günde hücrelerde şişme, çekirdeğin büyümesi ve hücrenin bir tarafına çekilmesi şeklinde sitopatik etkiler gözlemlendi. Viral enfeksiyon sonucu oluşan sitopatik etkiler hücrelerde art arda gerçekleştirilen sekiz pasaj boyunca gözlemlendi (Şekil 12).

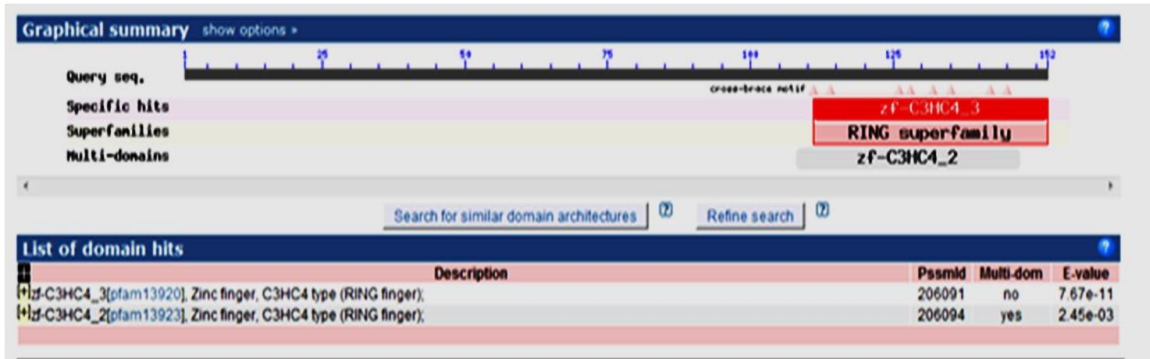


Şekil 12. *Chilo iridescent* virüs'ün BRL-AG-3A hücrelerinde oluşturduğu sitopatik etkiler. A: Kontrol, enfekte olmamış BRL-AG-3A hücreleri. B: CIV ile enfekte edilmiş BRL-AG-3A hücreleri. Enfeksiyonu takip eden 96. saat. Büyütme: 20X

BRLAG-3A hücrelerinde çoğaltılan CIV'in konsantrasyonu TCID₅₀ metodu ile 1,90X10¹¹ pfu/ml olarak hesaplandı.

3.2. CIV 157L Geninin Biyoinformatik Analizi

IAP proteinleri amino uçlarında bulunan Baculovirüs IAP tekrarı olarak isimlendirilen protein motifine sahip olup olmamasıyla tanımlanır. Genellikle IAP proteinleri 1-3 tane BIR motifine sahiptir. BIR motifi bazı kaspazların inhibisyonunda ve dolayısıyla IAP proteinlerinin anti apoptotik işlevlerinden sorumludur. Bu noktada Conserved Domain Search Service (CD Search)/ncbi programı kullanılarak yapılan biyoinformatik analize göre CIV 157L geninin C-terminalinde RING finger motifi (C3HC4)'i bulundururken, N terminalinde ise BIR motifi bulundurmadığı tespit edildi (Şekil 13).

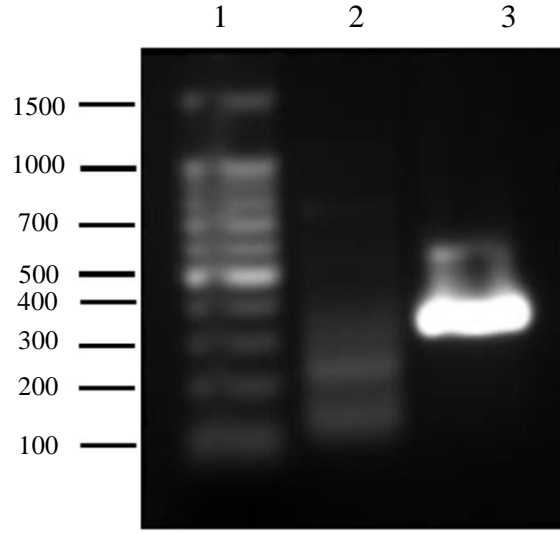


Conserved Domain Search Service (CD Search)/ncbi

Şekil 13. CIV 157L geninin biyoinformatik analizi

3.3. CIV 157L Geninin Transkripsiyonel Analizi

BRL-AG-3A hücrelerinde CIV 157L muhtemel apoptosis inhibitör geninin transkriptinin varlığını belirlemek için CIV ile enfekte olmuş hücrelerden enfeksiyondan sonra 24. saatte alınan örnekten RNA izolasyonu yapıldı ve özel primerler kullanılarak yapılan geri transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) sonucunda 341 bp büyüklüğünde beklenen bant elde edildi (Şekil 14).



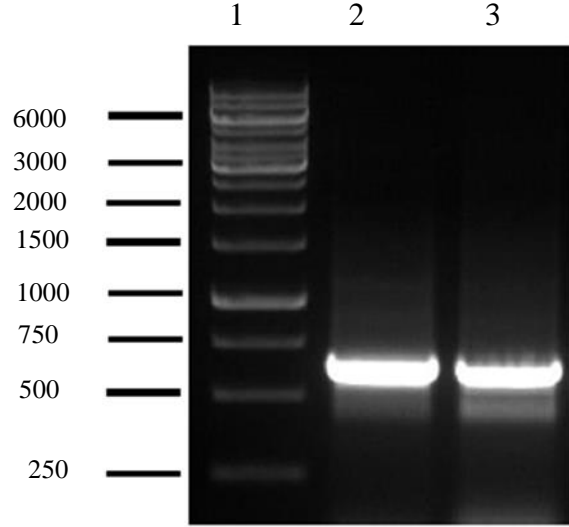
Şekil 14. CIV157L muhtemel apoptosis inhibitör geninin transkripti 1: 100 bp marker, 2: BRL-AG-3A hücrelerinden, 3: CIV ile enfekte edilen BRL-AG-3A hücrelerinde elde edilen RT-PCR ürünü (341 bp). %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

3.4. Rekombinant *Chilo Iridescent Virüs*'ün Oluşturulması

3.4.1. Transfer Vektörünün Oluşturulması

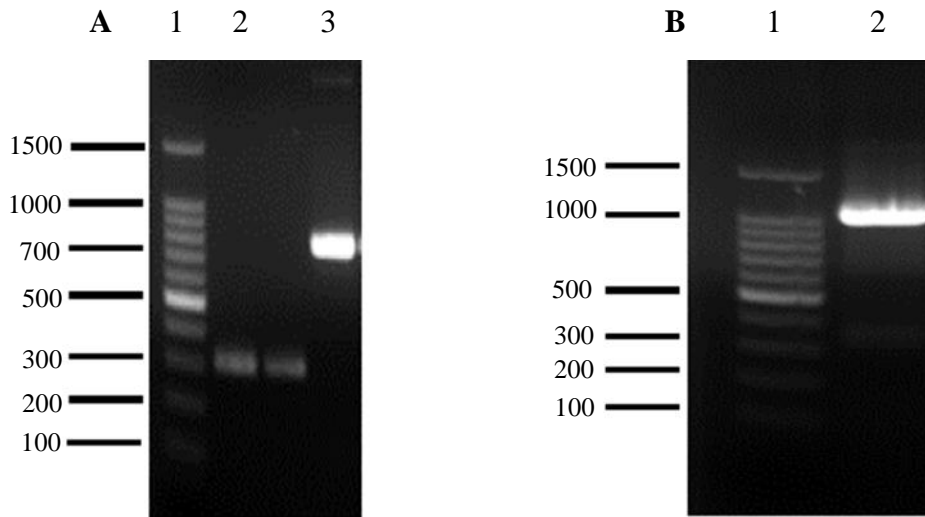
GFP içeren rekombinant transfer vektörünü oluşturmak amacıyla 157L geninin yukarı ve aşağı bölgesi, ardından *mcp* promoru ve *gfp* gen DNA dizileri PCR ile çoğaltıldı ve jelde yürütülüp görüntülendi.

Şekil 15'de homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan homolog bölgelerin elde edilmesi amacı ile çoğaltılan CIV 157L geninin 626 ve 611 bp'den oluşan yukarı ve aşağı bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 15. CIV157L'ye ait aşağı ve yukarı bölgelerin PCR ile çoğaltılması 1: 1kb DNA marker, 2: CIV157L yukarı bölge (626 bp), 3: CIV157L aşağı bölge (611 bp). %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

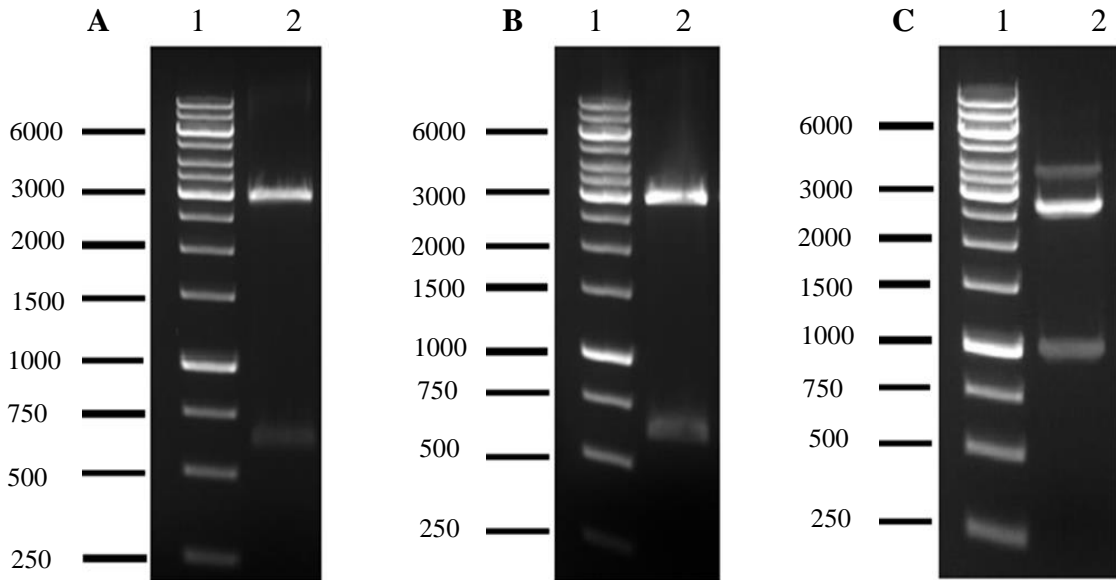
Şekil 16 (A)'da ise çoğaltılan *mcp* promotörü ve *gfp* geni DNA dizileri gösterilmiştir. 16 (B)'de ise *mcp* promotörü ve *gfp* DNA dizilerinin füzyon PCR ile birleştirilmiş jel görüntüsü görülmektedir ve 1032 bp'den oluşmaktadır.



Şekil 16. Majör kapsid protein promotörü ve yeşil floresan proteini genine (*gfp*) ait jel görüntüsü. A: 2; majör kapsid proteini promotörü (297 bp) 3; Yeşil floresan proteini (*gfp*) geni (735 bp), B: 2; majör kapsid proteini promotörü ve *gfp* füzyon PCR ürünü (1032 bp), 1: 100 bp marker. %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

Bahsedilen DNA dizileri PCR ile çoğaltılırken 3'→5' ekzonükleaz (hataları doğrulama) aktivitesine sahip Phusion DNA polimeraz enziminin kullanıldığını belirtmiştik. Phusion DNA polimeraz enzimi bu özelliğinin yanında PCR ürünlerinde küt uç bırakır. Transfer vektörümüzde bulunan restriksiyon enzimi bölgelerine göre kesme ve yapıştırma işlemlerini gerçekleştirmek, yoğun miktarda DNA'ya sahip olmak ve bu DNA dizilerinin dizi analizini gerçekleştirmek amacı ile PCR ürünlerimizi pJET 1.2/ blunt klonlama vektörüne klonladık. pJET 1.2/ blunt klonlama vektörüne küt uçlu PCR ürünleri kolaylıkla klonlanmakta ve primerlerimizin uçlarına yerleştirdiğimiz restriksiyon enzimi tanıma dizileri sayesinde DNA dizileri kolaylıkla bol miktarda kesilip alınmakta ve diğer klonlama basamakları gerçekleştirilmektedir. Bir başka deyişle pJET 1.2/ blunt klonlama vektörü ara klonlama vektörü olarak kullanılmıştır.

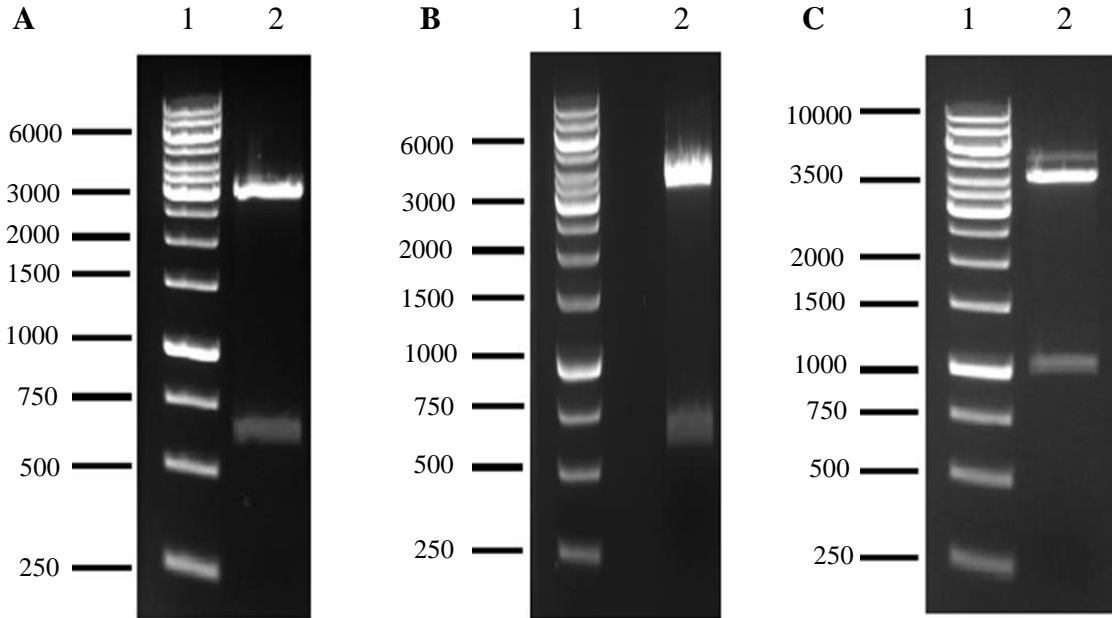
Şekil 17'de görüldüğü gibi klonlanan DNA dizileri primerlerde bulunan restriksiyon tanıma dizilerine uygun enzimler ile doğruluğunun teyidi için kesildi. Şekil 17 (A ve B)'de görüldüğü gibi sırasıyla 157L yukarı bölgesi ve aşağı bölgesi *NotI-EcoRI* ve *HindIII* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi ve 626 ve 611 bp'den oluşan bir DNA dizileri elde edildi. Aynı şekilde şekil 17 (C)'de de görüldüğü gibi mcp promotörü ve gfp füzyon DNA dizisi *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi ve 1032 bp'den oluşan bir DNA dizisi elde edildi.



Şekil 17. Transfer vektör oluşturmak için gerekli olan DNA dizilerinin klonlama vektörlerinden restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkarılması. A: 2; 157L yukarı bölgesi (626 bp) (*NotI* ve *EcoRI*), B: 2; 157L aşağı bölgesi (611 bp) (*HindIII* ve *XhoI*), C: 2; mcp promotörü ve gfp füzyon DNA dizisi (1032 bp) (*EcoRI* ve *HindIII*), 1; 1 kb marker. %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

Dizi analizi için Macrogen Firmasına (Hollanda) gönderilen ve dizi analizi yapılan DNA dizilerimiz daha önce veri tabanından elde ettiğimiz DNA dizileri ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı vasıtasıyla karşılaştırıldı ve klonlar doğrulandı.

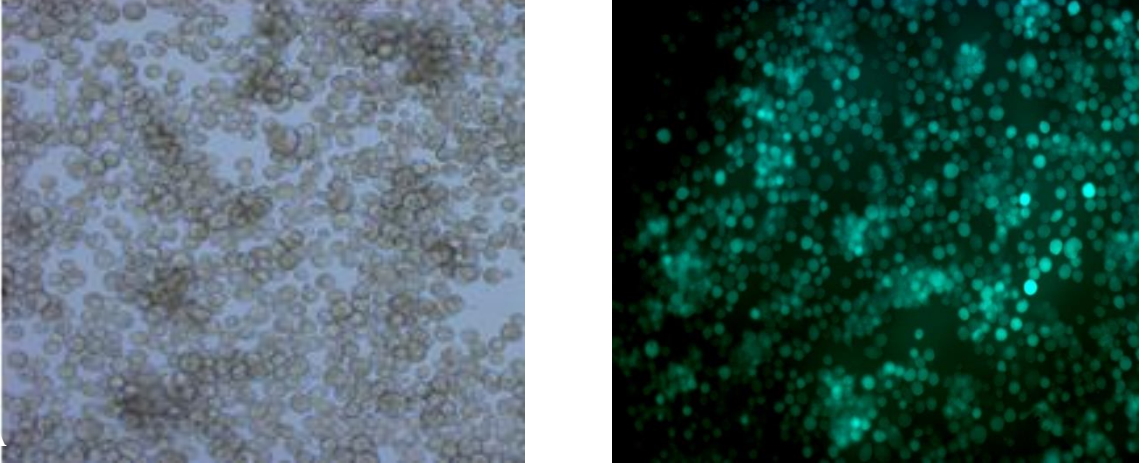
Transfer vektörü olarak pBlueScript SK(-) (2964 bp) kullanıldı. İlgili DNA fragmentleri pBlueScript SK(-) vektöründe bulunan restriksiyon enzimi tanıma bölgelerine uygun olacak biçimde ara vektörden kesilerek transfer vektöre yerleştirildi. İlk olarak 157L aşağı bölgesi, ardından 157L yukarı bölgesi ve takiben *mcp* promotörü ve *gfp* füzyon DNA dizisi yerleştirildi. Her bir klonlama aşamasından sonra klonlar ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrulandı (Şekil 18). Hazırlanan transfer vektör pBS-up157L-*mcp* pr/*gfp*-dw157L olarak adlandırıldı.



Şekil 18. Yapılandırılan transfer vektörün (pBS-up157L-*mcp* pr/*gfp*-dw157L) klonlama sırasına göre restriksiyon enzimleri ile doğrulanması. A: 157L aşağı bölgesi (611 bp), B: 157L yukarı bölgesi (626 bp), C: *mcp* promotörü ve *gfp* geni füzyon DNA dizisi (1032 bp), 1; 1 kb marker. %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

3.4.2. Transfeksiyon: CIV 157L Geni Çıkartılmış Rekombinant Virüsün Oluşturulması

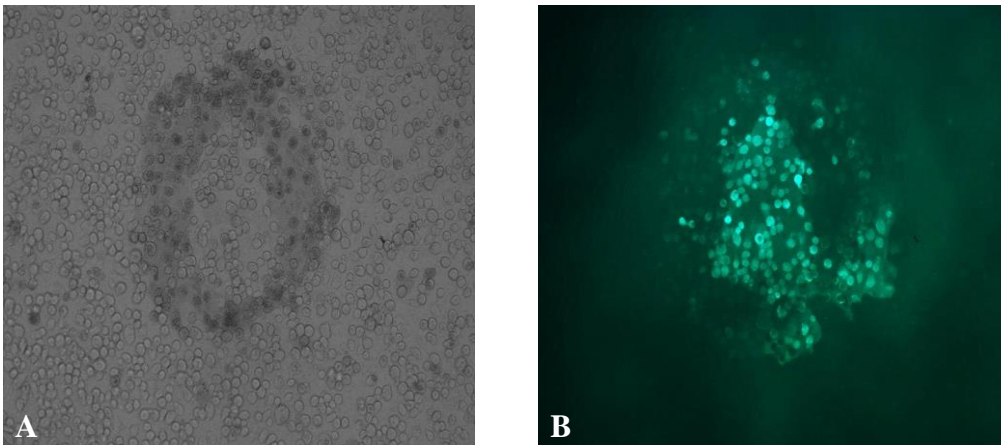
Hazırlanan transfer vektörü (pBS-up157L-*mcp* pr/*gfp*-dw157L), CIV ile enfekte BRL-AG-3A hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan dört gün sonra BRL-AG-3A hücrelerinde GFP proteininin ifade edilmesi floresan mikroskopta görüntülenen yeşil rengin oluşumuyla belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. CIV ile enfekte BRL-AG-3A hücrelerine transfer vektörünün transfeksiyonu. A: Halojen lamba altında görünüm, B: Floresan lamba altında GFP ifadesinin belirlenmesi.

3.4.3. Plak Deneyi ile Rekombinant CIV'nin Seçimi ve Saflaştırılması

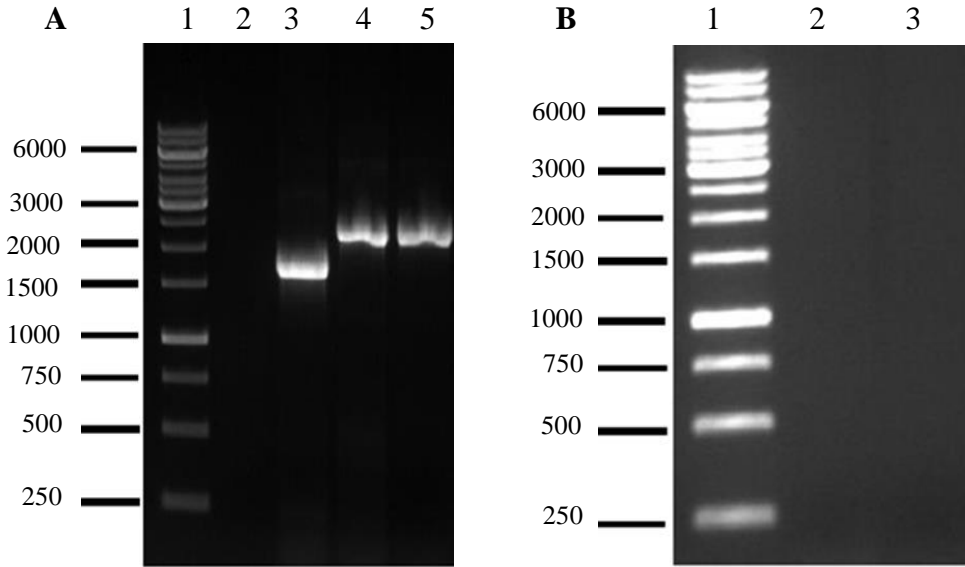
Transfeksiyonun beşinci gününde toplanan transfeksiyon sıvısından rekombinant virüsün saflaştırılması için plak deneyi yapıldı. Bu plak deneyleri saf rekombinant virüsü elde etme amacı ile yedi kez birbiri ardısıra gerçekleştirildi ve elde edilen saf rekombinant virüs rCIV- Δ 157L-*gfp* olarak adlandırıldı (Şekil 20).



Şekil 20. rCIV- Δ 157L-*gfp* ile BRL-AG-3A hücrelerinin enfeksiyonu sonrasında oluşan plak görüntüsü. A: Halojen lamba altında görünümü, B: Floresan lamba altında GFP ifadesinin belirlenmesi.

3.4.4. Rekombinant Virüsün Saflığının PCR Analiziyle Doğrulanması

En son 7. plaktan elde edilen virüsün yaban tip virüsten tamamen arındığından emin olmak amacı ile P1/P4 primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. P1/P4 kullanılarak yapılan PCR reaksiyonunda yaban tip CIV için beklenen bant yaklaşık 1700 bp ve rCIV- Δ 157L-*gfp* virüsünden beklenen bant ise yaklaşık 2270 bp olarak elde edildi. Ayrıca rekombinant virüsün saflığının kontrolü için ikinci bir PCR reaksiyonunda 157L DNA dizisine ait belli bir bölgeyi çoğaltan P9/P10 primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Eğer rekombinant virüsümüz saflaşmamış olsaydı diğer bir ifadeyle ortamda halen yaban tip CIV bulunsaydı beklenen bant yaklaşık 341 bp olacaktı ve bu bant rCIV- Δ 157L-*gfp* virüsünde CIV 157L ORF'si çıkarıldığı için bulunmaz. Reaksiyon sonucunda herhangi bir bant gözlemlenmedi. Sonuç bize 7. pasajda elde edilen rekombinat virüsün tamamen saf olduğunu gösterdi. Yapılan PCR reaksiyonları sonucu elde edilen bu PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülüp (Şekil 21) görüntülendi. Ayrıca P1/P4 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi yaptırıldı ve doğru diziler ile tam bir uyum gösterdi.



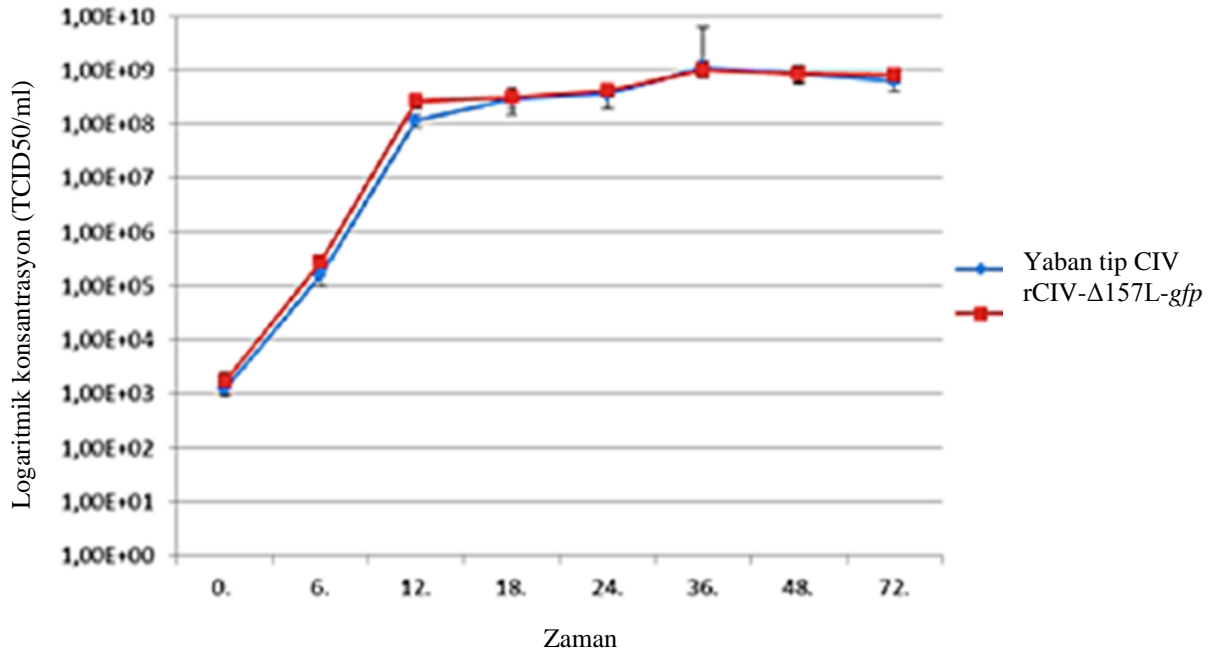
Şekil 21. Saf rekombinant CIV (rCIV- Δ 157L-*gfp*) oluşumunun P1/P4 ve P9/P10 primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle doğrulanması. A: 1; 1kb marker, 2: BRL-AG-3A hücresi, 3: yaban tip CIV(1700 bp) , 4: 7/1, 5: 7/2, nolu plaklardan alınan rCIV- Δ 157L-*gfp* ile enfekte olmuş hücrelerden yapılan doku PCR ürünlerinin jel görüntüsü (2270 bp). %1 Agaroz jelde yürütülmüştür. B: 1; 1kb marker, 2; 7/1 ve 7/2 plak örneklerinde 157L'ye ait transkripsiyon primerleri kullanılarak yapılan primerler ile rekombinant virüsün saflaştırılmasının tespiti. %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

Rekombinant CIV'nin hücre kültüründe geniş hacimli üretimi gerçekleştirildi. Elde edilen viral süspansiyonun yoğunlaştırma işlemi neticesinde ki konsantrasyonu TCID₅₀ metodu ile $2,023 \times 10^{11}$ pfu/ml olarak belirlendi.

3.4.5. Rekombinant Virüsün Yaban Tip Virüs ile Karşılaştırılması

3.4.5.1. Tek-Basamaklı Büyüme Eğrilerinin Karşılaştırılması

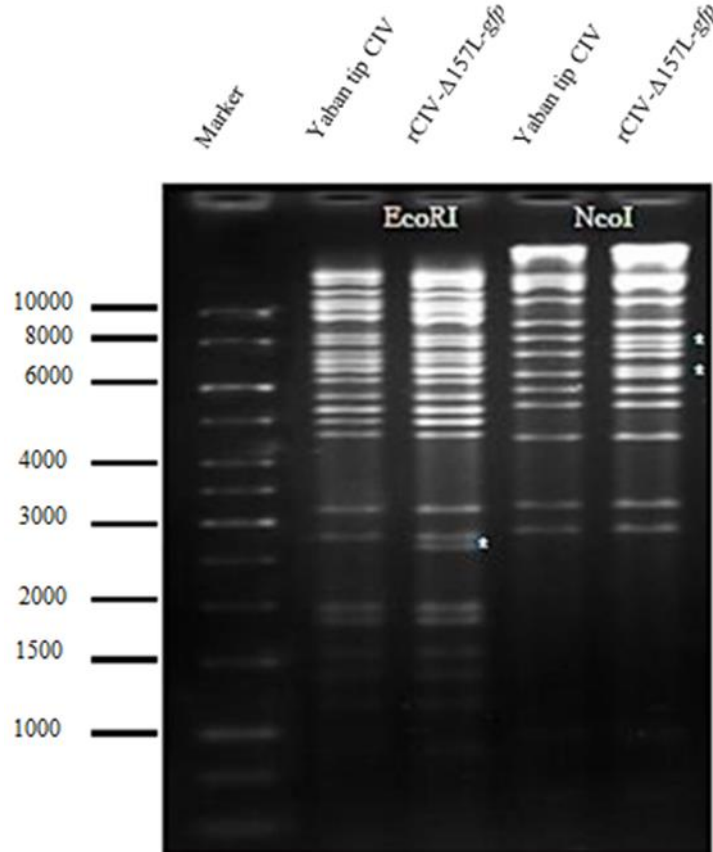
BRL-AG-3A hücreleri her iki virüs tarafından MOI: 1 olacak şekilde enfekte edildiler ve 0., 6., 12., 18., 24., 36., 48., 72. saatlerde örnekler toplandı ve santrifüj edildi. Hücre dışı virüsleri ihtiva eden süpernatant, tek basamak büyüme eğrisini belirlemek için TCID₅₀ deneylerinde kullanıldı. Hesaplamalar sonucunda elde edilen değerler her iki tip virüse ait sonuçlarda önemli bir farkın olmadığını gösterdi. Elde edilen veriler kullanılarak grafik çizildi (Şekil 22). Elde edilen bu sonuç bize CIV157L ORF'sinin CIV genomundan silinmesinin viral replikasyonu etkilemediğini gösterdi.



Şekil 22. Yaban tip CIV ve rekombinant CIV'e ait tek basamaklı büyüme eğrisi.

3.4.5.2. Viral DNA'ların Restriksiyon Profillerinin Karşılaştırılması

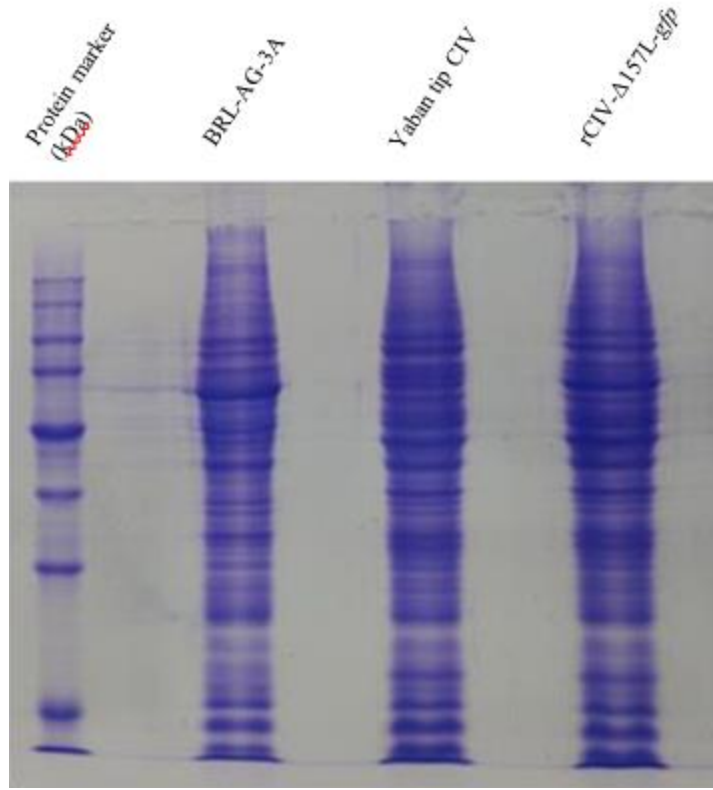
Her iki tip virüse ait viral DNA'ların restriksiyon analizleri karşılaştırıldığında rekombinat CIV'in profilinde genomuna yerleştirdiğimiz *mcpr-gfp* kasetinden kaynaklanan bantların olduğu gözlemlendi (Şekil 23).



Şekil 23. Yaban tip CIV ve rCIV- Δ 157L-*gfp*'ye ait viral DNA'nın restriksiyon analizi. Marker: 1 kb. %1 Agaroz jelde yürütülmüştür.

3.4.5.3. Toplam Protein Profillerinin Karşılaştırılması

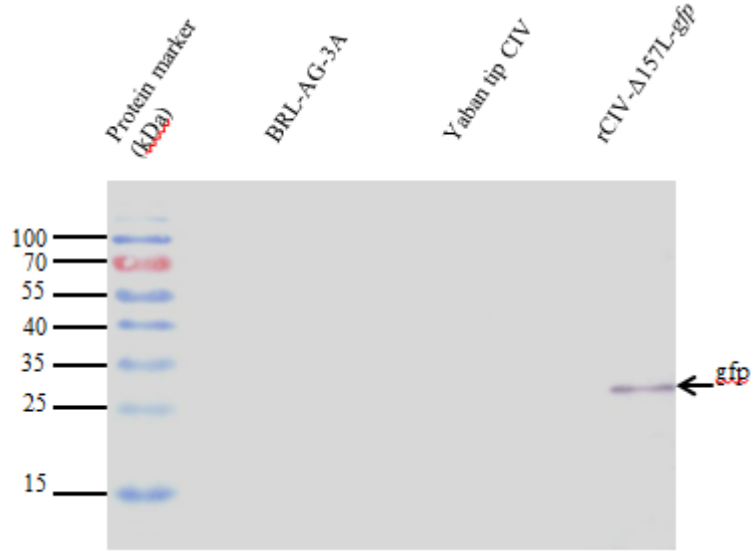
Her iki tip virüse ait toplam protein profilinin SDS-PAGE'de gösterilmesi sonucu herhangi bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 24).



Şekil 24. Yaban tip ve rekombinant CIV'e ait toplam protein profili.

3.4.5.4. Western Blot Analizi

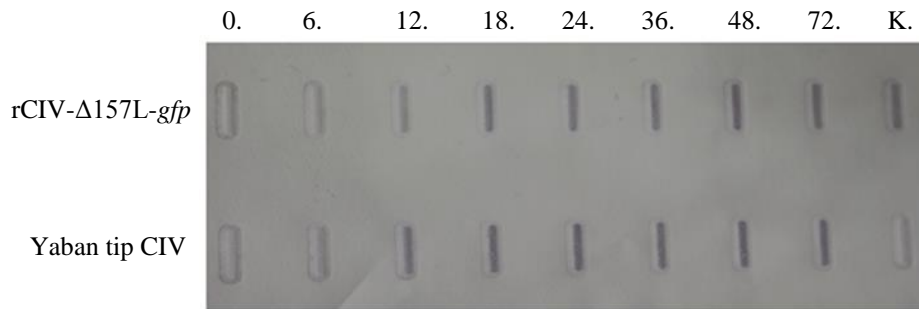
Yeşil floresan proteini antikorunu kullanılarak yapılan Western blot analizi sonucunda rekombinant CIV'e ait hücre lizatında 28 kDa ağırlığında bir bant elde edildi. Bu büyüklük yeşil floresan proteini büyüklüğüne denk gelmektedir. Yaban tip CIV ve kontrol olarak kullanılan BRL-AG-3A hücrelerinde herhangi bir banta rastlanmadı (Şekil 25).



Şekil 25. Rekombinant CIV’de GFP (28 kDa) üretiminin Western blot analizi ile gösterilmesi.

3.4.5.5. Viral DNA Replikasyonlarının Slot-Blot Hibridizasyonu ile Karşılaştırılması

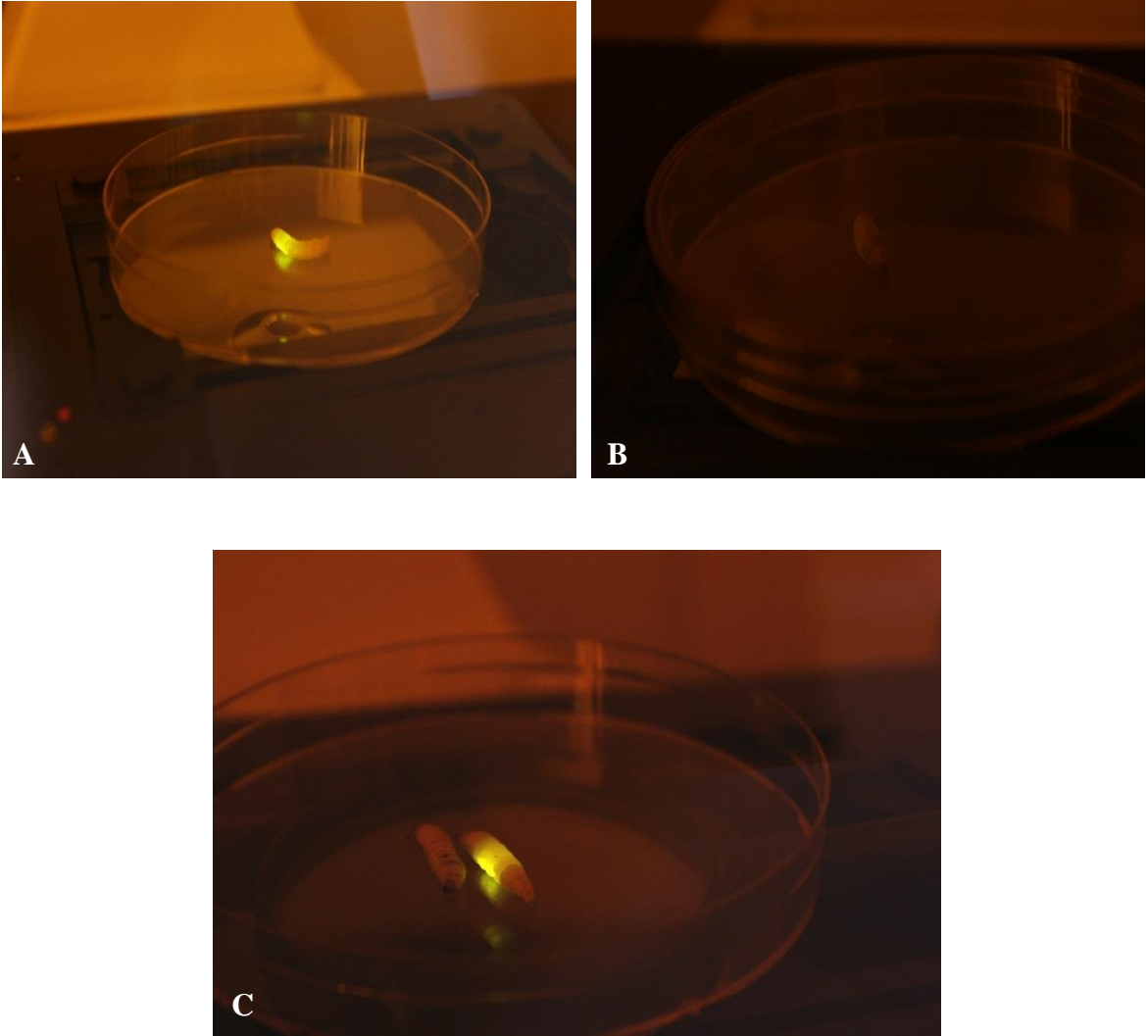
Rekombinant ve yaban tip virüslerin DNA replikasyonu, slot-blot Hibridizasyonu yöntemi ile DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Kat No: 11 745 832 910) kullanılarak belirlendi. Her iki tip virüsde DNA replikasyonunun 6. saatte başladığı gözlemlendi. Sonuç olarak hem yaban tip hem de rekombinant CIV’e ait çeşitli saatlerdeki bantlarda göze çarpan herhangi bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 26).



Şekil 26. DNA replikasyonunun Slot-blot hibridizasyonu ile gösterilmesi. Farklı saatlerdeki rekombinant ve yaban tip CIV DNA replikasyonları slot-blot hibridizasyonu yöntemi ile karşılaştırıldı. ¹

3.4.6. *Galleria mellonella* Larvalarının Rekombinant CIV ile Enfekte Edilmesi

Rekombinant CIV ile enfekte edilen *Galleria mellonella* larvaları floresan mikrokobu altında görüntülenip fotoğrafı çekildi (Şekil 27). Kontrol olarak enfekte olmamış CIV larvası da floresan ışık altında gözlemlendi ancak herhangi bir yeşil floresan görüntüye rastlanmadı.



Şekil 27. Rekombinant CIV ile enfekte edilen *Galleria mellonella* larvalarının floresan mikrokobu altında görüntülenmesi. A:enfekte larva, B: enfekte edilmemiş larva, C: enfekte ve enfekte edilmemiş larva bir arada.

4. TARTIŞMA

İridovirüsler enfekte ettikleri hücrelerin önce çekirdek ve sonrasında sitoplazmasında replike olan büyük DNA virüsleridir (Henderson vd., 2001; Williams, 1996). *Chilo iridescent virus* (CIV) olarak da bilinen Invertebrate iridescent virus 6 *Iridoviridae* familyasına ve *Iridovirüs* cinsine mensup bir böcek virüsüdür. Böcekler arasında oldukça geniş konak yelpazesine sahiptir. Araştırmalara göre Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera ordolarına mensup 100'den fazla böcek türünün CIV'ye duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Van Regenmortel., 2000). Ayrıca CIV, gen ekspresyon ve gen terapi vektörleri olarak kullanılabilme ve insan virüslerinin mekanizmalarının çalışılmasında model organizma olabilme potansiyeli taşıması bakımından da önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında ilk defa bir rekombinant invertebrate iridovirüs oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir. BRL-AG-3A hücre suşu kullanılarak homolog rekombinasyon yöntemi ile CIV genomundaki 157L lokusu silinmiş ve oluşturulan rekombinant CIV (rCIV Δ 157L-*gfp*) *mcp* promotorunun kontrolü altında bir işaret geni olan *gfp* (yeşil floresan proteini)'yi başarılı bir şekilde ifade etmiştir. 157L lokusunun yerine *mcp* promotoru altında bir işaret geni olan *gfp*'nin yerleştirilmesi virüs replikasyonunu olumsuz bir yönde etkilememiştir. Ayrıca CIV'e ait ve oldukça güçlü bir promotor olan *mcp* promotorunun oluşturulan rekombinant CIV'de iki tane oluşu ve virüs replikasyonunu etkilemeyişi ikinci bir diğer önemli husustur.

Homolog rekombinasyon ya homolog DNA fragmentleri arasındaki değişim (krosing-over) ya da bir DNA'dan diğer bir DNA'ya DNA bilgi aktarımı (gen değişimi) olarak düşünülebilir (Porteus, 2007). Büyük DNA virüslerinde homolog rekombinasyonun gerçekleşme sıklığı oldukça yüksektir (Hajos vd., 2000). Bakulovirüslerin erken protein ifade vektörleri olarak kullanılması için bu özellikten faydalanılmıştır (Smith vd., 1983). Ancak daha sonra viral bir genomun bakteriyel replikasyon orijinine sahip bir plazmide klonlanmış hali olan bakmid teknolojisi geniş ölçüde bu prosedürün yerini almıştır (Luckow vd., 1993). Gelecekte İridovirüsler için de bakmit teknolojisi mümkün olabilecektir ancak viral genomun halkasal permütasyonlu doğası ve virüs replikasyonunun başlangıcı için gerekli olan proteinlerin henüz bilinmeyişi bunu zorlaştırmaktadır (Williams vd., 2005). Homolog rekombinasyon ve uygun hücre kültürleri kullanılarak az

da olsa birkaç rekombinant omurgalı iridovirüsleri oluşturulmuştur (Chen vd., 2011; Huang vd., 2011; He vd., 2012).

Pek çok araştırmacı farklı hücre kültürlerinde CIV'nin replikasyonunu çalışmıştır (Kelly ve Tinsley, 1974; Ohba ve Aizawa, 1978; Cerutti vd., 1981; Constantino vd., 2001; Funk vd., 2001; Hunter vd., 2001, 2003). Yapılan bu çalışmaların hiç birinde omurgasız iridovirüslerin sürekli olarak başarılı bir şekilde replike olabildiği bir hücre kültürü tespit edilememiştir. Bu durum homolog rekombinasyon gibi geleneksel yöntemler ile rekombinant CIV oluşturulması girişimlerini sınırlandırmıştır. Bu nedendir ki virüs üretimi için hücre kültürü yerine şu ana kadar hep böceğin kendisi kullanılmıştır. Ancak D'Costa ve arkadaşları tarafından Kasım 2012'de yayınlanan bir makalede CIV'nin çok sayıda nesiller boyunca replike olabildiği yeni bir hücre suşunun varlığı gösterilmiştir. *Anthonomus grandis* (pamuk göz kurdu)'den geliştirilmiş BRL-AG-3A hücre suşu kullanılarak art arda yapılan 24 pasaj boyunca enfektif projeni virüs miktarında azalma meydana gelmemiştir. Bu hücre kültürünün tespiti rekombinant CIV oluşturulabilmesi için bizlere önemli bir fırsat sunmuştur. Çünkü bu tip çalışmalar sırasında, oluşacak rekombinant virüsü yaban tipten saflaştırabilmek için hücre kültüründe birkaç pasaj (5-6) seçmek gerekmektedir. CIV için yeterince üretken olmayan hücre kültürlerinde bu iş yapılamayacağından CIV için üretken olduğu yeni belirlenmiş bu BRL-AG-3A hücrelerinin varlığı çalışmanın bir bakıma başlangıç noktası olmuştur. Çalışmada CIV ile enfekte edilen *Galleria mellonella* larvalarından virüs izole edilmiş ve BRL-AG-3A hücreleri sekiz pasaj boyunca bu virüs ile bir seri enfeksiyona tabii tutulmuştur. Bütün pasajlarda aynı sitopatik etkiler gözlemlenmiştir ve bu etkiler literatürde belirtilenler ile uyumludur. Ayrıca virüsün hücrelerde geliştirdiği sitopatik etkilerin çok belirgin ve ayırdedici oluşu virüs konsantrasyonunun ve kinetiğinin belirlenmesinde büyük bir kolaylık sunmuştur.

DNA virüslerinde, viral promotorlar bir genin transkripsiyonunu düzenlemek ve desteklemek için esastır. Çalışmada GFP proteininin ifadesi için CIV'ye ait *mcp* (majör kapsid proteini) geni promotoru kullanılmıştır. MCP *Iridoviridae* ailesine mensup virüsler arasında oldukça korunmuş bir protein olup virüs parçacıklarının yapısal bileşeninin büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Tidona vd., 1998). CIV *mcp* promotorunun aktivitesi Nalçacıoğlu ve arkadaşları (2003) tarafından belirlenmiştir. Çalışmada 5' UTR bölgesinde yüksek aktivite gösteren ve başlangıç kodunu dahil *mcp* gen bölgesinden 18 bp içeren toplam 297 bp dizi, başlangıç kodunu hariç yeşil floresan proteinini kodlayan *gfp* geninin

5' bölgesi ile PCR yöntemi kullanılarak birleştirilmiştir. Birleştirilen bu bölgenin dizi analizi yapıp doğruluğu gözden geçirilmiştir. *mcp* promotörü altında *gfp* geninin ifadesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. GFP proteininin varlığı virüsün çoğalması üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermemiş ve larvalara enjekte edilen rekombinant virüs enfeksiyon oluşturmuştur.

Virüs genomuna bir genin klonlanabilmesi için virüsün genomunda mevcut olan genlerden birinin veya genomdan bir bölgenin çıkarılması gerekmektedir. Silinecek olan bu gen bölgesinin viral replikasyon için önem arzeden bir gen olmaması en önemli şarttır. Bu konuda da CIV için çeşitli alternatifler mevcuttur. Bu alternatiflerden bir tanesi virüs genomundaki muhtemel apoptosis inhibitör genlerinden biri olduğu düşünülen 157L açık okuma zinciridir (ORF). CIV' de kaspazların aktivasyonunu (Seshagiri ve Miller, 1997) durdurabilen apoptosis inhibitörlerinin (IAP) varlığı *in silico* olarak Jakob ve ark., (2001) tarafından belirlenmiştir. Dizi analizi sonrasında CIV'de değişik büyüklüklerde muhtemel üç apoptosis inhibitör gen 157L (152 amino asit), 193R (208 amino asit) ve 332L (234 amino asit) varlığı tespit edilmiştir. Bu genler *Cydia pomonella* granulovirüs fonksiyonel apoptosis inhibitör proteinine (IAP-3) sırasıyla % 17,5-22,9, %19,5-33,7 ve %18,1-40,6 oranında benzerlik göstermektedir. Ancak 193R hem BIR hem de RING finger domaini içerirken 157L ve 332L sadece RING finger domaini içermektedir (Birnbaum vd., 1994; Jakob vd., 2001). İnce ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada ise 193R'nin fonksiyonel bir apoptosis inhibitör geni kodladığı gösterilmiştir. 157L'nin BIR domainine sahip olmayışı onun virüs replikasyonu için gerekli bir proteini kodlamadığı ve yerine yabancı bir gen sokulabileceği düşüncesi doğrultusunda bizleri bu çalışmada cesaretlendirmiştir. Elde edilen bulgular ise hipotezi destekler nitelikte olup oluşturulan rekombinant CIV hücre kültüründe yaban tip CIV ile benzer replikasyon özellikleri göstermiştir. Hatta rekombinant CIV'nin 72. saatte tespit edilen yüksek miktarı ($7,99 \times 10^8$ TCID₅₀ ünite/ml) yaban tip CIV ile oldukça benzerdir. Bu sonuç bize 157L geninin CIV için elzem bir gen olmadığını göstermiştir. Omurgalı iridovirüslerinde gerçekleştirildiği gibi (Pallister et al., 2007) CIV'de de yabancı genlerin ifadesi için bu gen lokusu kullanılabilir. 157L'nin fonksiyonel bir proteini kodlayıp kodlamadığı hususu bir muammadır ve daha detaylı çalışmalara ihtiyaç gerektirmektedir.

Yaban tip virüs ile rekombinant virüsün 0., 6., 12., 18., 24., 36., 48., 72. saatlerde ki tek basamaklı büyüme eğrileri karşılaştırıldığında her iki virüsün arasında göze çarpan

herhangi bir farkın olmadığını gözlemlenmiştir. Yine her iki virüsün DNA replikasyonunu karşılaştırmak için yapılan slot-blot hibridizasyonu sonucunda da DNA replikasyonunun iki virüste de 6. saatte başladığı belirlenmiştir. İlerleyen saatlerde ki DNA replikasyonunda da çok büyük bir fark gözlemlenmemiştir. Her iki virüs için gerçekleştirilen protein profili analizinde ise fark gözlemlenmemiştir. Çalışmanın başlangıcında 157L'nin bir transkriptinin olup olmadığı 24. saatte belirlenmeye çalışılmış ve bir transkriptin olduğunu gözlemlenmiştir. Ancak her iki virüse ait protein profilinde gözle görülür bir fark olmadığı, 157L geninin yokluğunda diğer viral proteinlerin ifadesinde ve viral replikasyonda da herhangi bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular 157L lokusunun CIV genomundan silinebilecek uygun bir bölge olduğunu göstermiştir. Böylelikle yaban tip virüsten herhangi bir farkı bulunmayan rekombinant virüs, CIV'nin hücre kültüründe ve konak böceklerdeki viral replikasyonunu, enfeksiyon özelliklerini, virüs parçacıklarının konak içerisindeki trafiğini ve konak-virüs etkileşimlerinin anlaşılmasında yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak çalışmada ilk defa bir rekombinant invertebrate iridovirüsü oluşturulmuştur. CIV *mcp* promotörü altında yabancı bir genin ifadesi çok iyi bir şekilde gerçekleştirilmiş olup bu durum biyoteknolojik ve biyolojik mücadele amaçlı yabancı proteinlerin ifade edilebileceği yeni bir invertebrate iridovirüs tabanlı viral ifade vektörü oluşturulmasına zemin hazırlamıştır. Çalışmada sadece bir genin fonksiyonel analizi gerçekleştirilmiş olmayıp aynı zamanda CIV'in viral patojenitesini artırabilecek stratejilerin geliştirilmesine de katkıda bulunabilecek temel model oluşturulmuştur.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, CIV'nin 157L kodlu muhtemel apoptosis inhibitör geni CIV genomundan homolog rekombinasyon ile silindi ve bu genin yokluğu esnasında viral replikasyonda herhangi bir değişikliğin olup olmadığı araştırıldı. Çalışmanın neticesinde ulaşılan sonuçlar aşağıda sıralanmıştır;

1. 157L kodlu geninin transkriptinin varlığı 24. saatte tespit edildi ve bu gen bölgesinin yokluğunda viral proteinlerin üretiminde bir farkın olmadığı belirlendi.
2. Homolog rekombinasyon tekniği kullanılarak 157L gen bölgesi CIV genomundan silindi.
3. 157L'nin CIV genomundan silindiği PCR yöntemi kullanılarak doğrulandı ve 157L'nin aşağı ve yukarı bölgesinde dahil olmak üzere viral genoma yerleştirilen bölgenin doğruluğu dizi analizi ile teyit edildi.
4. Yaban tip ve rekombinant CIV'e ait virüs stoklarının konsantrasyonu TCID₅₀ metodu kullanılarak sırasıyla $1,90 \times 10^{11}$ ve $2,023 \times 10^{11}$ pfu/ml olarak hesaplandı.
5. Oluşturulan rekombinant virüs ile yaban tip virüsün tek basamaklı büyüme eğrileri karşılaştırıldığında bir farkın olmadığı gözlemlendi.
6. Her iki tip virüsün restriksiyon profilleri karşılaştırılmış ve yaban tip virüsün restriksiyon profili literatür ile uyumludur ve rekombinant tip virüsteki ufak farklılıklar genoma yerleştirilen bölgedeki restriksiyon enzim tanıma dizilerinden kaynaklanmaktadır.
7. Western-blot analizi sonucunda çok spesifik bir biçimde GFP proteinine ait 28 kDa'luk bir bant gözlemlendi.
8. Slot-blot analizi sonucunda her iki virüste de viral replikasyonun 6. saatte başladığı ve artarak devam ettiği gözlemlendi.
9. *Galleria mellonella* larvaları rekombinant CIV ile enfekte edildi ve floresan mikroskop altında bakıldığında larvalarda yeşil ışık oluşumu gözlemlendi.

6. ÖNERİLER

İlk defa bu çalışmada oluşturulan ve karakterize edilen rekombinant invertebrate iridovirüsün daha ileriki çalışmalara olacak katkısı öneriler halinde belirtilmiştir:

1. Çalışmanın tüm aşamalarında izlenen yöntemler kullanılarak CIV genomundaki diğer işlevi tam olarak bilinmeyen genlerin fonksiyonel analizi gerçekleştirilebilir.

2. *gfp* geni taşıyan rekombinant CIV'nin kolayca takip edilebilmesi nedeni ile çeşitli böcek grupları üzerindeki enfektivitesine bakılabilir ve hangi dokularda hangi zamanlarda enfeksiyon oluşturduğu belirlenebilir.

3. Konak yelpazesi geniş olup öldürme hızı yavaş olan CIV'nin genomuna 157L lokusunun yerine CIV'nin enfektivitesini hızlandıracak insektisidal genler yerleştirilebilir.

4. Oluşturulan rekombinant CIV biyoteknolojik amaçlı olarak çeşitli proteinlerin ifadesi için viral bir ifade vektörü olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Balange-Orange, N. ve Devauchelle, G., 1982. Lipid composition of an iridescent virus type 6 (CIV), Archives of Virology, 73, 3-4, 363-367.
- Bender, L. M., Morgan, M. J., Thomas, L. R., Liu, Z. G. ve Thorburn, A., 2005. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm, Cell Death and Differentiation, 12, 473-481.
- Bertin, J., Mendrysa, S. M., Lacount, D. J., Gaur, S., Krebs, J. F., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J. ve Friesen, P. D., 1996. Apoptotic suppression by baculovirus p35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease, Journal of Virology, 70, 6251-6259.
- Belloncik, S., Arella, M., Hudon, M. ve Martel, P., 1988. Biological control program of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in the province of Quebec (Canada), In Proceedings of the 14 th International Workshop Group on Ostrinia nubilalis Meeting, Beijing, China, 103-109.
- Bigot, Y., Piegu, B., Casteret, S., Gavory, F., Bideshi, D. K. ve Federici, B. A., 2013. Characteristics of inteins in invertebrate iridoviruses and factors controlling insertion in their viral hosts, Molecular Phylogenetics and Evolution, 67, 1, 246-254.
- Bilimoria, S. L., 2001. Use of viral proteins for controlling the cotton boll weevil and other insect pests, United States Patent no. 6200561.
- Bilimoria, S. L., 2009. Use of Iridoptin to Induce Toxicity in Insects United States Patent no. US2009/0069239A1.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. ve Miller, L. K., 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs, Journal of Virology, 68, 2521-2528.
- Boumans, L. ve Aarnes, E., 2010. Blue crane flies in Finnmark, a putative case of Iridovirus infection (Diptera, Tipulidae; Iridoviridae), Norwegian Journal of Entomology, 57, 120-122.
- Brandenburg, B. ve Zhuang, X., 2007. Virus trafficking – learning from single-virus tracking, Nature Reviews Microbiology, 5, 197-208.
- Braunwald, J., Tripier, F. ve Kirn, A., 1979. Comparison of the Properties of Enveloped and Naked Frog Virus 3 (FV 3) Particles, Journal of General Virology, 45, 673-682.

- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W., Vodovar, N., İnce, I. A., Blanc, H., Vlak, J. M., Saleh, M. C. ve van Rij, R. P., 2012. The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 51, E3604-3613.
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Venselaar, H. ve van Rij, R. P., 2014. A dsRNA-binding protein of a complex invertebrate DNA virus suppresses the *Drosophila* RNAi response, Nucleic Acids Research, doi: 10.1093/nar/gku910.
- Cerutti, M., Cerutti, P. ve Devauchelle, G., 1989. Infectivity of vesicles prepared from chilo iridescent virus inner membrane: evidence for recombination between associated DNA fragments, Virus Research, 12, 4, 299-313.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1980. Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an invertebrate virus (iridovirus type 6 or CIV), Archives of Virology, 63, 3-4, 297-303.
- Cerutti, M., Guerillon, J., Arella, M. ve Devauchelle, G., 1981. Replication of ype 6 iridovirus in various cell lines, Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, 292, 797- 802.
- Chen, G., Ward, B. M., Yu, K. H., Chinchar, V. G. ve Robert, J., 2011. Improved knock-out methodology reveals that frog virus 3 mutants lacking either the 18K immediate-early gene or the truncated vIF-2alpha gene are defective for replication and growth in vivo, Journal of Virology, 85, 11131–11138.
- Chinchar, V. G., Yu, K. H. ve Jancovich, J. K., 2011. The molecular biology of frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates, Viruses, 3, 10, 1959-1985.
- Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T. ve Williams, T., 2008. Family Iridoviridae: Poor Viral Relations No Longer, Current Topics in Microbiology and Immunology, 328, 123-170.
- Chinchar, V. G., Essbauer, S., He, J. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V. ve Williams, T., 2005. Iridoviridae , In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. ve Ball, L. A., (eds) *Virus taxonomy: 8th report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, London, pp, 163–175.
- Chinchar, V. G., 2002. Ranaviruses (family Iridoviridae): Emerging cold-blooded killers, Archives of Virology, 147, 447–470.
- Chinchar, V. G. ve Mao, J., 2000. Molecular diagnosis of iridovirus infections in cold-blooded animals, *Sem Avian Exotic Pet Med*, 9, 27–35.

- Chitnis, N. S., Paul, E. R., Lawrence, P. K., Henderson, C. W., Ganapathy, S., Taylor, P. V., Viridi, K. S., D'Costa, S. M., May, A. R. ve Bilimoria, S. L., 2011. A virion-associated protein kinase induces apoptosis, Journal of Virology, 85, 24, 13144-13152.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C.F. ve Williams, T., 2001. A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6, Journal of Virological Methods, 98, 2,109-18.
- D'Costa, S. M., Vigerust, D. J., Perales-Hull, M. R., Lodhi, S. A., Viravathana, P. ve Bilimoria, S. L., 2012. First complete and productive cell culture model for members of the genus Iridovirus, Archives of Virology, 157, 11, 2171-2178.
- D'Costa, S. M., Yao, H. ve Bilimoria, S. L., 2001. Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells, Archives of Virology, 146, 11, 2165-2178.
- D'Costa, S. M., Yao, H. J. ve Bilimoria, S. L., 2004. Transcriptional mapping in Chilo iridescent virus infections, Archives of Virology, 149, 4, 723-742.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Becnel, J. J., Moser, B. A., Kutish, G. F. ve Rock, D. L., 2006. Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus), Journal of Virology, 80, 17, 8439-8449.
- Delius H, Darai G, Flügel RM (1984) DNA analysis of insect iridescent virus 6: evidence for circular permutation and terminal redundancy, Journal of Virology, 49, 609–614.
- de Oliveira, A. P., Glauser, D. L., Laimbacher, A. S., Strasser, R., Schraner, E. M., Wild, P., Ziegler, U., Breakefield, X. O., Ackermann, M. ve Fraefel, C., 2008. Live visualization of herpes simplex virus type 1 compartment dynamics, Journal of Virology, 82, 4974–4990.
- Devauchelle, G., Stoltz, D. B. ve Darcy-Tripier, F., 1985. Comparative ultrastructure of iridoviridae, Current Topics in Microbiology and Immunology, 116, 1-21.
- Dizman, Y. A., Demirbag, Z., İnce, I. A. ve Nalçacıoğlu, R., 2012. Transcriptomic analysis of Chilo iridescent virus immediate early promoter, Virus Research, 167, 2, 353-357.
- Do, J. W., Cha, S. J., Kim, Y. C., An, E. J., Lee, N. S., Choi, H. J., Lee, C. H., Park, M. S., Kim, J. W., Kim, Y. C. ve Park, J. W., 2005a. Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea, Diseases of Aquatic Organisms, 64, 193–200.
- Do, J. W., Cha, S. J., Kim, J. S., An, E. J., Park, M. S., Kim, J. W., Lim, Y. C., Park, M. A. ve Park, J. W., 2005b. Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridovirus, Archives of Virology, 150, 351–359.

- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., Han, M. S., Cha, S. J., Park, M. S., Park, M. A., Kim, Y. C., Kim, J. W. ve Park, J. W., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus, Virology, 325, 2, 351-363.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L. ve Smith, G. L., 2010. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread, Science, 327, 873–876.
- 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.
- Erdoğan, B. B., 2003. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptosis, Akciğer Arşivi, 4, 165-174.
- Feng, Q., Arif, B. M., Palli, S. R., Sohi, S. S. ve Retnakaran, A., 2001. Molecular modificataion of Baculoviruses for the control of forest insect pests, Advances in Virus Research, 57, 263-290.
- Fenner, F., 1976. The classification and nomenclature of viruses, second report of the international committee on taxonomy of viruses, Intervirology, 7, 1-115.
- Fischlechner, M. ve Donath E., 2007. Viruses as building blocks for materials and devices, Angewandte Chemie, International Edition, 46, 18, 3184-3193, doi: 10.1002/anie.200603445, PMID 17348058.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A *Chilo iridescent* virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* walker (Lepidoptera: Pyralidae), Applied Entomology and Zoology, 1, 69-72.
- Funk, C. J., Hunter, W. B. ve Achor, D. S., 2001. Replication of insect iridescent virüs 6 in a whitefly cell line, Journal of Invertebrate Pathology, 77, 144-146.
- Gendrault, J. L., Steffan, A. M., Bingen, A. ve Kirn, A., 1981. Penetration and uncoating of frog virus 3 (FV3) in cultured rat Kupffer cells, Virology, 112, 2, 375-384.
- Gleba, Y. Y. ve Giritch, A., 2011. Plant viral vectors for protein expression. Recent Advances in Plant Virology, Caister Academic Press, 19, ISBN 978-1-904455-75-2.
- Goorha, R., 1982. Frog virus 3 DNA replication occurs in two stages, Journal of Virology, 43, 2, 519-528.
- Goorha, R. ve Murti, K. G., 1982. The genome of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 79, 248–262.

- Goorha, R. ve Dixit, P., 1984. A temperature-sensitive (TS) mutant of frog virus 3 (FV3) is defective in second-stage DNA replication, Virology, 136, 1, 186-195.
- Greber, U. F. ve Way, M., 2006. A superhighway to virus infection, Cell, 124, 741–754.
- Green, D. ve Reed, J., 1998. Mitochondria and apoptosis, Science, 281, 1309–1312.
- Guangchun, C., Brian M. W., Kwang H. Y., Chinchar V. G. ve Jacques R., 2011. Improved knockout methodology reveals that frog virus 3 mutants lacking either the 18K immediate-early gene or the truncated vIF-2 gene are defective for replication and growth in vivo, Journal of Virology, 11131–11138.
- Gürbilek, M., Dağlar, C., Aköz, M. ve Topçu, C., 2004. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi, Turkish Journal of Biochemistry, 29, 3, 237-242.
- Hajos, J.P., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Zavodszky, P. ve Vlak, J.M., 2000. High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture, Archives of Virology, 145, 159–164.
- Hama, H., 1968. On the cross inoculation of Chilo iridescent virus (CIV), Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 12,34-39.
- Harrison, R. L. ve Bonning, B. C., 2000a. Genetic engineering of biocontrol agents for insects, In “Biological and Biotechnological Control of Insect Pests”(J.E.Rechcigl and N.A.Rehcigl. Eds.), 243–280.
- Hay, B. A., Wassarman D. A. ve Rubin, G.M., 1995. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death, Cell, 83, 1253–1262.
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. ve Chan, S. M., 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus, Virology, 291, 1, 126-139.
- He, J. G., Lü, L., Deng, M., He, H. H., Weng, S. P., Wang, X. H., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. ve Chan, S. M., 2002. Sequence Analysis of the Complete Genome of an Iridovirus Isolated from the Tiger Frog, Virology, 292, 2, 185-197.
- He, L, B., Ke, F. ve Zhang, Q, Y., 2012. Rana grylio virus as a vector for foreign gene expression in fish cells, Virus Research, 163, 66–73.
- Henderson, C. W., Johnson, C. L., Lodhi, S. A. ve Bilimoria, S. L., 2001. Replication of Chilo iridescent virus in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay, Archives of Virology, 146, 4, 767-775.
- Hernaiz, B., Escribano, J. M. ve Alonso, C., 2006. Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera, Virology, 350, 1–14.

- Hink, W. F., 1970. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia*, Nature, 226, 466–467.
- Hollinshead, M., Rodger, G., Van Eijl, H., Law, M., Hollinshead, R., Vaux, D. J. ve Smith, G. L., 2001. Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface, Journal of Cell Biology, 154, 389–402.
- Huang, Q., Deveraux Q. L., Maeda, S., Salvesen, G. S., Stennicke, H. R., Hammock, B. D., ve Reed, J. C., 2000. Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 1427–1432.
- Huang, Y., Huang, X., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z., Cui, H., Cao, J., Zhao, Y., Wang, X., Jiang, Y. ve Qin, Q., 2009. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae, BMC Genomics, 10, 224.
- Huang, Y., Huang, X., Cai, J., Ye, F., Guan, L., Liu, H. ve Qin, Q., 2011. Construction of green fluorescent protein-tagged recombinant iridovirus to assess viral replication, Virus Research, 160, 221-229.
- Huang, Y., Li, S., Zhao, Q., Pei, G., An, X., Guo, X., Zhou, H., Zhang, Z., Zhang, J. ve Tong, Y., 2015. Isolation and characterization of a novel invertebrate iridovirus from adult *Anopheles minimus* (AMIV) in China, Journal of Invertebrate Pathology, 127,1-5.
- Hunter, W. B., Lapointe, S. L., Sinisterra, X. H., Achor, D. S. ve Funk, C. J., 2003. Iridovirus in the root weevil *Diaprepes abbreviatus*, Journal of Insect Science, 3, 9.
- Hunter, W. B., Patte, C. P., Sinisterra, X. H., Achor, D. S., Funk, C. J. ve Polston, J. E., 2001. Discovering new insect viruses: Whitefly iridovirus (Homoptera: Aleyrodidae: Bemisiatabaci), Journal of Invertebrate Pathology, 78, 220-225.
- Husain, M. ve Moss, B., 2003. Intracellular trafficking of a palmitoylated membrane associated protein component of enveloped vaccinia virus, Journal of Virology, 77, 9008–9019.
- Hyatt, A. D., Gould, A. R., Zupanovic, Z., Cunningham, A. A., Hengstberger, S., Whittington, R. J., Kattenbelt, J. ve Coupar, B., E., H., 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses, Archives of Virology, 145, 301 - 331.
- Ibarra, E. J. ve Del Rincon-Castro, C. M., 2009. Insect viruses diversity, biology, and use as bioinsecticides, Tropical Biology and Conservation Management, VII.
- Ince, İ. A., Functional Genomics of Chilo Iridescent Virus: A transcriptomic approach, Doktora Tezi, Wageningen Universitesi, Hollanda, 2012.

- İnce, İ. A., Boeren, S., van Oers, M. M. ve Vlak, J. M., 2014. Temporal proteomic analysis and label-free quantitation of viral proteins of an invertebrate iridovirus, Journal of General Virology, Basımda.
- İnce, İ. A., Boeren, S. A., van Oers, M. M., Vervoort, J. J. ve Vlak, J. M., 2010. Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405, 1, 253-258.
- İnce, İ. A., Özcan, K., Vlak, J. M. ve van Oers, M. M., 2013. Temporal classification and mapping of non-polyadenylated transcripts of an invertebrate iridovirus, Journal of General Virology, 94, 187-192.
- İnce, İ. A., Westenberg, M., Vlak, J. M., Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R. ve van Oers, M. M., 2008. Open reading frame 193R of Chilo iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP), Virology, 376, 1, 124-131.
- Jakob, N. J., Muller, K., Bahr, U. ve Darai, G., 2001. Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus, Virology, 286, 1, 182-196.
- Jancovich, J. K., Bremont, M., Touchman, J. W. ve Jacobs, B. L., 2010. Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family Iridoviridae), Journal of Virology, 84, 6, 2636-2647.
- Jancovich, J. K., Mao, J., Chinchar, V. G., Wyatt, C., Case, S. T., Kumar, S., Valente, G., Subramanian, S., Davidson, E. W., Collins, J. P. ve Jacobs, B. L., 2003. Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America, Virology, 316, 1, 90-103.
- Jankovich, J. K., Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. ve Zhang, Q. Y. 2012. Family Iridoviridae. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz. San Diego, CA, Elsevier Academic Press: 193-210.
- Kelly, D. C. ve Tinsley, T. W., 1973. Ribonucleic acid polymerase activity associated with particles of iridescent virus types 2 and 16, Journal of Invertebrate Pathology, 22, 2, 199-202.
- Kelly, D. C. ve Vance, D. E., 1973. The lipid content of two iridescent viruses, Journal of General Virology, 21, 2, 417-423.
- Kelly, D. C. ve Tinsley, T. W., 1974. Iridescent virus replication: a microscope study of *Aedes aegypti* and *Antherea eucalypti* cells in culture infected with Iridescent virus types 2 and 6, Microbios, 9, 75-93.
- King A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. ve Lefkowitz, E. J., 2012. Classification and nomenclature of viruses, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses, Virus Taxonomy, 193-210.

- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 5259, 680-685.
- Lei, X. Y., Ou, T., Zhu, R. L. ve Zhang, Q. Y., 2012. Sequencing and analysis of the complete genome of *Rana grylio* virus (RGV), Archives of Virology, 157, 8, 1559-1564.
- Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kosma, V. M. ve Syrjänen, K., 1994. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis, European Journal of Cancer, 30A, 14, 2068-73.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. ve Darnell, J., 2008. *Viruses: Structure, Function, and Uses*.
- Lu, L., Zhou, S. Y., Chen, C., Weng, S. P., Chan, S. M. ve He, J. G., 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, Virology, 339, 1, 81-100.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. ve Olins, P. O., 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*, Journal of Virology, 67, 4566-4579.
- Maeda, S., Volrath, S. L., Hanzlik, T. N., Harper, S. A., Majima, K., Maddox, D. W., Hammock, B. D. ve Fowler, E., 1991. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus, Virology, 184, 777-780.
- Mao, J. H., Hedrick, R. P. ve Chinchar, V. G., 1997. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses, Virology, 229, 212-220.
- Marina, C. F., Arredondo-Jimenez, J. I., Castillo, A. ve Williams, T., 1999. Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito, Oecologia, 119, 383-388.
- Martinez, G., Christian, P., Marina, C. ve Williams, T., 2003. Sensitivity of Invertebrate iridescent virus 6 to organic solvents, detergents, enzymes, and temperature treatment, Virus Research, 91, 249-254.
- Martinou, I., Fernandez, P. A., Missotten, M., White, E., Allet, B., Sadoul, R. ve Martinou, J. C., 1995. Viral proteins E1B19K and p35 protect sympathetic neurons from cell death induced by NGF deprivation, Journal of Cell Biology, 728, 201-208.
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H. ve Imai, S., 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases, Journal of Infection and Chemotherapy, 11, 5, 211-219.

- Mavian, C., Lopez-Bueno, A., Fernandez Somalo, M. P., Alcamí, A. ve Alejo, A., 2012. Complete genome sequence of the European sheatfish virus, Journal of Virology, 86, 11, 6365-6366.
- McCutchen, B. F., Choudary, P. V., Crenshaw, R., Maddox, D., Kamita, S. G., Palekar, N., Volrath, S., Fowler, E., Hammock, B. D. ve Maeda, S., 1991. Development of a recombinant baculovirus expressing an insectselective neurotoxin: potential for pest control, Biotechnology, 9, 848-852.
- McIntosh, A. H. ve Kimura, M., 1974. Replication of the insect *Chilo iridescent virus* (CIV) in a poikilothermic vertebrate cell line, Intervirology, 4, 257-267.
- McLaughlin, R. E., Scott, H. A. ve Bell, M. R., 1972. Infection of the boll weevil by *Chilo iridescent virus* (CIV), Journal of Invertebrate Pathology, 19, 285-290.
- Miller, L. K., 1997. Baculovirus interaction with host apoptotic pathways, Journal of Cellular Physiology, 173, 178-182.
- Mitsuhashi, J., 1967. Infection of leafhopper and its tissues cultivated in vitro with *Chilo iridescent virus*, Journal of Invertebrate Pathology, 9, 432-434.
- Monnier, C. ve Devauchelle, G., 1976. Enzyme activities associated with an invertebrate iridovirus: nucleotide phosphohydrolase activity associated with iridescent virus type 6 (CIV), Journal of Virology, 19, 1, 180-186.
- Monnier, C. ve Devauchelle, G., 1980. Enzyme activities associated with an invertebrate iridovirus: protein kinase activity associated with iridescent virus type 6 (chilo iridescent virus), Journal of Virology, 35, 2, 444-450.
- Nakajima, K. ve Kunita, J., 2005. Red sea bream iridoviral disease, Viruses, 55, 1, 115-125.
- Nalçacıoğlu, R., İnce, I. A., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2007. The *Chilo iridescent virus* DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif, Journal of General Virology, 88, 9, 2488-2494.
- Nalçacıoğlu, R., Marks, H., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2003. Promoter analysis of the *Chilo iridescent virus* DNA polymerase and major capsid protein genes, Virology, 317, 2, 321-329.
- 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.
- Ohba, M., 1975. Studies on the parthenogenesis of *Chilo iridescent virus*. 3. Multiplication of CIV in the silkworm *Bombyx mori* L. and field insects, Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu Universty, 30, 71-81.

- Ohba, M. ve Aizawa, K., 1978. Comparative titration of Chilo iridescent virus in vivo and in vitro, Journal of Invertebrate Pathology, 32, 394-395.
- Ohba, M. ve Aizawa, K., 1979. Multiplication of Chilo iridescent virus in non insect arthropods. Journal of Invertebrate Pathology, 33, 278-283.
- Ohkawa, T., Volkman, L., E. ve Welch, M. D., 2010. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface, Journal of Cell Biology, 190,187-195.
- Özgen, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z., Vlak, J. M., van Oers, M. M. ve Nalçacıoğlu, R., 2014. Construction and characterization of a recombinant invertebrate iridovirus, Virus Research, 189C, 286-292.
- Öktem, S., Özhan, M. H. ve Özol, D., 2001. Apoptozisin önemi, Toraks Dergisi, 2, 1, 91-95.
- Paul, E. R., Chitnis, N. S., Henderson, C. W., Kaul, R. J., D'Costa, S. M. ve Bilimoria, S. L., 2007. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract, Archives of Virology, 152, 7, 1353-1364.
- Pallister, J., Goldie, S., Coupar, B., Shiell, B., Michalski, W.P., Siddon, N. ve Hyatt, A., 2007. Bohle iridovirus as a vector for heterologous gene expression, Journal of Virological Methods, 146, 419-423.
- Piegu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2013. Complete genome sequence of invertebrate iridescent virus 22 isolated from a blackfly larva, Journal of General Virology, 94, 9, 2112-2116.
- Piegu, B., Guizard, S., Yeping T., Cruaud, C., Couloux A., Bideshi, D. K., Federici B. A. ve Bigot, Y., 2014. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV22A, a variant of IIV22, isolated originally from a blackfly larva, Standards in Genomic Sciences, 9, 940-947.
- Piegu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014a. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV30 isolated from the corn earworm, *Helicoverpa zea*, Journal of Invertebrate Pathology, 116, 43-47.
- Piegu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014b. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV-25 isolated from a blackfly larva, Archives of Virology, 159, 5, 1181-1185.
- Piegu, B., Guizard, S., Yeping, T., Cruaud, C., Asgari, S., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014c. Genome sequence of a crustacean iridovirus, IIV31, isolated from the pill bug, *Armadillidium vulgare*, Journal of General Virology, 95, 7, 1585-1590.

- Porteus, M., 2007. Using homologous recombination to manipulate the genome of human somatic cells, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 24, 195–212.
- Schimmer, A., 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice, Cancer Research, 64, 7183–7190.
- Schnitzler, P., Soltau, J. B., Fischer, M., Reisner, H., Scholz, J., Delius, H. ve Darai, G., 1987. Molecular cloning and physical mapping of the genome of insect iridescent virus type 6: further evidence for circular permutation of the viral genome, Virology, 160, 1, 66-74.
- Seshagiri, S. ve Miller, L. K., 1997. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 13606–13611.
- Shi, C. Y., Jia, K. T., Yang, B. ve Huang, J., 2010. Complete genome sequence of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China, Virology Journal, 7, 159.
- Smith, G. E., Summers, M. D. ve Fraser, M. J., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, Molecular and Cellular Biology, 3, 2156–2165.
- Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F. ve Hew, C. L., 2004. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis, Journal of Virology, 78, 22, 12576-12590.
- Sonntag, K. C., Schnitzler, P., Janssen, W. ve Darai, G., 1994. Identification of the primary structure and the coding capacity of the genome of insect iridescent virus type 6 between the genome coordinates 0.310 and 0.347 (7990 bp), Intervirology, 37, 5, 287-297.
- Soto, C. M., Blum, A. S., Vora, G. J. vd., 2006. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles, Journal of the American Chemical Society, 128, 15, 5184-5189, doi:10.1021/ja058574x. PMID 16608355.
- Sugimoto, A., Friesen, P. D., ve Rothman, J. H., 1994. Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ted-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*, EMBO Journal, 73, 2023-2028.
- Tan, W. G., Barkman, T. J., Gregory Chinchar, V. ve Essani, K., 2004. Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus Ranavirus (family Iridoviridae), Virology, 323, 1, 70-84.
- Tidona, C. A. ve Darai, G., 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus, Virology, 230, 2, 207-216.

- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R. ve Darai, G., 1998. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? Virus Genes, 16, 1, 59-66.
- Tomalski, M. D. ve Miller, L. K., 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene, Nature, 352, 82-85.
- Tomalski, M. D. ve Miller, L. K., 1993. Insect-Specific Paralytic Neurotoxin Genes for use in Biological Insect Control: Methods and Composition. United States Patent, Patent Number: 5, 266-317.
- Tsai, C. T., Ting, J. W., Wu, M. H., Wu, M. F., Guo, I. C. ve Chang, C. Y., 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses, Journal of Virology, 79, 4, 2010-2023.
- URL-1, <http://www.trevorwilliams.info/Iridovirus.htm>, 10 Haziran 2015.
- URL-2, <http://www.dreamstime.com/stock-illustration-apoptosis-process-programmed-cell-death-vector-diagram-image>, 45763884, 04 Haziran 2015.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M. ve Bishop, D. H. L., 2000. Virus Taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, Academic Press, San Diego.
- ViralZone, 2009. Graphical representation of *Chilo iridescent virus*, In Web-1: Swiss Institute of Bioinformatics.
- Ward, B.M. ve Moss, B., 2001. Visualization of intracellular movement of vaccinia virus virions containing a green fluorescent protein-B5R membrane protein chimera, Journal of Virology, 75, 4802-4813.
- Wei, Y., Fan, T. ve Yu, M., 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis, Acta Biochim Biophys Sin, 40, 4, 278-288.
- Williams, T. ve Thompson, I. P., 1995. Fatty-acid profiles of invertebrate iridescent viruses, Archives of Virology, 140, 975-981.
- Williams, T., 1996. The Iridoviruses, Advances in Virus Research, 46, 345-412.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V. G., 2005. A decade of advances in iridovirus research, Advances in Virus Research, 65, 173-248.
- Williams, T. ve Ward, V. K., 2010. Iridoviruses. Insect Virology, Asgari, S. ve Norfolk K.N.J., UK, Caister Academic Press, 123-152.
- Willis, D. B., Goorha, R. ve Granoff, A., 1979. Nongenetic reactivation of frog virus 3 DNA, Virology, 98, 2, 476-479.

- Willis, D. B. ve Granoff, A., 1985. trans activation of an immediate-early frog virus 3 promoter by a virion protein, Journal of Virology, 56, 2, 495-501.
- Wong, C. K., Young, V. L., Kleffmann, T. ve Ward, V. K., 2011. Genomic and proteomic analysis of invertebrate iridovirus type 9, Journal of Virology, 85, 15, 7900-7911.
- Wyllie, A. H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, Nature, 284, 555-556.
- Xeros, N., 1954. A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*, Nature, 174, 562-563.
- Yan, X., Yu, Z., Zhang, P., Battisti, A. J., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Bajaj, C., Bergoin, M., Rossmann, M. G. ve Baker, T. S., 2009. The capsid proteins of a large, icosahedral dsDNA virus, Journal of Molecular Biology, 385, 4, 1287-1299.
- Yunbo, W., Tingjun, F. ve Miaomiao Y., 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, Volume 40, Issue 4, 278-288.
- Zhang, Q. Y., Xiao, F., Xie, J., Li, Z. Q. ve Gui, J. F., 2004. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China, Journal of Virology, 78, 13, 6982-6994.
- Zhou, Q., Krebs, J. F, Snipas, S. J., Price, A., Alnemri, E. S., Tomaselli, K. J. ve Salvesen, G.S., 1998. Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases, specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex, Biochemistry, 37, 10757–10765.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Bayburt'da doğdu. İlkokulu 1978–1983 yılları arasında Trabzon 27 Mayıs İlkokulu'nda, ortaokulu 1983–1986 yılları arasında Bayburt Ortaokulu'nda ve liseyi 1986–1989 Bayburt Lisesi'nde tamamladı. 1991-1992 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1995 yılında bu bölümden mezun oldu. 2008-2011 Eğitim–Öğretim yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı. Evli ve iki çocuk annesidir, yabancı dili İngilizce'dir.

Makaleler:

Özgen, A., Muratoğlu, H., Demirbağ, Z., Vlak, J. M., Van, Quers, M. ve Nalçacıoğlu R., 2014. Construction And Characterization Of A Recombinant Invertebrate Iridovirus, Virus Research, 286-292.