

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CHILO IRIDESCENT VİRÜS'E AİT YAPISAL PROTEİNLER ARASINDAKİ
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLER

DOKTORA TEZİ

Emine ÖZŞAHİN

ŞUBAT 2015
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CHILO IRIDESCENT VİRÜS'E AİT YAPISAL PROTEİNLER ARASINDAKİ
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLER**

Emine ÖZŞAHİN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTOR (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26/01/2015
Tezin Savunma Tarihi : 27/02/2015**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Trabzon 2015

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Emine ÖZŞAHİN Tarafından Hazırlanan

**CHILO IRIDESCENT VİRÜS'E AİT YAPISAL PROTEİNLER ARASINDAKİ
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLER**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 27 / 01 / 2015 gün ve 1587 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Üye : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Chilo Iridescent Virüs’e Ait Yapısal Proteinler Arasındaki Moleküler Etkileşimler” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “doktora” tezi olarak hazırlanmıştır. Bu tezde ilk defa *Iridoviridae* familyasına ait bir virüsün yapısal proteinleri arasındaki etkileşimler tespit edilmiştir. Bu tez sonucunda açığa çıkan bilgiler daha ileri çalışmalara temel teşkil etme niteliğindedir.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan tez izleme jürisi üyelerim sayın Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Biyoloji Bölümü mikrobiyoloji grubu hocalarım ve laboratuvar arkadaşlarıma, KTÜ Biyoloji Bölümü öğrencisi İskender KUK’a, tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından faydalanmama imkan veren Biyoloji Bölüm Başkanlığına, tezin bir kısmının gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkânlarından istifade etmemi sağlayan Wageningen Üniversitesi (Hollanda), Viroloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. M. Monique van OERS’e teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince gerçekleştirdiğim çalışmalardaki yurt içi doktora burs programı (2211), yurt dışı doktora araştırma burs programı (2214) ve 113Z020 numaralı proje kapsamındaki desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na teşekkür ediyorum.

Maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan, hayattaki en büyük moral ve sevgi kaynaklarım eşim Fatih ÖZŞAHİN’e, minik kızım Munise ve minik oğlum Yavuz’a, bu yolda beni hiç yalnız bırakmayan, bana güç ve büyük emek veren, anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz minnet ve şükranlarımla teşekkür ederim.

Emine ÖZŞAHİN

Trabzon 2015

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Chilo iridescent virüs’e ait yapısal proteinler arasındaki moleküler etkileşimler” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın 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. 18/01/2015

Emine ÖZŞAHİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	X
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Iridoviridae</i> Familyası	2
1.2.1. <i>Iridoviridae</i> Familyasının Cinsleri ve Özellikleri	5
1.2.2. <i>Iridoviridae</i> Familyasında Virüslerin Hücreye Girişi ve Genom Replikasyonu	8
1.2.3. <i>Iridovirus</i> Cinsi.....	10
1.2.3.1. Chilo Iridescent Virüs	12
1.2.3.1.1. Chilo Iridescent Virüs'ün Morfolojisi ve Virion Yapısı	12
1.2.3.1.2. Chilo Iridescent Virüs'ün Transkripsiyonel Regülasyonu	16
1.2.3.1.3. Chilo Iridescent Virüs'ün Konak Spektrumu ve Patolojisi	17
1.3. Protein Etkileşimleri	18
1.3.1. Maya-İki-Hibrit Sistemi	22
1.4. Çalışmanın Amacı	24
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	26
2.1. Virüs ve Konak.....	26
2.2. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini.....	26
2.3. Primer Tasarımı	27
2.4. Chilo Iridescent Virüs DNA İzolasyonu	29
2.5. Elektrokompentent <i>E.coli</i> DH5α Hücrelerin Hazırlanması.....	30
2.6. Chilo Iridescent Virüs Yapısal Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve Ara Vektör pJET'e Klonlanması	30
2.7. Yapısal Genlerin <i>Av</i> ve <i>Yem</i> Vektörlerine Klonlanması	3

2.8.	Kompetent Maya Hücrelerinin Hazırlanması.....	32
2.9.	Kompetent Maya Hücrelerine Yapısal Genleri İçeren <i>Yem</i> Vektörlerin Transformasyonu	32
2.10.	<i>Yem</i> Vektörleri İçeren Maya Hücrelerine <i>Av</i> Vektörlerin Transformasyonu	33
2.11.	<i>Yem</i> Vektörleri İçeren Mayalardan Protein İzolasyonu.....	33
2.12.	Western Blot Hibridizasyonu	34
2.13.	GST-Pull Down Analizi	35
2.13.1.	118L Geninin pGEX-2T Vektörüne Klonlanması.....	36
2.13.2.	415R Geninin pET28a Vektörüne Klonlanması.....	36
2.13.3.	<i>E. coli</i> BL21-pLysS Hücrelerinin Kompetent Yapılması.....	36
2.13.4.	Vektörlerin <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerine Transformasyonu ve Rekombinantların Analizi	37
2.13.5.	Protein İfadesi.....	37
2.13.6.	GST-Pull Down Analizi	37
2.13.7.	Western Blot Hibridizasyonu	38
2.14.	Protein İnteraktom Haritasının Çizilmesi	39
3.	BULGULAR	40
3.1.	Primerlerin Tasarımı.....	40
3.2.	Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması.....	45
3.3.	Genlerin <i>Yem</i> Vektörlerine Klonlanmaları	46
3.4.	Genlerin <i>Av</i> Vektörlerine Klonlanmaları.....	47
3.5.	<i>Yem</i> Vektörlerine Klonlanan Yapısal Genlerin Maya Hücrelerinde İfade Edilmeleri	48
3.6.	Maya-İki-Hibrit Sistemi	49
3.7.	Pull-Down Analizi.....	57
4.	TARTIŞMA.....	59
5.	SONUÇLAR.....	67
6.	ÖNERİLER	69
7.	KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VİRÜS'E AİT YAPISAL PROTEİNLER ARASINDAKİ
MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLER

Emine ÖZŞAHİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2015, 77 sayfa

Iridoviridae familyasına mensup virüsler ekolojik ve ekonomik öneme sahip olan balıklar, iki yaşamlılar, sürüngenler ve omurgasızlar (özellikle böcekler) üzerinde geniş konak spektrumuna sahiptir. Virüs yapısal proteinleri arasındaki etkileşimlerin bilinmesi, viral enfeksiyonun başlaması, yeni virüslerin oluşması ve hücreden salınma mekanizmalarının anlaşılması bakımından büyük önem arz eder. Bu çalışmada, Chilo iridescent virüs'e ait 47 yapısal protein arasında olması muhtemel 2209 etkileşim, maya-iki-hibrit sistemi kullanılarak araştırıldı. Yapısal genler *av* ve *yem* vektörlere ayrı ayrı klonlandı. Öncelikle *yem* vektörler *Saccharomyces cerevisiae* AH109 suşuna transform edildi. *Yem* vektörlerdeki genlerin maya hücrelerinde ifadeleri Western blot hibridizasyon analizi ile doğrulandı. Genlerin ifadelerinin belirlendiği maya hücrelerine *av* vektörler transform edildi. YEM ve AV proteinler arasındaki etkileşimleri tespit etmek için *yem* ve *av* vektörlerini birlikte taşıyan maya hücreleri seçici SD (minimal synthetic defined) besiyerine inoküle edildi. Seçici besiyerinde büyüyen koloniler ilgili proteinler arasında pozitif etkileşim olduğunu göstermektedir. 47 yapısal protein arasında 163 etkileşim olduğu belirlendi. Tespit edilen etkileşimlerin interaktom şeması cytoscape programı kullanılarak çizildi. Elde edilen bilgiler virüs enfeksiyonunun başlaması, virüsün inşası ve hücrelerden salınmasına yönelik mekanizmaların anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Chilo iridescent virüs, yapısal proteinler, maya-iki-hibrit sistemi, protein etkileşimleri

PhD. Thesis

SUMMARY

MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN STRUCTURAL PROTEINS OF
CHILO IRIDESCENT VIRUS

Emine ÖZŞAHİN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2015, 77 pages

Iridoviruses have a wide host range including fish, amphibians, reptiles and invertebrates (especially insects), which have ecological and economic significance. Determining the interactions between structural viral proteins is important for the understanding of virus maturation, infection and release mechanisms. In this study, 2209 possible interactions between 47 structural proteins of Chilo iridescent virus have been investigated by yeast-two-hybrid system. The structural genes have cloned in both *bait* and *prey* vectors. *Bait* vector was introduced into *Saccharomyces cerevisiae* AH109. Expression of the *bait* genes was confirmed by western blot hybridisation analysis. After confirmation, *prey* vectors were transformed into yeast cells, which carry the bait vectors. Yeast cells contain *bait* and *prey* vectors were grown on a selective medium (minimal synthetic defined) to determine the protein-protein interactions between BAIT and PREY proteins. The colonies grown on this medium indicate positive interactions between respective proteins. 163 interactions were determined among 47 structural proteins. The interactom scheme has drawn by using cytoscape program. The results of this study will provide useful information for the understanding of infection, assembly and egress mechanisms of the virus.

Key Words: Chilo iridescent virus, structural proteins, yeast two hybrid system, protein-protein interaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Iridovirüs enfeksiyonu	3
Şekil 2. <i>Iridoviridae</i> familyasının nükleositoplazmik çift zincir DNA virüsleri ile filogenetik ilişkisi	4
Şekil 3. Iridoviridlerin filogenetik analizi	5
Şekil 4. Frog virüs-3 DNA'sının replikasyon modeli	10
Şekil 5. Chilo iridescent virüs'deki trimerik kapsomerlerin organizasyonu	13
Şekil 6. Chilo iridescent virüs'ün 3Å çözünürlükte 3 boyutlu görüntüsü	14
Şekil 7. Chilo iridescent virüs'ün minör kapsid proteinleri	15
Şekil 8. Klasik maya-iki-hibrit sistemi	23
Şekil 9. Transmembran domein içeren genlerin çoğaltılan kısımlarının şematik gösterimi	40
Şekil 10. Chilo iridescent virüs yapısal genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan zincirlerinin agaroz jel görüntüleri	45
Şekil 11. Genlerin <i>yem</i> vektöre klonlanması	46
Şekil 12. Genlerin <i>av</i> vektöre klonlanması	47
Şekil 13. Maya hücrelerinde ifade edilen <i>yem</i> proteinlerin Western blot hibridizasyon analizleri.....	48
Şekil 14. Etkileşim oluşturan maya kolonileri.....	49
Şekil 15. Chilo iridescent virüs yapısal proteinleri arasındaki etkileşimlerin şematik görünümü	53
Şekil 16. DNA replikasyonu ve virüs transkripsiyonunda rol oynayan muhtemel yapısal proteinler arasındaki etkileşimler	54
Şekil 17. İntegral membran proteinler arasındaki protein etkileşimleri	55
Şekil 18. Proteinlerin olgunlaşması ve modifikasyonu aşamasında rol oynaması muhtemel yapısal proteinler arasındaki etkileşimler	56
Şekil 19. Öz proteinler arasındaki protein etkileşimleri	57
Şekil 20. 118L ve 415R'nin GST-pull down analizi	58
Şekil 21. Virüsün konak hücreye girişinde görev yapabilecek proteinler arasındaki etkileşimler	62

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Iridoviridae</i> familyasının cinslerini birbirinden ayıran özellikler	6
Tablo 2. Tüm genom analizi yapılmış iridoviridler	7
Tablo 3. <i>Iridovirus</i> cinsine ait türler	11
Tablo 4. Protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan metodlar	21
Tablo 5. Çalışmada kullanılan Chilo iridescent virüs yapısal genleri.....	28
Tablo 6. 118L ve 415R genlerinin ifadelerinde kullanılan primerler	35
Tablo 7. Chilo iridescent virüs yapısal genlerini çoğaltmak için kullanılan primer dizileri	42
Tablo 8. Maya-iki-hibrit sistemi ile Chilo iridescent virüs yapısal proteinleri arasında belirlenen protein etkileşimleri	50

SEMBOLLER DİZİNİ

AD	: Aktivasyon domeini
CIV	: Chilo iridescent virüs
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
DBD	: DNA bağlanma domeini
ddH ₂ O	: İki kere damıtılmış su
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ICTV	: Virüs taksonomisi uluslararası komitesi
IPTG	: İzopropil beta-D-tiyogalaktosid
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NCLDV	: Nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri
ORF	: Açık okuma zinciri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: H iyon konsantrasyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TM	: Transmembran
vd.	: ve diğerleri
Y2H	: Maya-iki-hibrit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İridoviridler (*Iridoviridae* familyasının herhangi bir üyesi) dünya genelinde ekonomik öneme sahip sucul kültürü yapılan hayvanlarda ve böcekler üzerine ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Chilo iridescent virüs (CIV), *Iridovirus* cinsinin virüs taksonomisi uluslararası komitesi (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından kabul edilmiş tip türüdür. ICTV tarafından kabul görmüş *Iridoviridae* familyasının tip türleri üzerine yapılan çalışmalar diğer iridoviridler için model oluşturmaktadır.

Virüsler patojen olmalarının dışında son birkaç yıldır ilaç üretimi ve gen terapisinde kullanılabilecek ara vektör olabilmeleri, nanoteknoloji ve elektronik gibi alanlarda model oluşturmaları sebepleri ile yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Ökaryotik gen ifade vektörleri, aşılar ve biyobenzer ilaçların geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Ayrıca böcek virüslerinin gen ifade vektörü olarak kullanılmasının önemli avantajları vardır. Bunlar ökaryotik virüs olmalarından dolayı gen ifadesinde ihtiyaç duyulan posttranslasyonel modifikasyonları sağlaması, insan ve sıcak kanlı hayvan hücrelerinde enfeksiyon oluşturmamaları ve vektörün büyük ölçekli hücrelere aktarımının kolay olmasıdır. Bu avantajlarından dolayı böcek virüsleri gen ifade ve gen terapi vektörü olarak geliştirilmektedir. Virüslerin gen ifade/terapi vektörleri olarak biyoteknolojik ürünlere dönüştürülebilmesi için yapıları, biyofiziksel özellikleri ve enfeksiyonu takiben yeni virüs inşasının aşamaları üzerinde çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir.

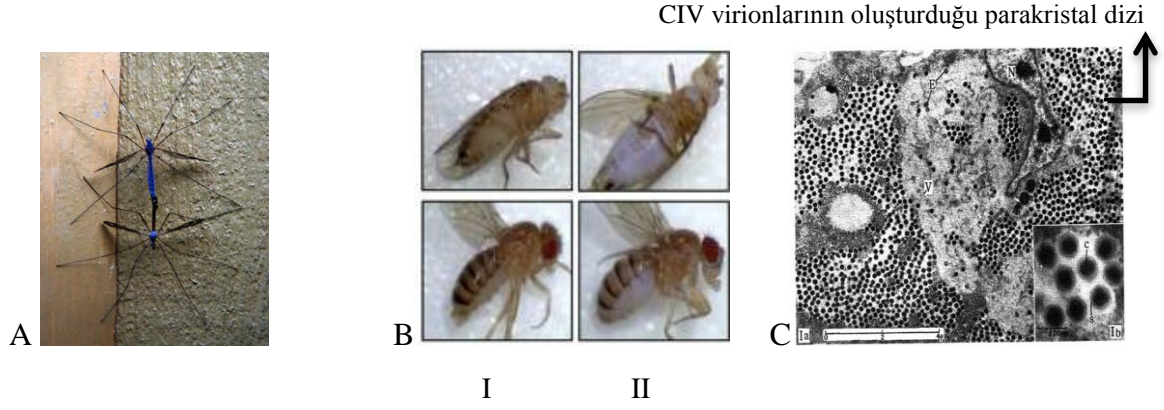
Ziraatte zararlı böceklerle mücadele etmek için genellikle kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak böcekler zamanla kullanılan kimyasallara karşı direnç geliştirmektedir. Bu nedenle zararlı böcekleri öldürmek için kullanılan kimyasal miktarı arttırılmakta ve yeraltı kaynakları bu kimyasallarla kontamine olmaktadır. Doğada biriken bu kimyasallar büyük problem oluştururken etraftaki yararlı böcekleri de etkilemektedir. Bu sorunların üstesinden gelecek yeni kimyasalların keşfinde de büyük zorluklar yaşanmaktadır. Bütün bunlardan dolayı, alternatif, biyolojik (özellikle mikrobiyal) kontrol sistemlerinin geliştirilmesi oldukça büyük bir öneme sahiptir. CIV, zirai açıdan zararlı birçok böcekte ölümcül ve ölümcül olmayan enfeksiyonlara sebep olmaktadır ve böylece, potansiyel bir biyokontrol materyelidir. Pamuk böceği gibi bitlerin larvaları bitkilerin

içerisinde gelişirler ve dışarıdan müdahaleden etkilenmemektedirler. Bu gibi durumlarda insektisidal proteinlerin keşfi, hangi genler tarafından kodlandığının tespit edilmesi oldukça önemlidir. CIV'nin yapısal proteinlerinin de böceklerde metamorfik değişimlere ve ölüme sebep olduğu bu sebeple de yapısal proteinlerin insektisidal proteinler içerdiği bilinmektedir. Proteinler arasındaki etkileşimlerin tespit edilmesi genlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasını kolaylaştıracaktır.

Maya-iki-hibrit sistemi birçok protein arasındaki etkileşimleri tespit etmek için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bu yöntem 1989 yılından beri giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bu şekilde çeşitli proteinler arasındaki etkileşimleri gösteren birçok interaktom haritaları şu ana kadar oluşturulmuştur. Virüs yapısal proteinleri arasındaki etkileşimlerin tespiti virüsün inşası, hücreye girişi ve hücreden çıkışı konularında önemli bilgiler sunmaktadır. Bununla birlikte, fonksiyonu bilinmeyen proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılması konusunda protein etkileşimlerinin tespiti oldukça önemlidir. Bu sebeple bu güne kadar birçok virüsün yapısal proteinleri arasındaki etkileşimler maya-iki-hibrit sistemi ile belirlenmiş olmasına rağmen Chilo iridescent virüs hakkında literatürde konu ile ilgili herhangi bir bilgi mevcut değildir. Böylece, bu tez kapsamında ilk defa Chilo iridescent virüse ait yapısal proteinler arasındaki etkileşimler maya-iki-hibrit sistemi kullanılarak tespit edilmiştir.

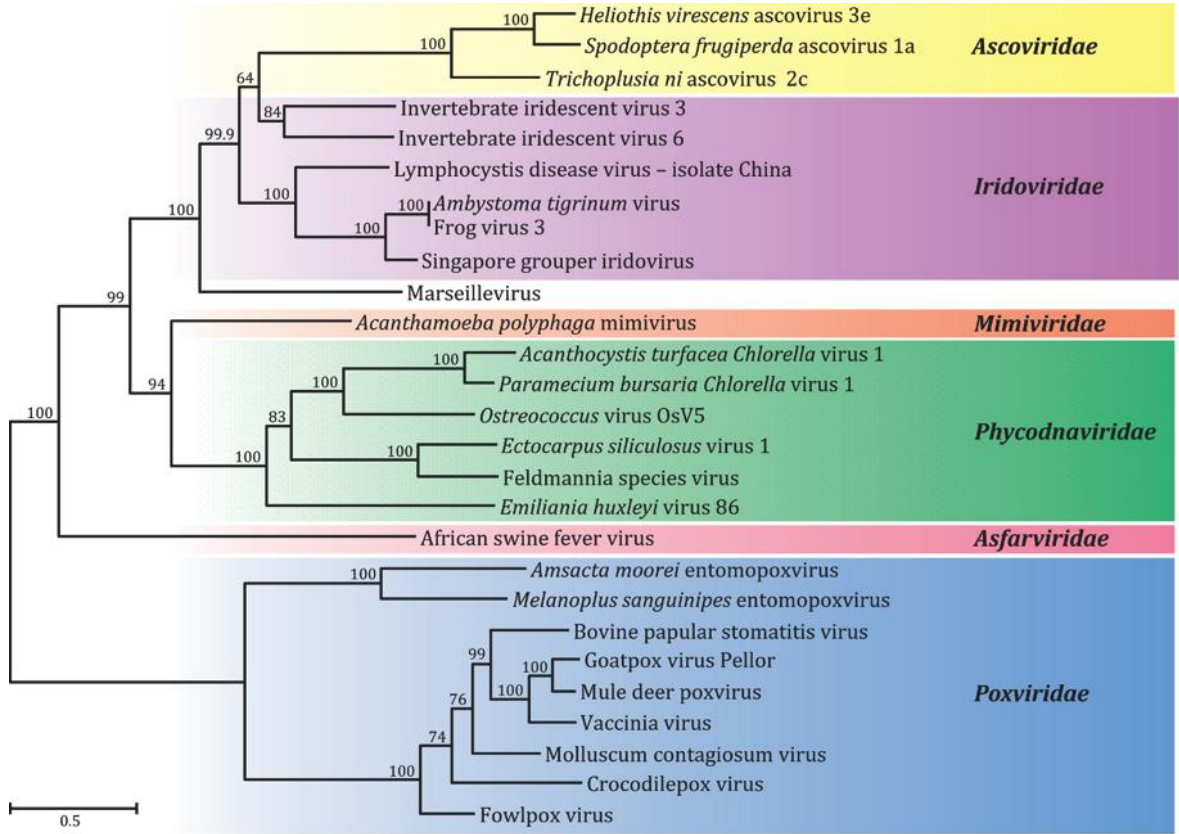
1.2. Iridoviridae Familyası

Iridoviridae familyasına mensup ilk iridovirid, 1954 yılında, İngiltere'de Claude Rivers'in çayır sineklerinin (*Tipula paludosa*) Invertebrate iridescent virüs-1 (IIV1) ile ağır enfeksiyonları sonucu büyük bir grup halinde yerden yükselişleri sırasında oluşturdukları mükemmel bir şekilde parlayan iridescent renk (Iridescence: gökkuşağı gibi parlayan, mavi-yeşil, Şekil 1A ve 1B) karşısındaki merakı sonucu keşfedildi (Williams, 1996). Daha sonra keşfedilen bu virüs Nature dergisinde Nick Xeros tarafından 1954 yılında yayınlandı. İridovirüsler ziraatte zararlı böcekler ile hastalık taşıyan vektör böcekler üzerine olan etkileri sebebi ile potansiyel biyolojik kontrol materyali olarak düşünülmektedir (Williams, 1996).



Şekil 1. Iridovirüs enfeksiyonu. A: Çayır sineklerinde iridovirus enfeksiyonu (Boumans ve Aarnes, 2010), B: Chilo iridescent virüs enfeksiyonu. I: CIV ile enfekte olmamış *Drosophila melanogaster* (Bronkhorst vd., 2012) II: CIV ile enfekte olmuş *Drosophila melanogaster*'de oluşan iridesent renk (Bronkhorst vd., 2012). C: CIV ile enfekte olmuş *Chilo suppressalis* yağ hücrelerinde iridesent renk oluşumuna neden olan parakristal dizi (Fukaya ve Nasu, 1966).

İridoviridler büyük, ikozahedral simetride olup lineer, çift zincirli tek DNA genomuna sahiptir (Jankovich vd., 2012). Diğer DNA virüslerinden farklı olarak virüs partikülleri hücreden çıkış şekillerine göre zarflı (hücre membranından tomurcuklanma ile salınım) veya çıplak (liziz ile salınım) olabilir. Dış zarf haricinde iridoviridlerin kapsid ile DNA arasında uzanan lipid bir membrana sahip olmaları da bunları diğer DNA virüslerinden ayıran başka bir özelliğidir. İridoviridlerin enfeksiyonu sonucu sitoplazmada oldukça büyük 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 çapında bir dizi olacak şekilde sıralanır. Bu diziye “parakristal dizi” denir (Şekil 1C) ve iridovirüsleri diğer DNA virüslerinden ayıran önemli bir özelliktir. Bununla birlikte, iridoviridler diğer ökaryotik DNA virüslerinden genomik organizasyonları ile ayrılırlar. İridovirid genomu dönen çember (rolling circle) replikasyonu sonucu büyük konkatamerler şeklinde üretilir. İridovirid genomu, hacim bağımlı (headfull) mekanizma ile kapsid içine paketlenmiş, halkasal permutasyona (circularly permuted) ve genomun uç kısımlarında dizi tekrarlarına (terminal redundancy, terminal tekrarlar) sahiptir. Terminal tekrarlar genoma %10-30 oranında fazlalık katar (Williams vd., 2005). Şekil 2'de *Iridoviridae* familyasının, diğer nükleositolazmik çift zincir DNA virüsleri ile olan filogenetik ilişkisi gösterilmiştir.

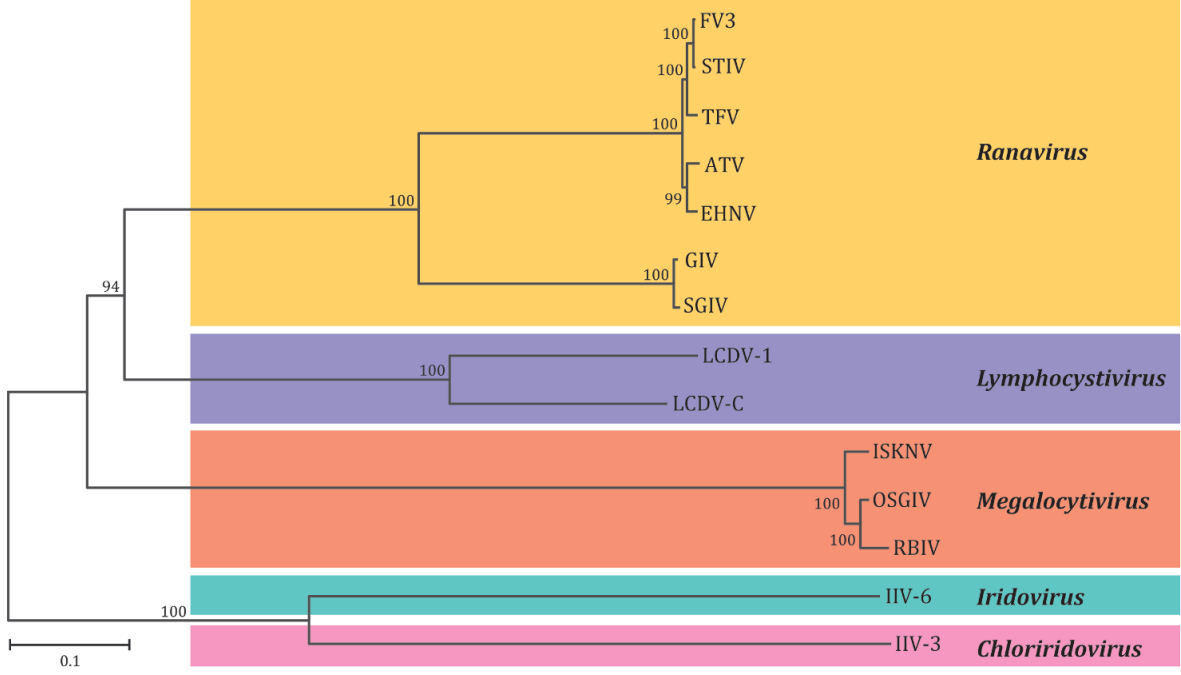


Şekil 2. *Iridoviridae* familyasının nükleositoplazmik çift zincir DNA virüsleri ile filogenetik ilişkisi. D5 tip ATPaz, DNA polimeraz B, A32 ATPaz, majör kapsid protein ve A1L/VLTF2 transkripsiyon faktörü gen dizileri açısından familyaların filogenetik analizi (Boyer vd., 2009; Jankovich vd., 2012).

Iridoviridae familyasının üyeleri özellikle 1980 yılından sonra yabani ve kültürü yapılan balık, kurbağa, çekirge gibi hayvanlarda oluşturdukları yüksek miktarda ölümcül enfeksiyonlar nedeni ile önem kazanmıştır (Williams vd., 2005). Bununla birlikte *Iridovirus* cinsinin üyeleri biyolojik kontrol materyali olarak kullanılabilir önemli türleri içermektedir (D'Costa vd., 2012). Aynı zamanda *Iridovirus* cinsinin üyelerinin oluşturduğu iridesent renk oluşumu ve kapsid yapısı biyoteknolojik açıdan model olabilecek potansiyeldedir (Radloff vd., 2005; Hartschuh vd., 2008).

1.2.1. *Iridoviridae* Familyasının Cinsleri ve Özellikler

Günümüzde ICTV tarafından kabul edilen *Iridoviridae* familyasının taksonomik yapısı *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* ve *Megalocytivirus* olmak üzere 5 cinsten oluşmaktadır (Jankovich vd., 2012) (Şekil 3).



Şekil 3. Iridoviridlerin filogenetik analizi. *Iridoviridae* familyasının cinsleri arasındaki ilişki, 26 korunmuş gen dizisine göre analiz edilmiştir (Jancovich vd., 2010; Jankovich vd., 2012).

Iridoviridae familyasının üyeleri (iridoviridler) yalnızca omurgasızları (birincil olarak böcekler) ve soğukkanlı omurgalıları (balıklar, kurbağalar ve sürüngenler) enfekte eder. Bununla birlikte sucul kabuklu hayvanlar (crustacea) ve yumuşakçaları da enfekte ettikleri tahmin edilmektedir (Williams vd., 2005). Enfekte ettikleri konaklara ve genomik DNA'nın metilasyon seviyesine göre 5 iridovirid cinsi genel olarak (gelecekte iki alt familyaya ayrılabilir) iki gruba ayrılır (Chinchar vd., 2008). *Iridovirus* ve *Chloroirdovirus* cinsleri omurgasızları (örneğin böcekler, crustacealar) enfekte eder ve genomik DNA metillenmesi yoktur. Bunun aksine *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* ve *Megalocytivirus* cinsleri balıklar, kurbağalar ve sürüngenler gibi soğukkanlı omurgalı hayvanları enfekte eder ve virüs tarafından kodlanan bir DNA metiltransferaz tarafından sitozin nükleotitlerinin yaklaşık %25'i metillenir (Chinchar vd., 2008). Bununla birlikte bir

ranavirus türü olan Singapore grouper iridovirüs (SGIV) DNA metiltransferaz enzimi kodlamadığı için kendi DNA'sını metilleyemez. Konak spektrumu ve genomun metilasyonu dışında cinslerin ayırımında genomun GC içeriği, seroloji, virion morfolojisi, partikül büyüklüğü, histopatolojisi ve hastalığın klinik belirtileri de kullanılmaktadır. Majör kapsid protein ve diğer proteinlerin amino asit dizilerinin analizi de bu taksonomik ayırımı doğrulamaktadır. Aynı cins içinde bulunan virüslerin majör kapsid proteinlerinin amino asit dizilimi %70'in üzerinde benzerlik gösterirken, farklı cinslere ait türlerde bu oran %50'nin altına düşmektedir. 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 Kaplumbağa Sürüngenler Kemikli Balıklar)	Deniz balıkları

Cinsler içinde türlerin ayırımını yapmak oldukça zordur. Çünkü aynı cins içindeki türlerde majör kapsid proteinleri oldukça yüksek seviyede korunmuş ve %90'nın çok üzerinde birbirine benzemektedir. Bu sebeple virüs türlerinin birbirinden ayrılmasında virüse ait protein profili, DNA restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (RFLP), enfekte ettiği konağın türü, enfeksiyonun klinik belirtileri, nükleotit ve amino asit dizilerindeki farklılıklar gibi birden fazla özellik dikkate alınmaktadır. İridovirid izolatlarının birçoğunun DNA dizi analizinin yapılmamış olması izolatların sınıflandırılmalarını zorlaştırmaktaydı; fakat son zamanlarda birçok iridoviridin tüm genom dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi yapılan iridoviridler şunlardır: IIV-9, Invertebrate iridovirüs tip 9 (Wiseana iridovirüs); IIV-6, Invertebrate iridovirüs tip 6 (Chilo

iridovirüs); IIV-3, Invertebrate iridovirüs tip 3 (mosquito choriridovirüs); IIV-22, Invertebrate iridovirüs tip 22; IIV-25, Invertebrate iridovirüs tip 25, IIV-30, Invertebrate iridovirüs tip 30; IIV-31, Invertebrate iridovirüs tip 31; LCDV-1, Lymphocystis disease virüs 1; LCDV-C, Lymphocystis disease virüs-China; TFV, tiger frog virüs; ATV, Ambystoma tigrinum virüs; FV3, Frog virüs 3; STIV, soft-shelled turtle iridovirüs; EHNV, Epizootic haematopoietic necrosis virüs; SGIV, Singapore grouper iridovirüs; GIV, grouper iridovirüs; RGV, Rana grylio 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; LYCIV, large yellow croaker iridovirüs; ESV; European sheatfish ranavirüs (Tablo 2). Birbirine çok benzer virüslere izole edildikleri konak türü veya coğrafik bölgeye göre farklı isimler verilmektedir.

Tablo 2. Tüm genom analizi yapılmış iridoviridler.

Virüs Cinsi	Türler	Genom Büyüklüğü (bp)	ORF Sayısı	%G+C	GenBank Accession 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-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
<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>ESV</u>	127732	136	54,2	JQ724856	Mavian vd., 2012
	RGV	105,791	106	55	JQ654586	Lei vd., 2012
	<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
	STIV	105,890	105	55,1	EU627010	Huang vd., 2009
	<u>EHNV</u>	127,011	100	54	FJ433873	Jancovich vd., 2010

Tablo 2'nin devamı

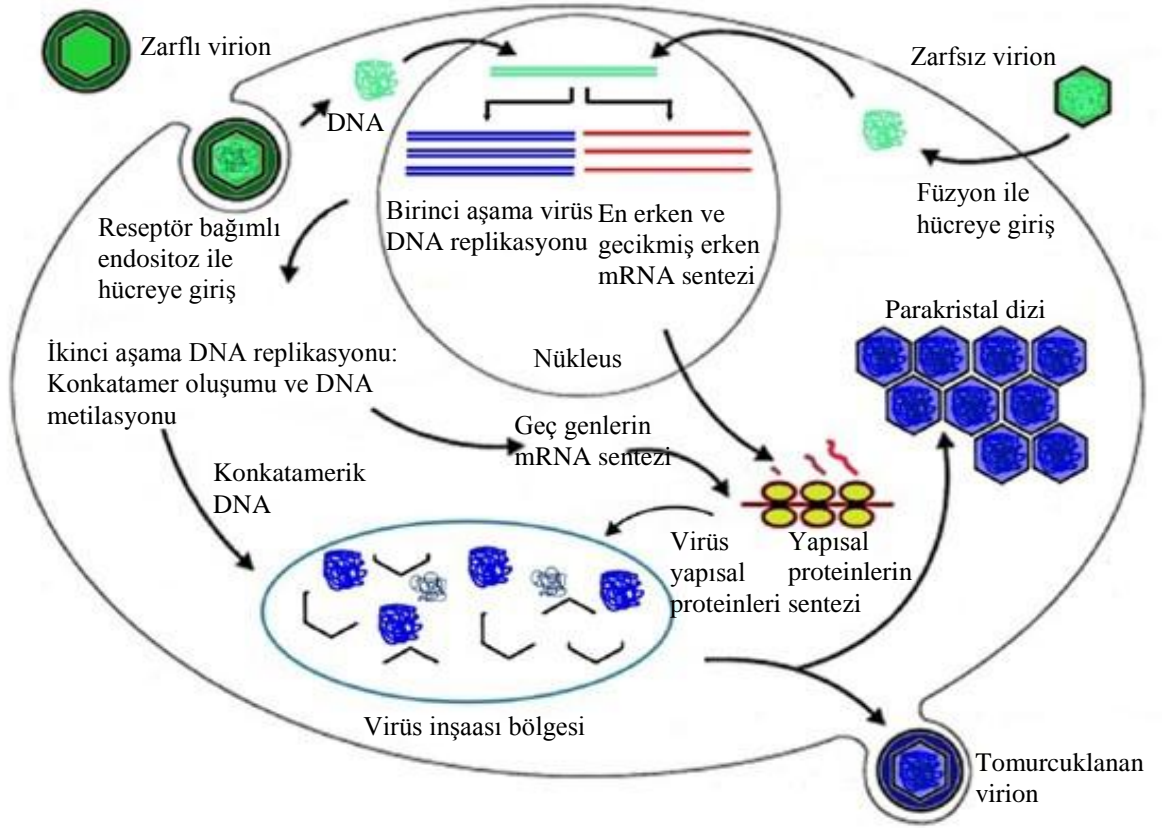
	SGIV	140,131	162	48,6	AY521625	Song vd., 2004
	GIV	139,793	120	49	AY666015	Tsai vd., 2005
	LYCIV	111,767	-	54	AY779031	Yayınlanmamış
	<u>ISKNV</u>	111,362	125	54,8	AF371960	He vd., 2001
<i>Megalocytivirus</i>	RBIV	112,080	118	53	AY532606	Do vd., 2004
	RSIV*	112,414	93	53	AB104413	Nakajima ve Kunita, 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.

1.2.2. *Iridoviridae* Familyasında Virüslerin Hücreye Girişi ve Genom Replikasyonu

İridoviridlerin replikasyonu hakkında bilinenlerin çoğu FV-3 (Frog virüs-3, *Ranavirus* cinsinin tip türü) virüsü üzerine yapılan çalışmalar sonucu açığa çıkmıştır ve bu diğer iridoviridler için model olarak kullanılmaktadır (Williams vd., 2005). İridoviridler 30°C'nin üzerinde replike olamazlar (Williams, 2008). 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 girerlerken çıplak virionlar 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 hücresel RNA polimeraz II'nin aktivasyonunu sağlar. Bu süreç ile ilgili oldukça az bilgi mevcuttur. En erken ve gecikmiş erken genler DNA polimeraz ve hücresel 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 iridoviridlerce kodlanmaktadır. Geç genlerin transkripsiyonu için virüsün ürettiği RNA polimeraz kullanılır veya hücrel RNA polimerazın nükleustan sitoplazmaya geçişini sağlayacak bir mekanizma kullanılmaktadır. İridoviridler iki aşamalı DNA replikasyonuna sahip oldukları için (DNA replikasyonunun önce nükleusta sonra sitoplazmada devam etmesinden dolayı) nükleositoplazmik virüslere aittir. Geç gen transkriptlerinin yapısal genleri kodladığı düşünülmüştür; fakat Chilo iridescent virüs ile yapılan çalışmalar her sınıftan yapısal genlerin bulunduğunu göstermiştir (İnce vd., 2013; İnce vd., 2014). 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 paketlenmesi düşünülmektedir. Böylece virüse ait genom hem terminal tekrarlara (terminal redundancy) hem de halkasal permütasyona (circular permutation) sahip olur. Halkasal permütasyon, bir hücrede üretilen yavru virionların herbirinin sahip olduğu genomun uçlarındaki dizilerin birbirinden farklı olduğu anlamına gelirken, terminal redundansi bir viriondaki genom ucundaki bir kısım dizinin tekrar ettiği anlamını taşımaktadır (Williams, 2008). 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 lizisi 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). FV-3 DNA'sı için replikasyon modeli Şekil 4'te şematik olarak gösterilmiştir (Chinchar vd., 2011). Bunlarla birlikte iridoviridlerde saflaştırılmış virüs DNA'sı hücreye transfekte edildiğinde CIV ve FV-3'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; Naçacıoğlu vd., 2003).



Şekil 4. Frog virüs-3 DNA'sının replikasyon modeli. Bu şekil ICTV'nin 9. Raporundan alınmıştır (Chinchar vd., 2011).

1.2.3. Iridovirus Cinsi

Iridovirus cinsi şu an için ICTV tarafından kabul edilmiş iki tür ve henüz birbirlerinden farklılıklarını ortaya koyacak yeterli bilgi olmadığı için kesin kabul edilmemiş 11 türü kapsamaktadır (Jankovich vd., 2012). Bu türler Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. *Iridovirus* cinsine ait türler

Virüs (Alternatif isim)	Kısaltma	Konak Türü (Ordo) ^a	İzolasyon Bölgesi
ICTV tarafından kabul edilen türler			
<i>Invertebrate iridescent virus 1</i> (Tipula iridescent virüs, TIV)	IIV-1	<i>Tipula paludosa</i> (D)	İngiltere
<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (Chilo 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.

1.2.3.1. Chilo Iridescent Virüs

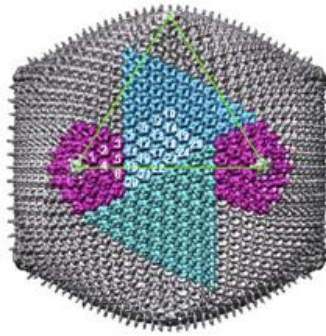
Iridovirus cinsinin tip türü olan Chilo iridescent virüs (CIV) günümüzde sistematik açıdan omurgasız iridescent virüs tip-6 (Invertebrate Iridescent Virus Type-6, IIV-6) olarak adlandırılmaktadır. CIV, lepidopter grubuna dâhil olan kök delici *Chilo suppressalis* (pirinç sap kurdu) (Fukaya ve Nasu, 1966) böceğinden izole edilmiştir. 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) hücre kültüründe (BRL-AG-3A) kolayca büyütülüp çoğaltılabilmesidir (D'Costa vd., 2012). Böylece ilk rekombinant CIV yapımı da *Anthonomus grandis* hücrelerinde gerçekleştirilmiştir (Ozgen 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) (Nalçacıoğlu vd., 2003; Nalçacıoğlu vd., 2007) hücre kültürlerinde replike olabilmekte ve çalışılabilir. Ayrıca 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).

CIV çift zincir DNA virüsleri için model olarak kullanılan bir virüstür. RNA virüslerinin genel olarak konakta RNAi mekanizmasının çalışmasına sebep olduğu bilinmektedir. DNA virüslerinin de konakta RNAi mekanizmasının çalışmasına sebep olup olmadığı CIV model olarak kullanılarak araştırılmıştır. Bu araştırmalarda CIV'nin *Drosophila melanogaster* S2 hücrelerinde RNAi mekanizmasının çalışmasına sebep olduğu (Bronkhorst vd., 2012) ve konak hücrelerin oluşturduğu bu antiviral cevaba karşı CIV'de bulunan 340R geninin konakta üretilen çift zincir RNA'lara bağlanarak siRNA üretimini engellediği belirlenmiştir (Bronkhorst vd., 2014).

1.2.3.1.1. Chilo Iridescent Virüs'ün Morfolojisi ve Virion Yapısı

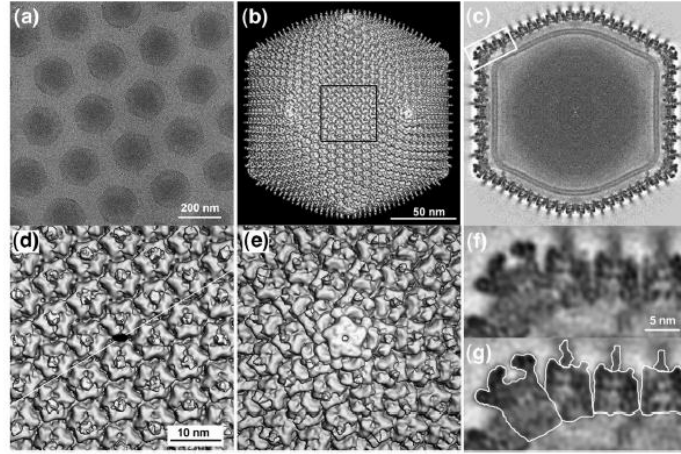
CIV virionları içten dışa doğru sırasıyla proteinlerle ilişkili DNA'dan oluşan öz, iç lipid membran, kapsid ve zarftan (hücreden tomurcuklanarak çıktığı durumlarda)

oluşmaktadır. CIV virionları iki (kenarlara göre), üç (eşkenar yüzlere göre) ve beş (köşelere göre) eksen boyunca katlandığında benzer yapılar oluşturmaktadır. Bu simetrieri açısından bakıldığında CIV virionları ikili simetriye göre 162 nm, üçlü simetriye göre 165 nm ve beşli simetriye göre 185 nm çaplarında tespit edilmiştir (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 5). Trisimetronların (20 tane eşkenar üçgen) her birinde 55 kapsomer vardır (toplam $55 \times 20 = 1100$ kapsomer). Bu kapsomerler aralarında 7,5 nm uzaklık olacak şekilde paketlenmiştir. İki trisimetron arasında 60 derecelik bir açı bulunur. 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 vardır. Bu kapsomerlerin herbiri altıgen şeklindedir. Altıgen şekli 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. Her MCP monomeri "jelly roll" (fıçık şeklinde) tipte iki tane beta tabaka domeini içerir. Heksavalent (altıgen) kapsomerlerle birlikte virionda pentavalent (beşgen) kapsomerler de vardır. Pentavalent kapsomerler pentasimetronların herbirinin tepe noktasında birer tane bulunur. Bu sebeple bir virionda toplam 12 tane pentavalent kapsomer vardır. Pentavalent kapsomerler trimerik kapsomerlerden çok daha büyüktür. (Yan vd., 2009).



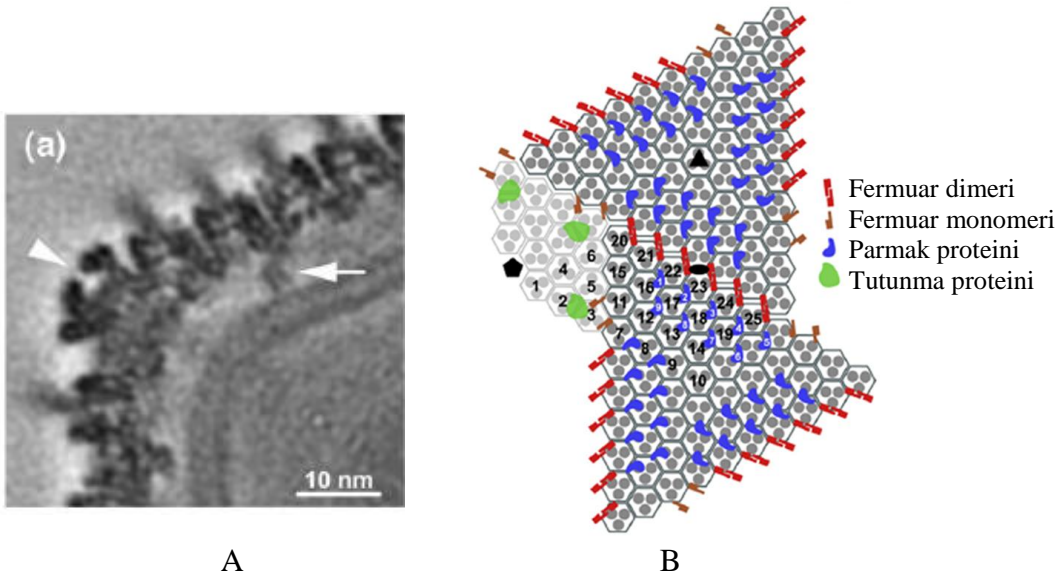
Şekil 5. Chilo iridescent virüs'deki trimerik kapsomerlerin organizasyonu. 20 trisimetron (biri açık ve diğeri koyu mavi renkli) ve 12 pentasimetron (pembe renkli). İkozahedronun bir üçgen yüzeyi yeşil çizgi ile gösterilmiş (Yan vd., 2009).

CIV virionları ($\approx 1 \times 10^9$ Dalton)'nın 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 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 iridovirid ve askovirüslerdeki proteinlerle homoloji gösterir. P50 (51,4 kDa, 467 amino asid, majör kapsid proteini, MCP) toplam protein kütlelerinin yaklaşık yarısı (%40) kadardır. Diğer yapısal proteinlerin lokalizasyonları ve organizasyonları bilinmemektedir (Şekil 6).



Şekil 6. 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 heksavalent kapsomerlerden daha büyük olması, ortada bir boşluğun olması ve fibrilin 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).

İç lipid membran ile ilişkili ve kapsid yüzeyinde tanımlanmış birçok protein bulunmaktadır (Yan vd., 2009). Bunlara genel olarak minör kapsid proteinleri adı verilmiştir. Bunlar fermuar (zip) monomerleri, fermuar dimerleri, parmak (finger) proteinleri ve tutunma (anchor) proteinleridir (Şekil 7). Fermuar dimerleri yanyana olan trisimetronların kenarlarında bulunan trimerik kapsomerleri birbirine sıkıca bağlarken fermuar monomerleri pentasimetronlardaki kapsomerleri yanındaki komşu trisimetronların kapsomerlerine bağlar. Parmak proteinler trisimetronların üç kenarında dokuz adet olacak şekilde kapsomerleri birbirine bağlar. Tutunma proteinleri pentavalent kapsomerlerden (pentasimetronların tepe noktası) iki kapsomer uzaklıkta lipid membran ile herbir pentasimetronu birbirine bağlar. Bunlar haricinde diğer transmembran proteinlerde kapsidde mevcuttur; fakat sadece tutunma proteinleri görüntülenebilmiştir. MCP ile karşılaştırıldığında fermuar proteinleri 11,9 kDa, parmak proteinleri 19,7 kDa ve tutunma proteinleri 32,4 kDa olacak şekilde hesaplanmıştır (Yan vd., 2009). Kapsidin dış yüzeyi esnek fibrillerle kaplıdır. CIV virionlarında her bir trimerik kapsomerin ortasından çıkan 35 nm uzunluğunda 2 nm kalınlığında tek bir fibril vardır. Fibrillerin fonksiyonu ise bilinmemektedir. Buna rağmen bu fibrillerin uzunluğunun parakristal dizide virionlar arasındaki uzaklığı belirlediği ve bu uzaklığında iridesent renk oluşumu için önemli olduğu bilinmektedir (Williams ve Ward, 2010).



Şekil 7. Chilo iridescent virüs'ün minor kapsid proteinleri. (a) CIV pentasimetronlarındaki transmembran tutunma proteini. Ok ucu pentameri, ok tutunma proteinini gösteriyor. (b) Elips 2'li, üçgen 3'lü, beşgen 5'li simetriklerin katlanma bölgelerini gösteriyor (Yan vd., 2009).

CIV virionlarının %9'u lipittir (Kelly ve Vance, 1973b). 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 virionlarında karbohidrat varlığına rastlanmamıştır (Jankovich vd., 2012).

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, 1973a) 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).

1.2.3.1.2. Chilo Iridescent Virüs'ün Transkripsiyonel Regülasyonu

CIV'de gen ifadesi basamaklı bir şekilde düzenlenmekte olup ifade edilen genler 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; fakat 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 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 ile teyit edilebilirler. Yapısal proteinler dışında CIV'ye ait apoptoz inhibitör proteinini kodlayan 193R (IE) ve ekzo ve endonükleaz kodlayan 012L (IE) proteinlerinin detaylı transkripsiyonel ve fonksiyonel analizi daha önce yapılmıştır (İnce vd., 2008; Dizman vd., 2012). Bununla birlikte 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). DNA polimeraz geninin promotor bölgesinde bulunan AAAAT motifinde yapılan bir mutasyonun promotor aktivitesini neredeyse sıfıra düşürdüğü belirlenmiştir. Bu motif aynı zamanda CIV'ye ait diğer olası gecikmiş erken genlerde ve diğer iridovirüslerin promotor bölgelerinde de tespit edilmiştir (Nalçacıoğlu vd., 2007)

CIV mRNA'ları poli A kuyruğuna sahip değildir (İnce vd., 2013). Şimdiye kadar iridoviridlerde 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 ribonükleotit redüktaz (RNR) geninin bir intesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Bigot vd., 2013).

1.2.3.1.3. Chilo Iridescent Virüs'ün Konak Spektrumu ve Patolojisi

CIV'nin organizmalara enjeksiyon yolu ile inokülasyonu sonucunda konak spektrumu araştırılmış ve 6 ordoya ait (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera,

Hemiptera ve Orthoptera) 100'den fazla böcek türünü enfekte ettiği tespit edilmiştir (Williams ve Ward, 2010). CIV sivrisineklerin 13 türünü ağız yoluyla enfekte edebilmektedir ve sivrisineklerde çoğunlukla ölümcül olmayan enfeksiyonlara sebep olmaktadır. 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. CIV'nin sürüngen hücrelerinde de replike olduğu belirlenmiştir. *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. Bu durum virüsün *in vivo* ve *in vitro*'da farklı yollarla enfeksiyon oluşturduğunu göstermektedir. 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).

1.3. Protein Etkileşimleri

Proteinler küçük veya büyük kompleksler oluşturmak üzere birbirleriyle etkileşirler. Protein-protein etkileşimleri (PPI) iki veya daha fazla protein arasındaki fiziksel teması ifade eder. Protein etkileşimleri hücre tipi, hücrenin gelişim safhası, hücre döngü fazı, çevresel faktörler ve diğer proteinlerin varlığı (interaktör) gibi birçok faktöre bağlı olarak düzenlenir. Bir proteinin özel bir görevini gerçekleştirebilmesi etkileşimde bulunduğu proteine bağlıdır. Birçok protein birden fazla fonksiyona sahiptir. Bu proteinlerin hangi fonksiyonu göstereceği etkileştikleri proteine göre belirlenir. Bundan dolayı, bir proteinin etkileştiği proteinlerin tanımlanması proteinin fonksiyonunu anlayabilmemiz bakımından oldukça önemlidir. Çoğu metabolik yolak iki protein veya bir çok proteinin dahil olduğu büyük kompleksleri oluşturan proteinler arasında direkt teması gerektirir (Paul vd., 2011). Proteinler arasında fiziksel temas, bu proteinlerin aktivitesini modifiye eden konformasyonel değişimleri veya posttranslasyonel modifikasyonları uyarabilir. Birçok

konformasyonel değişiklik nükleotit trifosfatların (ATP, GTP) hidrolizi tarafından gerçekleştirilir. Genel olarak konformasyondaki enerji gerektiren değişiklikler proteinlerden kompleks oluşumunu uyarır (Albert, 1998). Proteinler arasındaki fiziksel temas her zaman kararlı değildir; sürekli olarak ayrışma ve yeniden birleşme eğilimindedir. Protein etkileşimlerinin en yaygın sınıflandırılması etkileşim süresine dayanır. Protein kompleksleri çok kararlı (kalıcı PPI), az kararlı (geçici PPI) veya her ikisinin kombinasyonunu içeren gruplardan oluşur. Protein etkileşimleri oluşturdukları grupların doğasına göre farklı roller oynarlar. Proteinler hücrenel süreçlerdeki önemli rollerini gerçekleştirmek için, çok büyük bir aę oluşturarak birbirleriyle kalıcı veya geçici olarak etkileşirler (Grigoriev, 2003). Kalıcı komplekslere hemoglobin ve RNA polimeraz örnekleri verilebilir. Bütün organizmalarda bulunan ribozomlar gibi birçok büyük makromoleküler kompleks vardır. Yapısal kompleksler çoğunlukla kalıcıdır, örneğin tubilin alfa ve beta üniteleri kalıcı bir oligomer-heterodimerdir. Nükleer proteinleri içeren çoğu etkileşim dinamik ve geçicidir; fakat nükleustaki protein etkileşimlerinin bir grubu dikkate değer bir kararlılık gösterir. Kardeş hücrelere mikrotübüller boyunca kardeş kromatidlerin çekilebilmesi için gerekli olan kinetokor-sitokrom kompleksi çok kararlı bir komplekstir. Bununla birlikte, çoğu transkripsiyon faktörü geçici bir şekilde etkileşirler; fakat bazıları hedefleriyle kararlı bir kompleks oluşturur (Hemmerich vd., 2011). Proteinler arasındaki kalıcı etkileşimler disülfid bağları veya elektron paylaşımı gibi kovalent bağlarla, geçici etkileşimler ise hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri veya hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağların kombinasyonu ile gerçekleşmektedir. Örneğin proteinlerde bulunan lösin fermuarını oluşturan alfa heliksler hidrofobik etkileşimlerle diğer proteinlere bağlanır (NgounouWetie vd., 2014).

Protein etkileşimleri replikasyon, transkripsiyon, translasyon, proteinlerin katlanması, taşınması, parçalanması, hücrenel yapıların oluşumu ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli hücrenel aktivitelerde hayati öneme sahiptir. Protein etkileşimleri uyarılara (hormon bağlanma, enzim allosteri, transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonlarına etkisi) anlık cevap vermeyi sağladıkları için çok hızlıdır. Proteinler arasındaki etkileşimlerin olması ve olmaması durumunda proteinler farklı fonksiyonlar göstermektedir. Bu sebeple hücreler arası ve hücre içi sinyal iletim yollarında bütün etkileşimlerin geçici olması hayatidir. Hücre yüzeyindeki etkileşimlerin çoğunlukla ayrılma ve birleşmeleri çok hızlıdır. Protein etkileşimlerinin sayılamayacak kadar çok biyolojik etkileri vardır. Proteinler substratıyla etkileşime girerek değişen enzimlerin özelliklerini etkiler ve hücre iskeleti gibi yapısal

birimlerin oluşmasını sağlar. Proteinler proteinlerin substratlarına bağlanma spesifikliği sağlayabilir, diğer proteinleri inaktive edebilir veya onları degradasyondan koruyabilir. Protein etkileşimleri canlı bir hücrede her süreçte en hayati bileşendir. Bu sebeple protein etkileşimlerinin karakterizasyonu, proteinleri ve onları kodlayan genlerin fonksiyonlarını tespit etmede kullanılan önemli bir araçtır. Proteinler genellikle aynı hücresel süreçlerde rol alan aynı komplekslerin parçalarıdır, böylece protein fonksiyonlarını tespit etmenin güçlü metodlarından biri o proteinin etkileştiği proteinleri tanımlamaktır (NgounouWetie vd., 2014).

Yukarıda bahsedildiği gibi bir organizmanın kendi proteinleri arasındaki etkileşimlerin tespit edilmesinin önemiyle birlikte konak patojen arasındaki protein etkileşimlerinin de tanımlanması oldukça önemlidir. Örneğin virüs enfeksiyonunda konak faktörlerin tanımlanması, virüsün konak hücrede hedeflediği proteinlerin tespiti, konak immun sistemi ile olan ilişkisinin belirlenmesi ile açığa çıkacak bilgiler virüs-konak proteinlerinin birbiri ile etkileşiminin tespit edilmesiyle elde edilebilir ve bu bilgiler virüse karşı ilaç geliştirebilmek için çok önemlidir (Friedel ve Haas, 2011). Ayrıca virüs-konak arasındaki protein etkileşimlerinin tanımlanması viral tropizm ve patojenitesinin araştırılması için çok değerli bir araçtır. Örneğin poksvirüslerden olan variola virüs proteomu ile insan cDNA kütüphanesi maya-iki-hibrit sistemi ile test edilmiştir (Mohamed vd., 2009). Buradan çıkan sonuçlardan biri virüse ait G1R proteininin konağın NFkB proteini ile doğrudan olarak etkileşmesidir. NFkB proteini çok fazla sayıda bağışıklık sistemi elemanını kodlayan genlerin transkripsiyonel faktörüdür. Poksvirüs ve diğer birçok virüs konağın NFkB sinyal iletim yolağını etkileyerek virüse karşı bağışık cevabın oluşmasına engel olur, bu sayede virüs hayatta kalmayı başarır (Mohamed vd., 2009). Bu sebeplerden dolayı protein etkileşimlerinin tanımlanması geçtiğimiz bir kaç yıldır çok yoğun bir şekilde çalışılmaktadır .

Proteomik çalışmalar genomik çalışmalara göre çok daha fazla komplekstir çünkü proteinler amino asit dizisi, ifade seviyesi, translasyon sonrası değişiklikler (glikolizasyon, fosforilasyon gibi) ve alternatif splysing gibi birçok seviyede değişikliklere uğrayarak çeşitlilik gösterir. Protein etkileşimlerinin tanımlanması ve interaktom haritalarının çizilmesi, proteomik alanın en önemli önceliğidir.

Protein etkileşimlerini belirlemek için öncelikle basit organizmalarda tespit edilen protein etkileşimlerinin homologları yüksek organizmalar için bir örnek teşkil eder. Bu şekilde bu örnekler deneysel metodlarla test edilerek bir sonuca ulaşılır. İkinci olarak

biyoinformatik çalışmalar bu konuda oldukça fazla yapılmaktadır. Bilinen protein etkileşimlerinde rol oynayan domeinler, diğer proteinlerde araştırılarak etkileşimde bulunabilecek proteinler biyoinformatik olarak tanımlanmaktadır. Yine deneysel sonuçlardan çıkan etkileşimler biyoinformatik çalışmalarla birleştirilmekte ve birçok karmaşık sinyal iletim yolları açıklanmaktadır. Son olarak protein etkileşimlerini tespit etmek için deneysel yöntemler kullanılır. Protein etkileşimlerinin karakterizasyonunda kullanılan deneysel metodlar deneysel düzeneğin doğasına göre değişiklik gösterir. Örneğin maya-iki-hibrit (Y2H) sistemi kullanılarak, ilgilenilen bir proteinin cDNA kütüphanesi gibi çok yüksek sayıda protein ile arasındaki etkileşimler test edilebilir. Pull-down analiz gibi diğer tekniklerle, ilgilenilen iki protein arasındaki etkileşim teyit edilir. Protein etkileşimlerinin çalışılmasında kullanılan teknikler genel olarak üç gruba ayrılır. Bunlar genetik yöntemler (Y2H, memeli iki hibrit), biyokimyasal yöntemler (pull-down analizi, co-immunopresipitasyon, Affinite kromatografisi-Kütle spektrometrisi, cross-linking) ve biyofiziksel yöntemler (Analitik ultrasantrifügasyon, immunofloresan mikroskopi, birlikte lokalizasyon/FRET/BRET, konfokal mikroskopi, Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)) dir. Bu yöntemlerin karşılaştırmaları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan bütün tekniklerin kendine göre bir avantajı ve dezavantajı bulunmaktadır. Bu sebeple protein etkileşimlerini birden fazla teknik ve yaklaşımla analiz ederek yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak çok önemlidir. Genel olarak araştırmacılar genetik metotla tespit edilen bir etkileşimi biyokimyasal olarak da doğrulamaktadırlar. Bununla birlikte bir proteomik çalışmada çok fazla etkileşim tespit edilmişse bunlardan bir veya birkaç tanesinin doğrulanması ile çalışma sonuçlandırılır. Çünkü çıkan bütün etkileşimleri doğrulamak çok fazla zaman ve masraf gerektirir (Ngounou Wetie vd., 2014).

Tablo 4. Protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan metodlar

<i>Method</i>	<i>Deneysel Amaç: Yeni Keşif</i>	<i>Deneysel Amaç: Doğrulama ya da Karakterizasyon</i>	<i>Hücreye dayalı deneysel şekil</i>	<i>Hücre bağımsız deneysel şekil</i>
Maya-İki-Hibrit Sistemi	+	-	+	-
Memeli-İki-Hibrit Sistemi	+	+	+	-
Protein Mikroarray	+	+	+	+
Faj display	+	-	+	-

Tablo 4'ün devamı

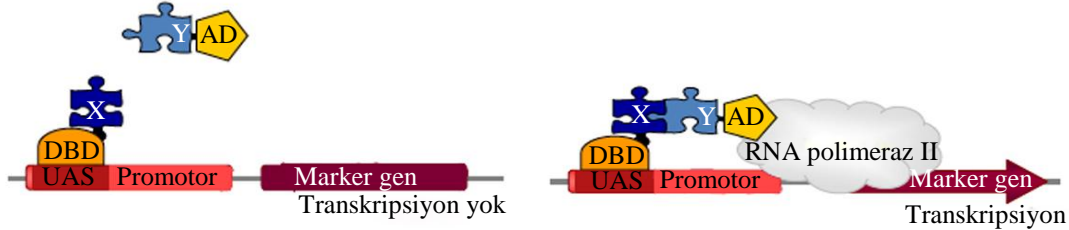
Afinite kromatografisi ve Kütle Spektrometresi	+	+	+	+
Pull-down Analizi (Çöktürme)	-	+	+	+
Co-immunoprecipitation (immünöçeltme)	-	+	+	+
Colocalization/FRET/BRET (floresan rezonans enerji transferi)	-	+	+	-
Cross-linking (çapraz bağlanma)	-	+	+	+
Analitik ultrasentrifügasyon	-	+	-	+
İmmunofloresan/konfokal mikroskopisi	-	+	+	-
Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	-	+	-	+

1.3.1. Maya-İki-Hibrit Sistemi

Maya-iki-hibrit sistemi *Saccharomyces cerevisiae*'de protein etkileşimlerini tespit etmek için 1987 yılının başlarında Amerika'da New York State Üniversitesinde (Stony Brook) Stanley Fields tarafından fikir olarak geliştirilmiştir ve ilk defa 1989 yılında Nature dergisinde yayınlanmıştır (Fields ve Song, 1989). Y2H sisteminden önce iki protein arasındaki etkileşim genellikle biyokimyasal metodlarla çalışılmaktaydı. Tamamen yeni bir yöntem olan Y2H sisteminin geliştirilmesi ökaryotik bir transkripsiyon faktörünün moleküler analizi ile mümkün olmuştur. Ptashne Laboratuvarı mayada bir transkripsiyon faktörü olan Gal4 proteininin modüler yapısını keşfetmiştir (Brent ve Ptashne, 1985). Buna göre Gal4 spesifik bir DNA dizisine (yukarı aktivasyon domeini, UAS) bağlandıktan sonra galaktoz varlığında transkripsiyonu aktive eder. Gal4 proteini eğer iki fragmente bölünürse, N-terminal fragmenti DNA'ya hala bağlanmaktadır; fakat galaktoz varlığında transkripsiyonu aktive edememektedir. Bununla birlikte, N-terminal fragmenti, C-terminal fragmenti varlığı ile birlikte transkripsiyonu aktive eder (Keegan vd., 1986). Bu iki fragment kovalent olmayan bağlarla etkileşime girerek fonksiyonel Gal4'ü oluşturabilmektedir. Bundan dolayı, Gal4'ün iki farklı fonksiyonel domeini tanımlanmıştır: birbirlerinin varlığından bağımsız olarak fonksiyonel olan N-terminal DNA bağlanma domeini (DBD) ve C-terminal aktivasyon domeini (AD).

Bu bilginin keşfedilmesiyle birlikte Fields ve Song 1987 yılında protein etkileşimlerinin belirlenebilmesi için Gal4 transkripsiyon faktörünün modüler özelliğinden yararlanmışlardır. Ana fikir, ilgilenilen iki proteini (X ve Y) Gal4'ün AD ve DBD ile

füzyon oluşturacak şekilde maya hücrelerinde ifade etmektir. X ve Y proteini birbiri ile etkileşirse fonksiyonel bir transkripsiyon faktörü oluşacak ve marker genin transkripsiyonu gerçekleşecektir (Şekil 8). Fonksiyonel Gal4 transkripsiyonel faktörü RNA polimeraz II'yi uyararak genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Auerbach ve Stagljar, 2005).



Şekil 8. Klasik maya-iki-hibrit sistemi. (A) DNA bağlanma domeini (DBD) ile füzyon olarak ifade edilen test edilecek X proteini ve klonlandığı vektör *yem* (*bait*); aktivasyon domeini (AD) ile füzyon olarak ifade edilen potansiyel etkileşecek olan Y proteini ve klonlandığı vektör *av* (*prey*) olarak isimlendirilmiştir. (B) DBD ile füzyon olan *yem* protein (DBD-X) promotorun yukarı bölümündeki aktivatör dizisine (UAS) bağlanır. *Av* ve *yem* arasında etkileşim olması durumunda fonksiyonel bir transkripsiyon faktörü yeniden oluşur. Böylece RNA polimeraz II enzimi uyarılır ve marker genin transkripsiyonu gerçekleşir.

Geniş çaplı çalışmalarda cDNA kütüphanesi *av* olarak hazırlanır. *Av* ve *yem* genler bir maya promotorunun kontrolü altında farklı vektörler olarak oluşturulur. İlgilenilen *yem* vektörle *av* vektörler maya hücresine transform edilir. *Yem* ve *av* genler sitoplazmada ifade edilir ve ifade edilen proteinin transkripsiyonu aktive edebilmesi için nükleusa girmesi gerekir. Bu durum ise klasik maya-iki-hibrit sisteminin kullanım alanına bir sınırlama getirir. Bu sebeple ilerleyen yıllarda Y2H sisteminin farklı versiyonları da (örneğin membran proteinleri için) geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Örneğin dual *yem* sisteminde X1 proteini LexA'nın DNA bağlanma domeini (DBD) ile X2 proteini lamda bakteriyofajın cI represörünün DBD ile füzyon oluşturacak şekilde aynı hücrede ifade edilir. X1 ile pozitif etkileşim olduğu durumda LexA operatörü altındaki LEU2 ve LacZ'nin aktivasyonu, X2 ile pozitif etkileşim olduğunda cI operatörü altındaki LYS2 ve GusA (beta-glukuronidaz)'nın aktivasyonu gerçekleşir. Bu sistem büyük proteinlerin spesifik bölgeleriyle protein etkileşimi olduğunu tanımlamak için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Klasik maya-iki-hibrit sistemi Gal4'ten farklı diğer DNA bağlanma proteinlerinin (örneğin, *E. coli* represör proteini olan LexA'nın DBD), transkripsiyonel aktivatörlerinin (örneğin Herpes simplex virüsün VP16 proteini) ve çeşitli marker genlerin kullanımıyla

genişletilmiştir. İşaretçi gen olarak belirlenmesi kolay olan okzotrofik genler kullanılmaktadır. Bunlar genellikle lösin, histidin, adenin, urasil ve lizindir (LEU2, HIS3, ADE2, URA3, LYS2). Y2H sisteminin güvenilirliğini arttırmak ve spesifik olmayan etkileşimlerden dolayı olabilecek yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için genellikle iki aktif marker gen kullanılır. Maya-iki-hibrit sistemi daha sonra maya bir hibrit, üçlü hibrit şeklinde de uyarlanmıştır (Bruckner vd., 2009).

Maya-iki-hibrit sistemi zayıf ve geçici protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan hassas bir metoddur. Bu etkileşimler biyokimyasal olarak tespit edilemeyebilir; fakat kompleks biyolojik sistemlerin tam fonksiyonunu tespit etmek için önemli olabilir. Bununla birlikte, iki-hibrit sistemi *in vivo*'da gerçekleştirildiği için proteinler doğal konformasyonlarına çok benzerdir. Bu metod ile birlikte protein etkileşimlerini belirleme noktasında güvenilirliğe en yakın sonuç alınabilir (Guarente, 1993; Estojak vd., 1995).

Maya-iki-hibrit sistemi günümüzde membran proteinleri, transkripsiyonel olarak aktif olan proteinler ve hücrenin alt ünitelerinde lokalize olan proteinler gibi neredeyse bütün hücrel proteomun etkileşimini çalışabilmek için kullanılabilir.

1.4. Çalışmanın Amacı

Chilo iridescent virüs (CIV) biyo-insektisit, gen ifade ve terapi vektörü olarak geliştirilme potansiyeline sahip bir böcek virüsüdür. CIV teknolojik açıdan yapısı model olarak çalışılan bir virüsdür. Ayrıca CIV diğer büyük nükleositoplazmik çift zincir DNA virüsleri için model organizma olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, CIV ile yapılan çalışmalar ekonomik öneme sahip kültürü yapılan hayvanlarda enfeksiyon oluşturan diğer iridoviridler için model olmaktadır. CIV *Galleria mellonella* larvalarında çok fazla miktarda kolayca çoğaltılabilmektedir. CIV hücre kültüründe de rahatça çoğaltılabilmekte ve manipüle edilebilmektedir.

Protein etkileşimleri bütün organizmalarda olduğu gibi virüslerde de hayati öneme sahiptir. Virüsün enfeksiyonu başlatması, hücreye tutunması, girmesi, replikasyonu, virion inşası ve hücreden salınması gibi bütün hayati süreçlerde protein etkileşimleri rol oynamaktadır. Viral genlerin delesyonu ve morfolojik çalışmalara öncelik edecek viral interaktomun, özellikle yapısal proteinler arasındaki interaktomun bilinmesi virüsün hücreden çıkış ve inşası gibi mekanizmaların anlaşılmasına yardımcı olacak önemli bilgiler sunmaktadır (Vittone vd., 2005; Lee vd., 2008). Ayrıca protein etkileşimleri fonksiyonu

bilinmeyen proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasını kolaylaştırmaktadır (Ngounou Wete vd., 2014).

CIV üzerinde bugüne kadar önemli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan biri yapısal proteinlerin kütle spektrometrisi yöntemi ile tespit edildiği çalışmadır. Bu çalışmada CIV'ye ait tek peptid bulunması açısından 54, iki peptid açısından 46 yapısal protein tespit edilmiştir. Bu proteinlerden 36'sının bütün iridovirid ve askovirüslerde homologunun olduğu belirlenmiştir. Bugüne kadar hiçbir iridovirid için yapısal proteinler arasındaki etkileşimler çalışılmamıştır. İridovirüsler açısından bu literatürde büyük bir eksiklik vardır.

Bu doktora çalışmasının amacı CIV'e ait yapısal proteinler arasındaki protein etkileşimlerinin belirlenmesidir. Bu etkileşimlerin belirlenmesi virüsün konağa tutunmasına ve füzyonuna, konak seçicilik mekanizmasının aydınlatılmasına, virüs inşası aşamalarının belirlenmesine ve virüsün hücreden çıkışına yönelik çalışmalara önemli bir temel teşkil edecektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Virüs ve Konak

Dünyada CIV'nin çalışıldığı iki suş vardır (Williams ve Cory, 1994). Bu suşlardan biri Almanya'da Jakob ve arkadaşları tarafından tüm DNA dizi analizi yapılan virüs (Jakob vd., 2001) diğeri ise aynı suşlar oldukları belirtilen Yeni Zelanda, Avustralya ve USA izolatlarıdır (Williams vd., 2005). Bu tez çalışmasında kullanılan Chilo iridescent virüs orjinal olarak James Kalmakoff (Otago Üniversitesi, Dunedin, Yeni Zelanda) tarafından izole edilmiş olan bir Yeni Zelanda izolatu olup Dr. C. Joel Funk'dan (USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona) temin edildi.

Tezde kullanılan pGAD-T7, pGBK-T7 vektörleri ve AH109 maya suşu Monique van OERS (Wageningen Üniversitesi, Viroloji Laboratuvarı)'tan temin edildi.

2.2. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Virüsün çoğaltılması için konak olarak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları kullanıldı. Larvalar, 30 G1/2 iğne kalınlığına sahip enjektör kullanılarak virüs ile enjekte edildi. Enfekte edilen larvalar 27 °C' de 3 hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda larvalar toplanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

Virüsün saflaştırılması Marina ve arkadaşlarının (Marina vd., 1999) geliştirdikleri metoda göre gerçekleştirildi. Daha önce enfekte edilmiş larvalardan 1-2 tanesi 1 ml steril ddH₂O'da homojen hale getirildi. Homojenat sırası ile 490 xg, 960 xg ve 1.250 xg'de 10'ar dakika santrifüj edilerek doku parçalarından ve kaba partiküllerden arındırıldı. Ardından 15.300 xg'de santrifüj edilerek virüs çökelti haline getirildi. Mavi-yeşil (iridesent) çökelti 500 µl steril ddH₂O'da çözüldü ve %30'luk sukroz çözeltisi üzerine bırakıldıktan sonra 15.300 xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelti 1 kez yıkandı ve çökelti bulanıklık gidinceye kadar steril ddH₂O'da çözüldü. Bu şekilde saflaştırılan virüs 0,22 µm'lik filtreden süzülerek steril tüplerde toplandı ve +4 °C' de muhafaza edildi.

Virüs konsantrasyonunun tayini spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi (Kelly ve Tinsley, 1972). 260 nm de 1 absorbans değeri 55 µg/ml olarak kabul edildi. Konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiş virüs süspansiyonu çalışmanın ilerleyen basamaklarında kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edildi.

2.3. Primer Tasarımı

Bu tez kapsamında kullanılan maya-iki-hibrit sisteminde genler sitoplazmada *av* ve *yem* vektörler aracılığı ile güçlü bir promotor olan *ADHI* altında ifade edilirler. İfade edilen bu proteinlerin, protein etkileşimini gösterecek marker genlerin çalışmasını sağlayabilmesi için nükleusa geçmeleri gerekir. Transmembran domein içeren proteinler hücrenin membranında lokalize olacaklarından nükleusa geçemezler ve membranda proteinlerin fazlaca olması hücrede toksik etkiye sebep olur. Bu sebeple genlerin yapılarında bulunan transmembran domeinleri çıkartıldıktan sonra ifade edilmeleri gerekir.

Virüse ait yapısal proteinler arasındaki etkileşimi belirlemeyi amaçlayan bu tez çalışmasında daha önceki çalışmalarda (İnce vd., 2010) yapısal proteinler kodladıkları belirlenen 50 genin öncelikle transmembran domeinleri ve sinyal peptit varlığı araştırıldı. Bunun için SignalP ve TMHMM yazılımı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) kullanıldı. Transmembran domein içeren genlerin bu kısımları çıkartıldıktan sonra primerler tasarlandı. i) pGADT7 ve pGBKT7 vektörlerine uygun kesim bölgelerini içerecek şekilde, ii) okuma dizisinde kayma olmayacak şekilde, okuma dizisinde kayma oluşanlara prolin ve stop kodonu kodlamayacak şekilde ilave bazlar eklenerek, iii) primer çiftlerinin hibridizasyon sıcaklıkları ve birbiriyle komplementasyonlarına dikkat edilerek ve iv) başlangıç ve stop kodonları da çıkarılarak primerler tasarlandı. Çalışmada kullanılan yapısal genler Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan Chilo iridescent virüs yapısal genleri

ORF	1	2	3	4	5	6	Genin Tahmini Yapısı veya Fonksiyonu
209R	AAK82071	Q8QZQ9	115/1046	E	E	+	Serin/threonin protein kinaz (Heliothis virescens ascovirus)
149L	AAB94464	O55753	73/666	E	E	+	-
022L	AAD48148	Q9QSK4	129/1171	E	E	+	NTP1; muhtemel nükleosid trifosfataz 1; DEXDc; DEAD-benzeri helikaz süperfamilyası; SNF2 familya N-terminal domein
295L	AAK82156	Q91FM9	148/1343	IE	IE	+	Bipartite nükleer lokalizasyon sinyali, integral membran proteini
232R	AAK82093	Q91FU0	74/671	IE	IE	+	Bipartite nükleer lokalizasyon sinyali; Virüs-spesifik 2-sistein adaptör domeini; OTU domeini; DNA polimeraz (viral) N terminal domein
268L	AAK82129	Q91FQ5	78/710	IE	L	+	-
179R	AAB94478	O55767	130/1186	IE	IE	+	CAP10, muhtemel lipopolisakkarit-modifiye edici enzim, GltS; Na ⁺ /glutamat simporter [Amino asid transport ve metabolizma] Tirozin protein kinaz
274L	AAK82135	Q05815	51/467	L	E	+	Majör kapsid proteini
155L	AAB94465	O55754	28/255	IE	IE	+	-
380R	AAK82240	Q91F54	58/528	IE	IE	+	2-sistein adaptör domeini. Pkinaz, Protein kinaz domein S-TKc, Serin/Treonin protein kinaz, katalitik domein, Fosfotransferaz. Serin veya treonin-spesifik kinaz altfamilyası
443L	AAK82303	P18305	268/2432	ND	L	+	-
415R	AAK82275	Q91FB0	26,6/242	IE	E	+	-
261L	AAK82122	Q8QZQ8	150/1361	IE	IE	+	Potansiyel tekrar proteini
396R	AAK82256	Q8QZQ7	116/1057	DE	IE	+	Potansiyel tekrar proteini
118L	AAB94444	O55733	57/515	IE	IE		Miristilasyonlu membran proteini, integral membran proteini
361L	AAK82221	Q91FG3	60/542	IE	IE	+	Peptidaz-C1A-KathepsinB
117L	AAB94443	O55732	27/249	DE	IE	+	-
234R	AAK82095	Q91FT8	21/193	L	IE		İntegral membran proteini
337L	AAK82199	Q91F17	45/412	DE	ND	+	Miristilasyonlu membran proteini, integral membran proteini
198R	AAK82060	Q91FX2	52/472	DE	?	+	-
439L	AAK82299	Q91F86	59/537	IE	DE	+	Protein kinaz domein pfam00069
061R	AAB94416	O55705	17/155	ND	IE		Lizozom ilişkili membran glikoproteinleri, integral membran proteini

Tablo 5'in devamı

457L	AAK82317	Q91F69	32/294	DE	IE	-	
453L	AAK82313	Q91F73	15,2/138	IE	L	+	Protein disülfid izomeras
084L	AAB94426	O55715	18,2/165	ND	E		İntegral membran proteini
159L	AAB94468	O55757	52,3/475	L	ND		-
138R	AAB94455	O55744	12,5/114	IE	IE		İntegral membran proteini
							HMG DNA bağlanma proteinlerinin HMG-box süperfamilyası; yüksek hareketlili grup
401R	AAK82261	Q91FC4	26,7/243	L	IE	+	
111R	AAB94438	O55727	19,3/175	ND	IE		-
034R	AAK81969	Q91G63	14,4/134	IE	ND		İntegral membran proteini
203L	AAK82065	Q91FW3	17,6/160	ND	IE	+	İntegral membran proteini
142R	AAB94459	O55748	32,1/292	E	ND	+	dsRNA-spesifik ribonükleaz
309L	AAK82170	Q91FL5	23,9/217	IE	ND	+	-
329R	AAK82190	Q91FJ5	41,6/378	DE	ND	+	-
422L	AAK82282	Q91FA3	21,8/198	DE	ND	+	Bakülovirüs homoloğu
219L	AAK82081	Q91FV2	37,7/343	IE	ND	+	-
342R	AAK82203	Q91F12	9,68/88	L	L	+	-
096L	AAB94430	Q55719	19,1/174	ND	ND		Fasciclin domeini
378R	AAK82238	Q91FE6	21,2/193	DE	IE	+	2-sistein adaptör domeini
							Ctd-benzeri fosfatazların, CPDc, katalitik domeini
355R	AAK82216	Q91FG9	20/182	ND	ND	+	
325L	AAK82186	Q91FJ9	17,5/159	ND	L		İntegral membran proteini
366R	AAK82226	Q91FE8	12,5/114	ND	ND	+	-
374R	AAK82234	Q91FF0	19,12/165	DE	ND	+	Bat coronavirüs spike proteini
							Transmembran protein, integral membran proteini
010R	AAK81948	Q91G84	12,84/120	ND	ND	+	Muhtemel peptidoglikan bağlı protein, transmembran protein, integral membran proteini
213R	AAK82075	Q91FV8	58,42/522	IE	ND	+	
395R	AAK82255	Q91FC9	17,28/151	ND	E	+	-
							Uvr/REP helikaz, integral membran proteini
307L	AAK82168	Q91FL7	21,7/197	ND	?	+	DSPc; Dual spesifik fosfatazlar (DSP); Ser/Thr ve Tyr protein fosfatazlar
123R	AAB94448	O55737	15,6/142	IE	IE		
229L	AAK82090	Q91FU3	48,7/443	E	DE	+	-
312R	AAK82173	Q91FL2	10,1/92	IE	DE		-

1: NCBI GenPept accession numarası; 2: UniPrkB TrEMBL numarası; 3: Proteinin amino asit cinsinden moleküler ağırlığı 4: RT-PCR'a göre gen sınıfı 5: MS-LC analizine göre gen sınıfı 6: İridovirüs proteinleri ile homoloji

2.4. Chilo Iridescent Virüs DNA İzolasyonu

Virüs DNA izolasyonu, Schnitzler ve arkadaşları tarafından açıklanan metod modifiye edilerek gerçekleştirildi (Schnitzler vd., 1987). Tek tabaka sukroz ile saflaştırılmış 9 ml virüs üzerine 30 µl β-merkaptotanol, 100 µl proteinaz K, 400 µl 5M NaCl ve 1 ml %10'luk SDS eklendi. Karışım 37 °C'de 5 saat inkübe edildikten sonra gece

boyu +4 °C'de bekletildi. Üzerine 15 ml fenol:kloroform:izoamilalkol eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika hafifçe karıştırılarak DNA ekstre edildi. 300 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Fenol: kloroform: izoamilalkol aşaması 2 kere aynı şekilde tekrar edildi. Bundan sonraki aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Son hacmin 1/10'u kadar Na-asetat (pH 7) ve 2,5 katı kadar %100 ethanol (EtOH) ilave edildi ve karıştırıldı. -20 °C'de bir gece DNA çöktürüldü. 16.000 xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve çökelti 5 dakika kurutuldu. Çökelti 200 µl ddH₂O içinde çözüldü.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu nanodrop cihazında (Thermo Scientific) ölçüldü. Çalışma konsantrasyonu için 10 ng/µl olacak şekilde seyreltikler hazırlandı ve +4 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.5. Elektrokompotent *Escherichia coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması

Petride büyütülmüş *E. coli* DH5α hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4000 xrpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti soğuk %10'luk gliserolde çözüldü ve 5000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompetent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl'lik hacimlerde) ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.6. Chilo Iridescent Virüs Yapısal Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve Ara Vektör pJET'e Klonlanması

CIV'ye ait 47 yapısal gen doğrulama aktivitesi bulunan Phusion DNA polimeraz (Finnzymes) kullanılarak PCR ile uygun koşullarda çoğaltıldı. Agaroz jelden temizlendi. Konsantrasyonları ölçüldü ve klonlanacak gen:vektör oranı 1:3 olacak şekilde CloneJET™ PCR Klonlama Kiti (Fermentas) kullanılarak genlerin pJET1.2 vektörüne ligasyonu

yapıldı. Ligasyon ürünlerinin kompetent *E. coli* DH5 α hücrelerine elektroporasyonu sağlandı. Koloni PCR ile rekombinant klonlar analiz edildi. Bunun için reaksiyon

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

20 μ l olacak şekilde kuruldu. Karışıma transformasyondan sonra oluşan koloniler kürdanla aktarıldıktan sonra seçici besiyerine inoküle edildi. Koloni PCR ile klonlanan geni içerdiği belirlenen bir tane klon *Bgl*III enzimi ile kesilerek doğruluğu teyit edildi.

2.7. Yapısal Genlerin *Av* ve *Yem* Vektörlerine Klonlanması

Genleri içerdiği doğrulanan pJET 1.2 vektörler Tablo 7'de belirtilen herbir gen için uygun enzim kesim bölgeleriyle kesilerek genler jelden temizlendi. *Av* (pGAD-T7) ve *yem* (pGBK-T7) vektörleri de klonlanacak genlerin enzim kesim bölgelerine uygun restriksiyon enzimler ile kesildi. Restriksiyon enzimler ile kesim için: 1,5 μ g DNA, son hacmin 1/10'nu kadar 10X Restriksiyon enzimi tamponu, restriksiyon enzimlerinin her birinden 5 U kullanılarak reaksiyon kuruldu. Vektörlerin kesim reaksiyonunu başlatırken ve reaksiyonun bitimine 30 dakika kala reaksiyona ayrıca 0,5 μ l alkalın fosfataz ilave edildi. Kesim reaksiyonundan sonra insert ve vektörler kit (Nucleospin Gel and PCR cleanup, REF740609.50) kullanılarak jelden temizlendi. Konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü. Vektör:insert oranı 1:5 olacak şekilde ligasyon ve transformasyonları yapıldı. Ligasyonda kullanılacak insert nanogram miktarı şu formül ile tespit edildi: Reaksiyonda kullanılacak vektör nanogram miktarı x 5) / (vektör baz çifti uzunluğu / insert baz çifti uzunluğu). Ligasyon reaksiyonu için: 50 ng vektör DNA, hesaplanan ng insert DNA, son hacmin yarısı kadar 2X T4 DNA ligaz tamponu, 1 μ l T4 DNA ligaz, 1 μ l 10mM ATP, dH₂O kullanıldı. Ligasyon ürünü +4 °C'de bir gece inkübe edildikten sonra elektrotransformasyonla hücrelere aktarıldı. Oluşan klonlardan insert içerenleri bulmak için her petriden 4-10 koloni gene özgü geri ve plazmide özgü ileri primerlerle yukarıda belirtilen koloni PCR reaksiyonu kurularak analiz edildi. PCR sonucu pozitif çıkan

kolonilerden plazmit DNA'ları izole edildi ve uygun restriksiyon endonükleazlarla doğruluğu belirlendi. Doğruluğu belirlenen klonlar DNA dizi analizine gönderildi.

2.8. Kompetent Maya Hücrelerinin Hazırlanması

-80 °C'de muhafaza edilen maya hücreleri (AH109 suşu) YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; 20 gr Difco Pepton, 10 g yeast extract, 950 ml dH₂O, pH: 6,5, otoklavdan sonra 50 ml steril %40 dektroz çözeltisi ilave edilir) agara ekim yapıldı. 1-3 haftalık maya hücrelerinin 1-2 cm çapında olan kolonilerinden birkaç tanesi 50 ml YPD besiyerine inoküle edildi. 30 °C de 16-18 saat, OD₆₀₀>1,5 olacak şekilde, 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra gece kültürü 300 ml YPD besiyerine OD: 0,2-0,3 olacak şekilde inoküle edildi. 30 °C de 3 saat, absorbansı (OD₆₀₀) 0,4-0,6 arasında olacak şekilde, 230 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Kültür 50 ml tüplerde 1000 xg de 5 dakika oda sıcaklığında (20-21 °C) santrifüj edildi. Çökelti steril dH₂O (toplam 25-50 ml) ile yıkandı ve bir tüpte birleştirilerek yeniden santrifüj edildi. Hücre çökeltisi yeni hazırlanmış 1X TE/1X LiAc (8 ml dH₂O, 1 ml 10X TE tampon, 1 ml 1 M Lityum asetat, LiAc) içerisinde çözüldü. Hazırlanan kompetent maya hücreleri 1 saat içerisinde *yem* plazmitlerinin transformasyonunda kullanıldı.

2.9. Kompetent Maya Hücrelerine Yapısal Genleri İçeren *Yem* Vektörlerin Transformasyonu

Pozitif kontrol olarak kullanılacak, yaban tip GAL4 proteinini kodlayan pCLI plazmidi amfisilin içeren LB (Luria-Bertani; 10 gr tripton, 10 gr NaCl, 5 gr yeast extract) besiyerinde, negatif kontrol olarak insan lamin proteinini kodlayan geni içeren pGBKT7-Lam plazmidi kanamisin içeren LB besiyerinde büyütüldü ve plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen bu vektörler transformasyonda kontrol olarak kullanıldı.

İnsert içeren her bir pGBK-T7 vektörü (*bait*, *yem* vektörler) 100 ng olacak şekilde endendorf tüplere bırakıldı. Üzerlerine 100 µl kompetent hücre eklendi. Vorteks ile iyice karıştırıldı. Bunun üzerine yeni hazırlanmış 600 µl steril PEG/LiAc (polietilen glikol/lityum asetat; 8 ml %50 PEG4000, 1 ml 10X TE tampon, 1 ml 1 M lityum asetat pH 7,5) çözeltisi ilave edildi ve vorteksle en yüksek hızda karıştırıldı. Karışım 30 °C'de 30 dakika 200 rpm çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra üzerine yavaşça 70 µl DMSO ilave edildi ve nazikçe karıştırıldı. Hücrelere 42 °C'de 15 dakika ısı şoku uygulandıktan sonra 1-

2 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 14.000 rpm'de 5 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Çökelti steril 100 µl YPD içerisinde çözüldü. Çözülen çökeltinin triptofan negatif SD (synthetic defined) agar besiyeri ihtiva eden petrilere ekimi yapıldı.

2.10. *Yem* Vektörleri İçeren Maya Hücrelerine *Av* Vektörlerin Transformasyonu

Yem plazmitleri içeren her bir maya hücresinden kompetent hücre hazırlandı. Bunun için hücreler triptofan içermeyen besiyeri içinde $OD_{600} > 1,5$ olacak şekilde büyütüldü. 300 ml triptofan içermeyen besiyerine OD : 0,2-0,3 olacak şekilde inoküle edildi. 30 °C de absorbansı (OD_{600}) 0,4-0,6 arasında olacak şekilde inkübe edildi. Kültür 50 ml tüplerde 1000 xg de 5 dakika oda sıcaklığında (20-21 °C) santrifüj edildi. Çökelti steril dH₂O (toplam 25-50 ml) ile yıkandı ve bir tüpte birleştirilerek yeniden santrifüj edildi. Hücre çökeltisi yeni hazırlanmış 1X TE/1X LiAc içerisinde çözüldü. 1 saat içerisinde *av* vektörlerin transformasyonunda kullanıldı.

İnsert içeren pGADT7 vektörleri beş grup halinde (9+9+9+10+10) ependorf tüplere bırakıldı. Üzerine 100 µl kompetent hücre bırakıldı. Vorteks ile iyice karıştırıldı. Bunun üzerine yeni hazırlanmış 600 µl steril PEG/LiAc çözeltisi ilave edildi ve vorteksle en yüksek hızda karıştırıldı. Karışım 30 °C'de 30 dakika 200 rpm çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra üzerine yavaşça 70 µl DMSO ilave edildi ve nazikçe karıştırıldı. Hücrelere 42 °C'de 15 dakika ısı şoku uygulandı ve ardından 1-2 dakika buz üzerinde bekletildi. 14.000 rpm'de 5 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Çökelti steril YPD besiyeri içerisinde çözüldü. Çözülen çökeltinin triptofan, lösin, adenin, histidine negatif SD agar besiyeri ihtiva eden petrilere ekimi yapıldı. Kontrol olarak yapısal genleri içermeyen pGAD-T7 vektörü *yem* plazmidleri içeren maya hücrelerine transform edildi.

2.11. *Yem* Vektörleri İçeren Mayalardan Protein İzolasyonu

Yem vektörleri içeren her bir maya kolonisi 5 ml triptofan içermeyen (Trp-) sıvı besiyerine inoküle edildi. Gece kültürleri 50 ml Trp- besiyerine aşılındı. Hücre yoğunluğu absorbansı 0,4-0,6 olana kadar büyütüldü. Büyüyen maya hücrelerinin absorbans değerleri not edilerek buz üzerine alındı. 1000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti 50 ml dH₂O ile yıkandı. 1000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti sıvı azot içinde hızlıca donduruldu

ve -80 °C'de muhafaza edildi. Hücrelerin OD₆₀₀ üniteleri (Absorbans x 50 ml) hesaplandı. Her 7,5 OD₆₀₀ ünitesi için hücrelerin üzerine 100 µl parçalama tamponundan (1 ml parçalama tamponu stok çözeltisi (8 M üre, %5 SDS, 40 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml bromofenol mavisi), 10 µl β-merkaptoetanol, 70 µl proteaz inhibitör çözeltisi (1 mg/ml pepstatin A, 200 mM benzamidin, 10,5 mM leupeptin, 2,1 mg/ml aprotinin), 50 µl 100X PMSF (0,1742 g PMSF 10 ml isopropanolde çözülür) ilave edildi ve çözüldü. Karışım yaklaşık 80 µl civarında cam tozu (425-600 µm, Sigma) içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Hücreler 1 dakika vorteksle karıştırıldıktan sonra 14.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Üst sıvılar kaynatılarak hızlı bir şekilde %12'lik poliakrilamid jele yüklendi.

2.12. Western Blot Hibridizasyonu

Yem vektörlere klonlanan genlerin maya hücrelerinde ifade edildiklerini teyit etmek için Western blot hibridizasyonu yapıldı. Bunun için vektörde c-Myc kuyruğu ile füzyon oluşturacak şekilde ifade edilen proteinleri tespit etmek için c-Myc kuyruğuna özgü monoklonal c-Myc antikoru kullanıldı.

Yarı-kuru elektroforetik cihaz (BioRad) kullanılarak poliakrilamid jeldeki proteinler immobilon membrana aktarıldı. Bunun için immobilon-P membranı ve Whatman kâğıtları poliakrilamid jel büyüklüğünde kesildi. Elektrobloklama tamponunda ıslatıldıktan sonra cihaza 2 Whatman kâğıdı, 1 immobilon-P membranı, poliakrilamid jel ve 2 Whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildi. Cihaz 0,04 Amper'de 1 saat çalıştırıldı. Membran TBST (2,423 g/L Trizma HCl/L, 8,006 g NaCl, 1ml/L Tween20) ile 2 dakika yıkandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak TBST içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu içinde bloke edildi. Membran 3 kere 10'ar dakika TBST ile yıkandı. c-Myc antikoru (1:1000 sulandırma) içeren TBST ile hazırlanan %0,5 'lik süt tozu içinde +4 °C'de hafifçe çalkalanarak bir gece inkübe edildi. Membran tekrar 3 kere 10 'ar dakika TBST ile yıkandı. 1 saat horseradish peroksidaz (HRP) bağlı anti-mouse IgG antikor (1:1000 sulandırma) içeren TBST ile hazırlanmış %0,5'lik süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Membran 3 kere 10'ar dakika TBST ile yıkandı. Membran 1 ml West Pico Chemiluminescent Substrat (Super Signal, Fermentas) ile 30 saniye muamele edildikten sonra ChemiDoc (BioRad) cihazı ile görüntülendi.

2.13. GST-pull Down Analizi

Protein etkileşimlerinin belirlenmesi için kullanılan her yöntemin avantajı ve dezavantajları vardır. Bundan dolayı protein etkileşimlerinin birden fazla metotla belirlenmesi ortaya çıkan bilgilerin güvenilirliği açısından önemlidir. Maya-iki-hibrit gibi genetik bir yolla tespit edilen protein etkileşimleri genellikle biyokimyasal metodlardan biriyle daha doğrulanır. Çok fazla proteinin etkileşimini birden tespit etmenin mümkün olduğu maya-iki-hibrit sistemi sonucunda açığa çıkan etkileşimlerin tamamının biyokimyasal yöntemlerle tespit edilmesi hem çok fazla zaman alacağı hem de maddi açıdan çok pahalı olacağı için genellikle böyle bir çalışma bir veya birkaç tane etkileşimin doğrulanması ile sonuçlandırılır. Bu sebeple bu çalışmada maya hücrelerinde etkileştikleri belirlenen iki gen, 118L ve 415R'nin maya hücreleri dışında etkileşimlerinin doğruluğunu teyit etmek için biyokimyasal bir yöntem olan GST-pull down analizi yapılmıştır. Bu çalışmayı gerçekleştirmek için 118L'nin pGEX-2T vektörüne klonlanması, 415R'nin pET28a vektörüne klonlanması, *E. coli* BL21-pLysS hücrelerinden kompetent yapılması, oluşturulan vektörlerin BL21 hücrelerine transformasyonu, rekombinant vektörlerin analizi, protein ekspresyonu, GST-pull down analizi ve Western blot hibridizasyonu deneyleri gerçekleştirildi. Bu çalışmalardan önce genlerin transmembran domeinleri delesyona uğratıldıktan sonra vektörlere uygun enzim kesim bölgelerini içeren genlere özgü primerler tasarlandı (Tablo 6). Genler doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimiyle PCR da çoğaltıldı ve CloneJET™ PCR Klonlama Kiti (Fermentas) kullanılarak pJET 1.2 ara vektörüne klonlandı.

Tablo 6. 118L ve 415R genlerinin ifadelerinde kullanılan primerler

ORF	5'-3' Dizi Analizi
118L-Fw	<u>CGGGATCCCAATGGACTGTGAGAGAAAT</u>
118L-Rv	<u>CGGAATTCTAACCATTGTTTTTACTTTCAA</u>
415R-Rv	<u>CG GGATCCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAATAATCTCCCATCAT</u> <u>TCTATA</u>
415R-Fw	<u>GA CATATG TCAGGAGGTTATACTTCTTTG</u>

Kalın yazılan diziler restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini, italik yazılan diziler HA kuyruk kısmını, altı çizili yazılan diziler ise genlere komplementer bölgeleri göstermektedir.

2.13.1. 118L Geninin pGEX-2T Vektörüne Klonlanması

GST-pull down analizi için 118L geni GST kuyruğu ile füzyon oluşturacak şekilde bakteriyel sistemde ifade edildi. Bunun için pGEX-2T vektörü kullanıldı. pGEX-2T vektörü çoklu klonlama bölgesinin gerisinde (MCS) güçlü bir promotor ve glutation S transferaz (GST) geni içermektedir. MCS'ye klonlanan gen GST ile füzyon olacak şekilde ifade edilmektedir. 118L genini taşıyan pJET1.2 vektörü *Bam*HI ve *Eco*RI enzim kesim bölgeleri kullanılarak kesildi ve jelden temizlendi. GST kuyruğu taşıyan pGEX-2T vektörü de aynı enzimlerle kesilerek jelden temizlendi. Vektör:insert oranı 1:3 olacak şekilde bölüm 2.7'de açıklandığı gibi ligasyon reaksiyonu kuruldu. Böylece oluşturulan vektör GST-118L olarak isimlendirildi.

2.13.2. 415R Geninin pET28a Vektörüne Klonlanması

415R geninin N-terminali HA (hemaglutinin) kuyruk içerecek şekilde bakteriyel sistemde ifade edildi. Bunun için 415R genini çoğaltmak amacıyla kullanılacak geri primere HA kuyruk sırası (*AGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA*) ilave edildi. Doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimiyle gen çoğaltıldı ve pJET1.2 ara vektörüne klonlandı. Daha sonra 415R genini içeren pJET1.2 ve pET28a vektörü *Bam*HI ve *Nde*I enzim kesim bölgeleriyle Bölüm 2.7'de belirtildiği gibi kesildi ve insert:vektör oranı 1:3 olacak şekilde ligasyon reaksiyonu kuruldu. Böylece oluşturulan vektör HA-415R olarak isimlendirildi.

2.13.3. *E. coli* BL21-pLysS Hücrelerinin Kompetent Yapılması

pLysS vektörünü taşıyan *E. coli* BL21 hücreleri kloramfenikole direnç gösterir. *E. coli* BL21 hücrelerinde pET sisteminde ifade edilecek proteinlerin indüklemenden önce azda olsa ifade edilmesi pLysS vektörü varlığında engellenmektedir. Böylece yalnızca indüklemenden sonra ifade edilecek genin transkripsiyonu gerçekleşir. GST-118L ve HA-415R genlerinin ifade edilebilmeleri için *E. coli* BL21-pLysS suşu kullanıldı. Bu sebeple bu hücreler kompetent hale getirildi. Bunun için *E. coli* BL21 suşu 30 µg/ml kloramfenikol

içeren LB besiyerinde büyütüldü. Büyütülen bu hücreler Bölüm 2.5'te belirtilen yöntemle göre elektrokompotent hale getirildi.

2.13.4.Vektörlerin *E. coli* BL21 Hücrelere Transformasyonu ve Rekombinantların Analizi

118L ve 415R genlerinin ifade edilebilmesi için, GST-118L ve HA-415R vektörlerinin elektrokompotent hale getirilen *E. coli* BL21 hücrelerine elektroporator cihazı (BioRad) kullanılarak transformasyonu yapıldı. Kontrol amaçlı pGEX-2T ve pET28a vektörleri de *E. coli* BL21 hücrelerine transform edildi. Rekombinant vektörlerin analizi için uygun restriksiyon enzimler kullanılarak Bölüm 2.7'de açıklandığı gibi kesim yapıldı.

2.13.5. Protein İfadesi

pGEX-2T vektörlerini içeren *E. coli* BL21 hücreleri 100 µg/ml ampisilin ve 30 µg/ml kloramfenikol, pET28a vektörlerini içeren BL21 hücreleri 100 µg/ml kanamisin ve 30 µg/ml kloramfenikol içeren 2 ml LB sıvı besiyerinde 37 °C'de büyütüldüler. Ertesi gün 1:100 oranında 5 ml taze antibiyotik içeren LB besiyerine aşılandı. Hücreler 600 nm'de OD 0,3 oluncaya kadar büyütüldü. Son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edildi. IPTG ilave edildikten sonra 3 saat 30 °C'de inkübe edildi. 1,5 ml her bir hücreden alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 12.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Üst sıvı dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, çökelti -20 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 500 µl dH₂O'da çözüldü ve sonikasyon işlemi ile patlatıldı. 13.200 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı (çözünebilir proteinler) ve çökelti (çözünemeyen proteinler) ayrı ayrı %12'lik SDS-PAGE'de yürütüldü.

2.13.6. GST-Pull Down Analizi

Genlerin ifade edildikleri görüldükten sonra, 118L ve 415R genlerini ifade eden ve kontrol vektörleri taşıyan hücrelerden 100 ml LB besiyerinde Bölüm 2.13.5'te anlatıldığı gibi proteinler ifade edildi. Proteinlerin çözünebilir lizatları kullanılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi. 118L ve 415R'nin üretildiği hücrelerin çözünebilir kısımları birbirine karıştırıldı. Kontrol amaçlı olarak HA-415R ile pGEX-2T (sadece GST ifade edilir)

vektörlerini ihtiva eden hücrelerin çözünebilir kısımları da birbirine karıştırıldı. Karışımlar +4 °C'de 3 saat hafifçe sallanarak inkübe edildi. GST kuyruk kullanılarak protein saflaştırması yapıldı. Bunun için glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) kullanıldı. 150 µl glutathione sepharose 4B (rezin) iyice çalkalandıktan sonra bio-spin kromotografi kolonuna (BioRad) konuldu. Rezin ihtiva ettiği EtOH akıtıldıktan sonra 7 ml PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra kalan yaklaşık 120 µl rezin 120 µl PBS içinde çözüldü. Böylece 240 µl olan rezinin üstüne karıştırılan protein lizatları ilave edildi. Kromotografi kolonlarının kapakları kapatılarak +4°C'de 30 dakika rezin ve protein örnekleri yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Kolondan akan kısım kontrol için bir tüpte toplandı. Daha sonra kolonlar 15 ml PBS ile yıkandı. Yıkamalarda kolon her seferinde PBS ile çalkalandı daha sonra PBS akıtıldı. Kolona en son 100 µl toplama tamponu (1 ml son hacim içinde 3,0733 mg glutathione reduced (Sigma, G4251) ve 50 µl 1M Tris HCl pH8) ilave edildi. 5-10 dakika inkübe edildikten sonra kolondan akıtıldı. Örnekler %12'lik SDS-PAGE'de yürütüldü ve HA antikoru ile Western blot hibridizasyon analizine tabi tutuldu.

2.13.7. Western Blot Hibridizasyonu

GST kuyruk ile saflaştırılan 118L proteini ile birlikte 415R proteininin de saflaştığını görüntüleyebilmek için HA kuyruğuna özgü antikorlarla Western blot hibridizasyon analizi yapıldı.

Yarı-kuru elektroforetik cihaz (semi-dry blotting system) kullanılarak poliakrilamid jeldeki proteinler immobilon membrana aktarıldı. Bunun için immobilon-P membranı ve Whatman kâğıtları poliakrilamid jel büyüklüğünde kesildi. Transfer tamponunda ıslatıldıktan sonra cihaza 2 Whatman kâğıdı, 1 immobilon-P membranı, poliakrilamid jel ve 2 Whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildi. Cihaz 0,04 Amper` de 1 saat çalıştırıldı. Membran PBS içinde hazırlanmış %0,3'lük süt tozu içinde 2 dakika yıkandıktan sonra 3 saat oda sıcaklığında PBS içinde hazırlanmış %3'lük süt tozu içinde bloke edildi. Membran 3 kere 10'ar dakika %0,3'lük süt tozu içinde yıkandı. 1 saat primer antikoru (1:1000 sulandırma) içeren %0,3'lük süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmesi sağlandı. Membran tekrar 3 kere 10'ar dakika %0,3'lük süt tozu içinde yıkandı. 1 saat alkalın fosfataz (AP) bağlı sekonder antikor (1:1000 sulandırma) içeren %0,3'lük süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmesi sağlandı. Membran 3 kere 10'ar dakika %0,3'lük süt tozu içinde yıkandıktan

sonra 2 kere 10'ar dakika AP tampon içinde yıkandı. Ardından 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stok solusyonu, Roche, 11681451001) içeren 10 ml AP tampon içinde boyandı. Membran bolca dH₂O ile yıkanarak, reaksiyon durduruldu.

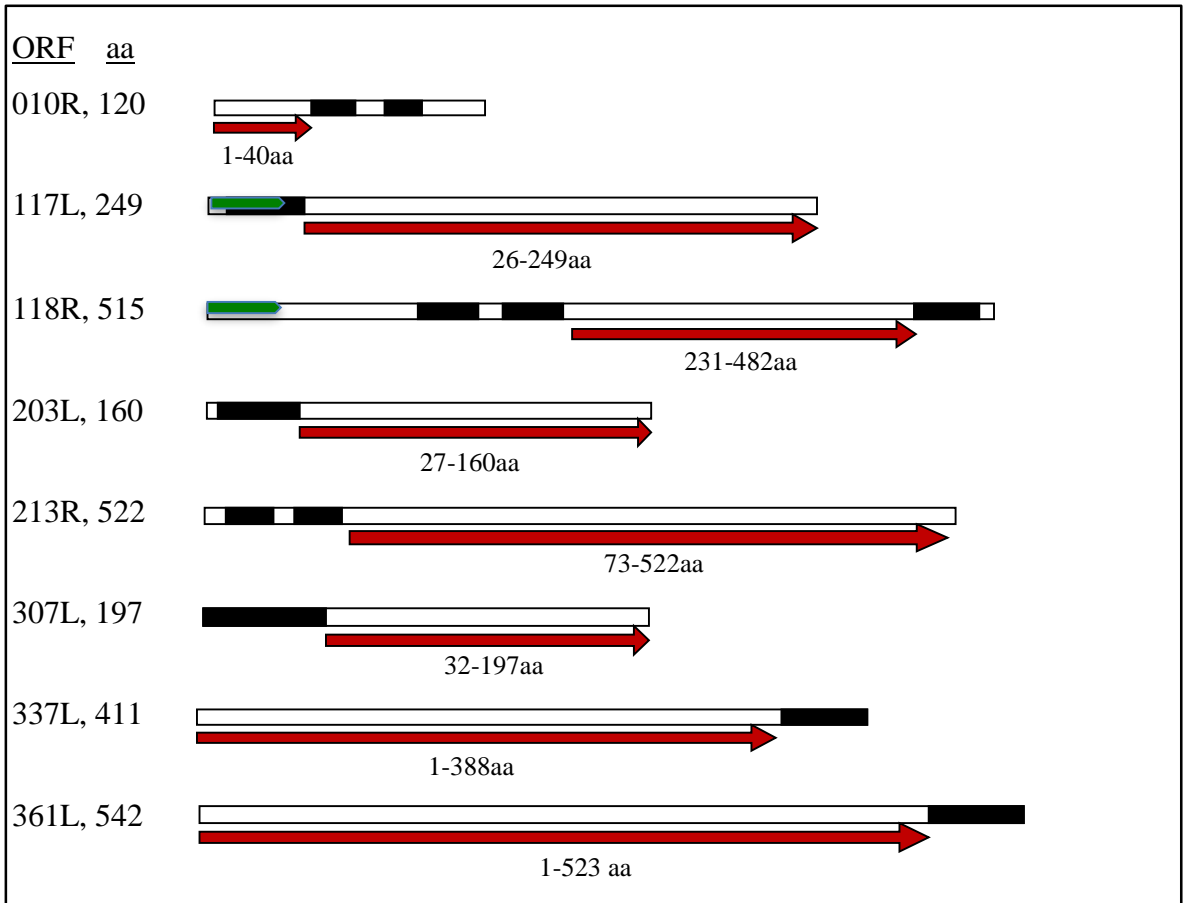
2.14. Protein İnteraktom Haritasının Çizilmesi

Cytoscape moleküler etkileşim ağlarını analiz etmek ve görüntülemek için oluşturulmuş bir yazılımdır (Shannon vd., 2003). <http://www.cytoscape.org/> internet adresinden cytoscape programı indirilebilmektedir. Bu çalışma kapsamında açığa çıkan etkileşimler cytoscape 2.8.2 programı ile analiz edilmiş ve interaktom haritaları çizilmiştir.

3. BULGULAR

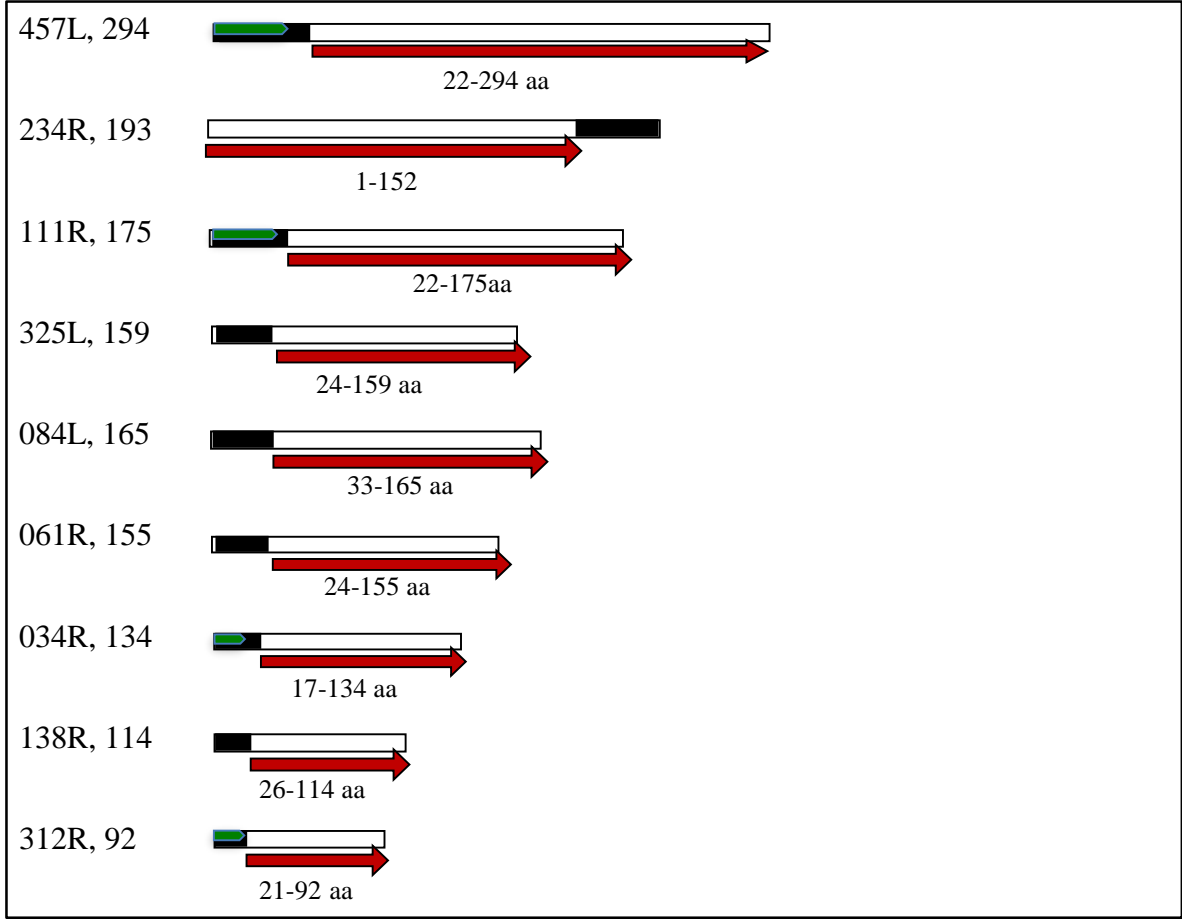
3.1. Primerlerin Tasarımı

Bu çalışma kapsamında CIV'ye ait 50 yapısal genin dizileri Signal IP ve TMHMM yazılımıyla analiz (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) edilerek transmembran domeini ve sinyal peptidi içerip içermedikleri belirlendi. Bu analizler sonucu 17 genin transmembran domeinine sahip olduğu belirlendi. Transmembran domeini içeren genler ve bu domeinler (siyah kutu) Şekil 9'de belirtilmiştir. Transmembran domeinleri ve sinyal dizileri belirlendikten sonra genlerin bu domeinler dışında kalan yerlerini çoğaltmak için uygun primer dizileri oluşturuldu (Tablo 7).



Şekil 9. Transmembran domein içeren genlerin çoğaltılan kısımlarının şematik gösterimi. Kırmızı oklar kısaltılmış ORF'leri, siyah dikdörtgenler transmembran domeinleri ve yeşil beşgenler sinyal peptitleri göstermektedir. ORF: Açık okuma zinciri, aa: tüm ORF'nin sahip olduğu amino asit miktarı. Kırmızı okların altında yazan sayılar çoğaltılan bölgeleri göstermektedir.

Şekil 9'un devamı



Tablo 7. Chilo iridescent virüs yapısal genlerini çoğaltmak için kullanılan primer dizileri*

ORF	Nükleotit çifti	Tm	Av ve Yem vektörler için ileri diziler	Yem vektör için geri diziler	Av vektör için geri diziler
022L	3156	57	GAGGATCCGGGAGTTTAAATTAGA AGATTTTT	GACTGCAGTTTTCTCTTAGTTTGAAC ACCAC	GACTCGAGTTTTCTCTTAGTTTGAACA CCAC
274L	1404	58	GAGGATCCGGTCTATTTCTTCGTCA AATG	GACTGCAG GAGGACAGGAAAACCAAG	GACTCGAGGAGGACAGGAAAACCAA
295L	4032	54	GAGGATCC GGCTTCTTAACGGTAAAAG	GACTGCAGAATTGTTTTTTAAGAG TAAGAT	GACTCGAGAATTGTTTTTTAAGAGTA AGAT
118L	558	57	GAGAATTCCAATGGACTGTGAGAG AAAT	GAGGATCCTGTTATTGTAGATGGTG GAC	GAGGATCCTGTTATTGTAGATGGTGGA C
261R	4086	56	GAGAATTCGCTTCGTTTAAACATTGA AAATC	GACTGCAGAATGACAGATAAGACA GATAC	GACTCGAGAATGACAGATAAGACAGA TAC
337L	1170	54	GAGAATTCATTATTAGAAATTTTCC AAAACAAAC	GACTGCAGGGTAATTAACACATTTT TATTTTCC	GACTCGAGGGTAATTAACACATTTT TTTCC
149L	2001	53	GAGAATTCAAAGAAACCATTTTTG AAATATTTG	GAGGATCCGGCATAAAAATTGATTT TTAACC	GAGGATCCGGCATAAAAATTGATTTTT AACC
179R	3561	51	GAGAATTC ACTTGTTTAGATCCTAAAAC	GAGGATCCTATAACAATATTTTTTATT ACAATAT	GAGGATCCTATAACAATATTTTTTATTA CAATAT
443R	7299	52	GAGAATTCATTTAATTTAAATAA CGCTTT	GAGGATCCATTATCCAATACTTCAA TTCC	GAGGATCCATTATCCAATACTTCAATT CC
117L	675	52	GACATATGAAAAGAATAAAAAAT CAGGTAG	GAGGATCCTTATTCAAATTAACAA TTTCTAC	GAGGATCCTTATTCAAATTAACAATT TCTAC
142R	768	55	GACATATGAAAACAATATTGAAA ATTTTGATC	GAGGATCCCATAAAAGCTTTAAACC TGCTG	GAGGATCCCATAAAAGCTTTAAACCTG TCTG
155L			GACATATGAAAAGAAATTTTCGTC CCAAAC	GAGGATCCGATATATCTTATTAATT GTGTTGC	GAGGATCCGATATATCTTATTAATTGT GTTGC
229L	1332	55	GACATATGAATAAAAATTCTAAAA ATAAAATGG	GAGGATCCCATGTAAGGAAATATAA AGAAG	GAGGATCCCATGTAAGGAAATATAAA GAAG
232R	2016	58	GACATATG AATAACAATCAGTGTATGAG	GAGGATCCAGCTACTCCAATACATT GC	GAGGATCCAGCTACTCCAATACATTGC
309L	654	5	GACATATGGCAAATATTATTTATAT AAACGAC	GAGGATCCAGAAAATAACTGAGCA GGTG	GAGGATCCAGAAAATAACTGAGCAGG TG
355R	549	50	GACATATGAAAATATATTTTTGG ATTTAGAC	GAGGATCCATTTAAATGACGATTTA AAACATC	GAGGATCCATTTAAATGACGATTTAAA ACATC
366R	345	52	GACATATGCCATTATTAAGAAAAC GATC	GAGGATCCATAATTTCTCATCATGA TAAG	GAGGATCCATAATTTCTCATCATGATA AG

Tablo 7'nin devamı

374R	498	55	GACATATGGATATAGAATTTGGAA ATGAATA	GAGGATCCTTCATATTCTTCATCTCC ATATTC	GAGGATCCTTCATATTCTTCATCTCCAT ATTC
378R	582	55	GACATATGACATCGAAATGTAGTA AATGGC	GAGGATCCTCTAGGTAAATATGCTT TATACC	GAGGATCCTCTAGGTAAATATGCTTTA TACC
380R	1587	52	GACATATGAACTTTGATAAAGAAA AATGTG	GAGGATCCAGGTACTTTATAAGTTT CC	GAGGATCC AGGTACTTTATAAGTTTCC
396L	3174	54	GACATATGTTCAAGTTTAATATTGA CAATCC	GAGGATCCATAAGTAACATAATCTG CAACTC	GAGGATCCATAAGTAACATAATCTGCA ACTC
401R	732	52	GACATATGAAAAGTAAAAAAGAA CTTATGG	GAGGATCCAACCTTTAATTTCTTTATT TTTTTAC	GAGGATCCAACCTTTAATTTCTTTATTT TTTTAC
415R	729	55	GACATATGTCAGGAGGTTATACTT CTTTG	GAGGATCCATAATCTCCCATCATT TATATC	GAGGATCCATAATCTCCCATCATTCTA TATC
439L	1614	55	GACATATG GCCGAGTGTTTAAGTAAAA	GAGGATCCTTTTAATCTCTGACAGC GATC	GAGGATCCTTTTAATCTCTGACAGCGA TC
453L	417	52	GACATATGTATCAACAAAAATATT TTGAAAAAC	GAGGATCCACCCATTACATAATTA CAATG	GAGGATCCACCCATTACATAATTAACA ATG
010R	120	50	GACATATGAATAATTTTAATTACTT TAATGG	GAGGATCCAAAATCTTCTTTTATAA CTATATC	GAGGATCCAAAATCTTCTTTTATAACT ATATC
203L	402	55	GACATATGCCATATCATAATTTTAT GAAGC	GAGGATCCCTATAAAATTTTATCATT TAAACATT	GAGGATCC CTATAAAATTTTATCATTTAAACATT
209R	3141	55	GACATATG GATTCTCTTAAAGCAAGTTC	GAGGATCCAGAAATATATAAACTTA AACCTA	GAGGATCCAGAAATATATAAACTTAA ACCTA
213R	1350	55	GACATATG AAACCTTCTACAGTAGAAG	GAGGATCCAAATTGGCCAGTTCCTC CT	GAGGATCC AAATTGGCCAGTTCCTCCT
268L	2133	56	GACATATGAAACAAAGACAAGCAC GTTTAA	GAGGATCCCCATTTTTTATTTTCAAA ACATTC	GAGGATCCCCATTTTTTATTTTCAAAA CATT
307L	501	55	GACATATG GGTATAAAGGGATCTTGGAG	GAGGATCCTTGTAATGAATTTAAAT AACCAAG	GAGGATCCTTGTAATGAATTTAAATAA CCAAG
329R	1137	55	GACATATGATTTTCAATTTCAAGCAT AACAG	GAGGATCCATAATTAATTTTAAACAC CTTCG	GAGGATCCATAATTAATTTTAAACACCT TCG
342R	267	58	GACATATG GATAAACCTCGCGAACG	GAGGATCCCAAACATGCACTTCTAA CG	GAGGATCCCAAACATGCACTTCTAACG
361L	1572	54	GACATATG ACCTCGATTATTAATCAACG	GAGGATCCATACCAATTATTGGTTT TAG	GAGGATCCATACCAATTATTGGTTT G
198R	1419	53	GACATATGAATACCTTTCCAAAAC TAAATAC	GAGAATTCTGCATATTTACTATTACT AACTTT	GAGAATTCTGCATATTTACTATTACTA ACTTT

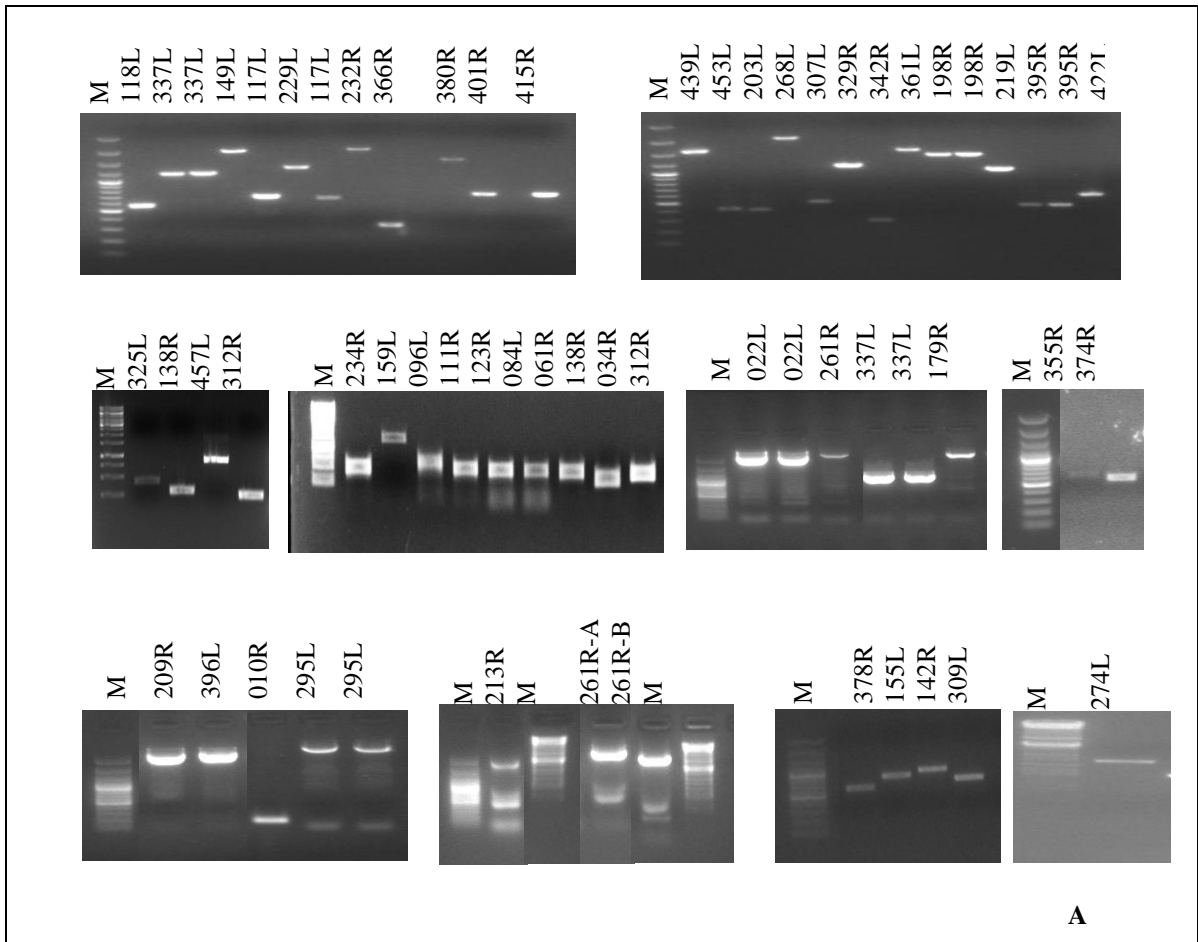
Tablo 7'nin devamı

219L	1032	55	GACATATGTCACTTCCGGTTAATTT TAAAA	GAGAATTCTCCTTGTCTTATAACCAT AAC	GAGAATTCTCCTTGTCTTATAACCATA AC
395R	456	55	GACATATG TCAGGATCTGGATATGCAGC	GAGAATTCAAAATTCATATTAATTT GTAAGGG	GAGAATTCAAAATTCATATTAATTTGT AAGGG
422L	597	54	GACATATG TCTGCAATTTTTAAAAATC	GAGAATTC AAAAATAATAACCGGTGC	GAGAATTC AAAAATAATAACCGGTGC
034R	333	60	CGGAATTCGAAAAGAAAAAGAA GTACCTCTTCCCCACC	CGGGATCCTTACCAATGACCATCTC CTCCCACTCCTCC	CGGGATCCTTACCAATGACCATCTCCT CCCCTCCTCC
061R	393	60	CGGAATTCAAAATAAAAAAGGTAA AAACAGGAAATTATGG	CGGGATCCTTATTGTGTTTTAGATA GTTGATATTTTAATGC	CGGGATCCTTATTGTGTTTTAGATAGT TGATATTTTAATGC
084L	396	60	GGAATTCATATGAGGAGGTCCAA CTTCTCCTCCTGGAAGAGGTACA	CGGGATCCTTAATTTTAATGGCAA AGTCATTAATAATTTAATTG	CGGGATCCTTAATTTTAATGGCAAAG TCATTAATAATTTAATTG
096L	525	60	CGGAATTCATGACTTCAAGCTTAC CAGAATCAATAGATGG	CGGGATCCTTAATCAAAGCATAAA CTTCTTCCATTAATG	CGGGATCCTTAATCAAAGCATAAACT TCTTCCATTAATG
111R	459	60	GGAATTCATATGCAAAAAATCA GGAATTATCCACATTATCT	CGGGATCCTTATAATTTATAAGCAT CATCAATTCCAATTGG	CGGGATCCTTATAATTTATAAGCATCA TCAATTCCAATTGG
123R	429	60	CGGAATTCATGGAACCTACGAAA TAGTAGAAAATTTATATTTAG	CGGGATCCTTAAAAATAACTATTGG TACTGTTAACCATCG	CGGGATCCTTAAAAATAACTATTGGTA CTGTTAACCATCG
138R	264	60	CGGAATTCAAAATGGTAAAACAA GTTTCGTCATACCC	CGGGATCCTTATCGTCCACTTCTAG CTTTTGCATCATTCAATTG	CGGGATCCTTATCGTCCACTTCTAGCT TTTGCATCATTCAATTG
159L	1428	60	CGGAATTCATGGAAACAGAAACAA ATTTTAAAATTTACAATCC	CGGGATCCTTAATTACCCTGTAATCT TTCTATAGTAATGAAAG	CGGGATCCTTAATTACCCTGTAATCTT TCTATAGTAATGAAAG
234R	456	60	CGGAATTCATGAATCGTTTCAGATA AAATTACCCTTGATC	CGGGATCCCAATCTTTATACCATT GAGTTGTATCATCCGTAGG	CGGGATCCCAATCTTTATACCATTGA GTTGTATCATCCGTAGG
312R	213	60	CGGAATTCAAAGCTAAAAAACTAG ATGGATTGTTAATTTTG	CGGGATCCTTAACGCCTCCATCTAC CCCAATTATAACGACG	CGGGATCCTTAACGCCTCCATCTACCC CAATTATAACGACG
325L	405	60	CGGAATTCAAACCACATGTTGTTTT AACACCATTAGAATAC	CGGGATCCTTAATAATATGTAACAT TTGTTTTATTGTTTGAATAC	CGGGATCCTTAATAATATGTAACATTT GTTTTATTGTTTGAATAC
457L	816	60	CGGAATTCACCAAAAAATAATAAA ACACTACTTCATCATATGAG	CGGGATCCTTACATATTTGAAGTTC CTAATAATGGTATAGG	CGGGATCCTTACATATTTGAAGTTCCT ATAATGGTATAGG

* Primerlere eklenen kesim bölgeleri koyu renkli yazılmıştır. *Bam*HI: GGATCC; *Eco*RI: GAATTC; *Nde*I: CATATG; *Pst*I: CTGCAG; *Xho*I: CTCGAG

3.2. Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

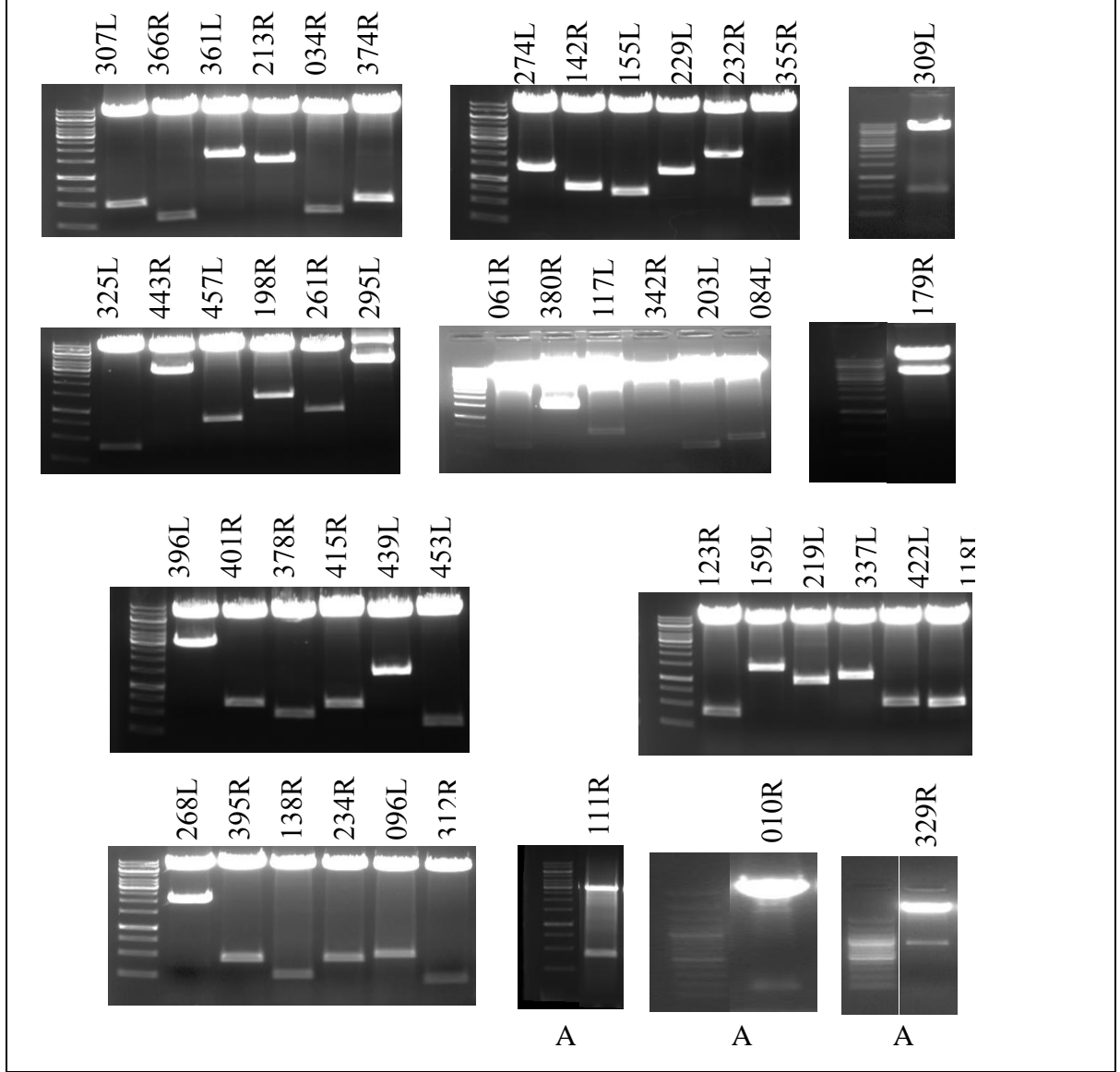
CIV'e ait 50 genin Tablo 7'de belirtilen primerler ve doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimi kullanılarak kodlama bölgeleri çoğaltıldı (Şekil 10). Çoğaltılan genler jelden temizlenerek pJET1.2 ara vektörüne klonlandılar. 50 genden 47 tanesinin klonlaması yapılabildi. Oluşturulan klonlar 1'den 47'ye kadar isimlendirildi.



Şekil 10. Chilo iridescent virüs yapısal genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan zincirlerinin agaroz jel görüntüleri. Genlerin isimleri, resimlerin üstünde gösterilmektedir. M harfi markırları göstermektedir. A ile işaretli şekilde kullanılan markır, lamda fajın *HindIII* ve *EcoRI* ile kesilmesi sonucu elde edilen markırdır. İşaretsiz şekillerde kullanılan markırlar 100 bp'lik markırdır (Fermentas). En alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir.

3.3. Genlerin *Yem* Vektörlerine Klonlanmaları

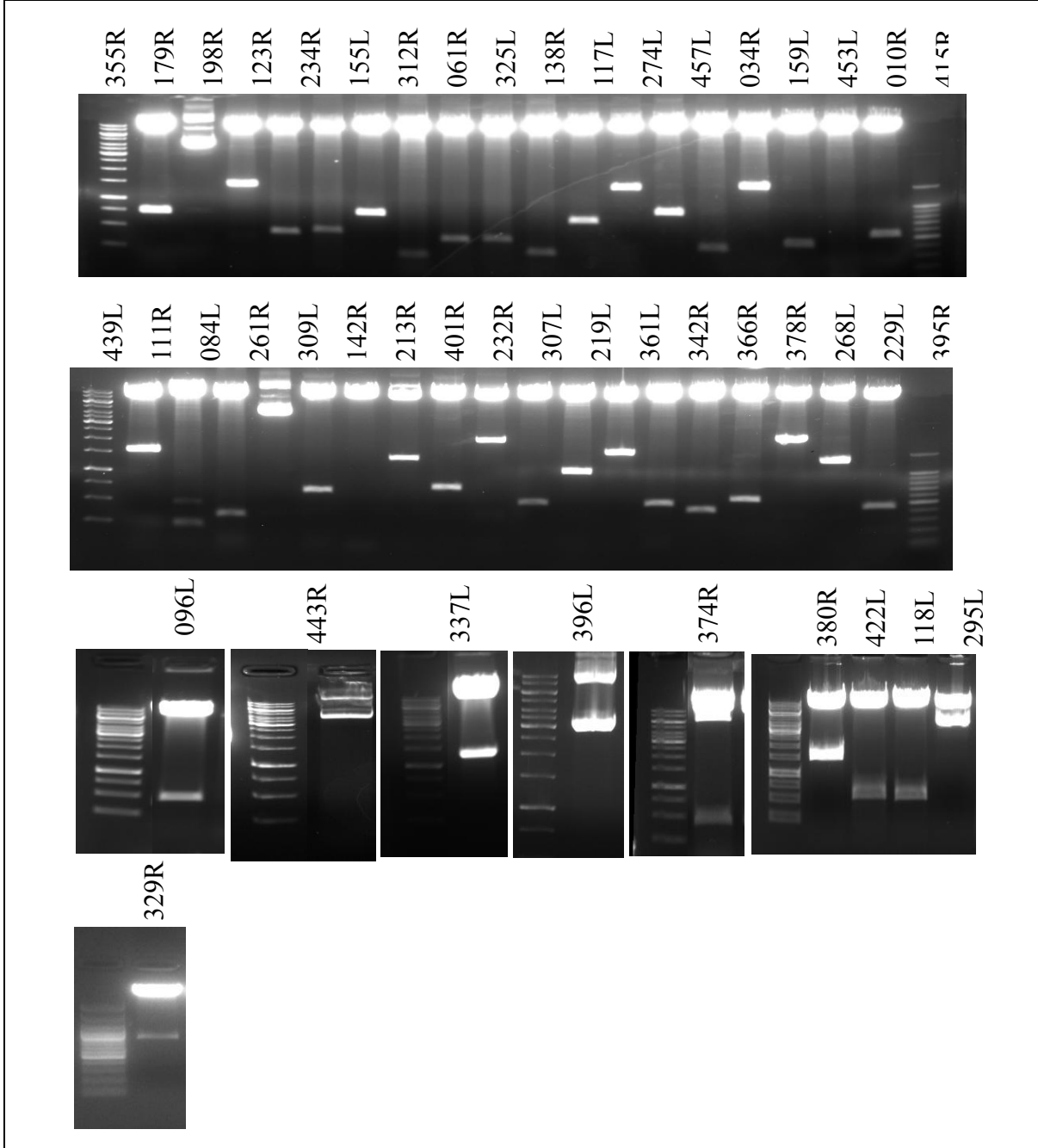
pJET1.2 ara vektöründe bulunan 47 yapısal gen uygun kesim bölgeleri kullanılarak pGBK-T7 vektörüne klonlandı (Şekil 11).



Şekil 11. Genlerin *yem* vektöre klonlanması. Genlerin isimleri resimlerin üstünde gösterilmektedir. M harfi markırı göstermektedir. A ile işaretli şekilde kullanılan markır 100 bp'lik markırdır (Fermentas). En alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir. İşaretsiz şekillerde kullanılan markır 1000 bp'lik markırdır (Fermentas). En alttan sırası ile bantların büyüklükleri 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000 bp'dir.

3.4. Genlerin *Av* vektörlerine Klonlanmaları

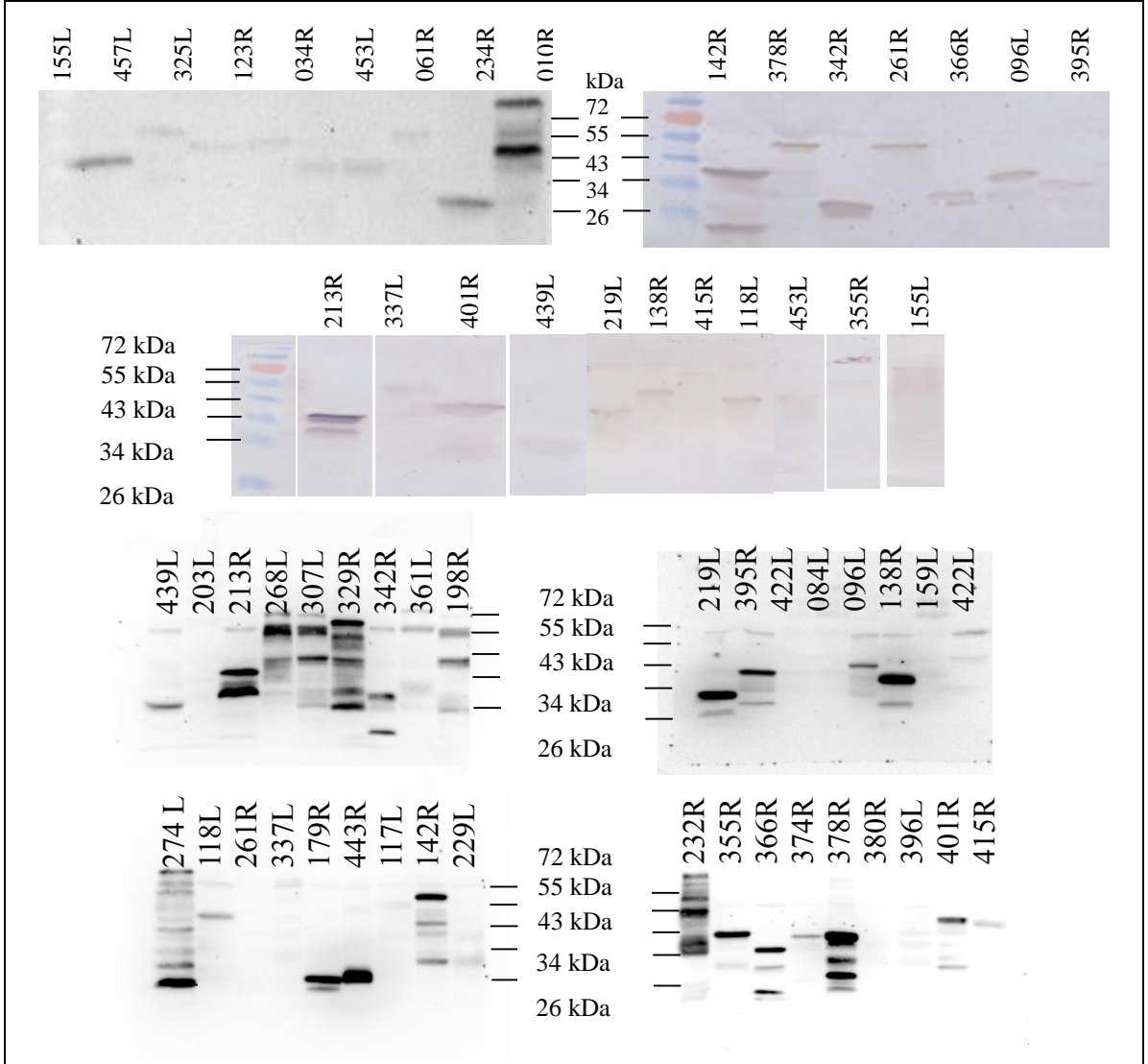
pJET1.2 ara vektöründe bulunan 47 yapısal gen uygun kesim bölgeleri kullanılarak pGAD-T7 vektörüne klonlandı (Şekil 12).



Şekil 12. Genlerin *av* vektörlere klonlanması. Genlerin isimleri resimlerin üstünde gösterilmektedir. M harfi 1000 bp'lik markırdır (Fermentas). En alttan sırası ile bantların büyüklükleri 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000 bp'dir.

3.5. Yem Vektörlerine Klonlanan Yapısal Genlerin Maya Hücrelerinde İfade Edilmeleri

pGBK-T7 vektörü *yem* genlerin klonlandığı vektördür. *ADHI* promotörü altında ifade edilen genler, DNA bağlanma domeini ve c-Myc kuyruğu ile füzyon olacak şekilde ifade edilirler. CIV'ye ait 47 yapısal gen öncelikle *yem* vektöre ayrı ayrı klonlandı. AH109 maya suşuna transformasyonları sağlandı. Her bir yapısal geni içeren maya hücresinden protein örnekleri hazırlandı. c-Myc Antikoru ile western blot hibridizasyon analizi yapıldı. 47 genin maya hücrelerinde ifade edildikleri tespit edildi (Şekil 13).



Şekil 13. Maya hücrelerinde ifade edilen *yem* proteinlerinin Western blot hibridizasyon analizi. Genlerin isimleri resimlerin üstünde gösterilmektedir. Markırın büyüklükleri şekillerin yanında gösterilmiştir.

Genlerin *yem* ve *av* vektörlere klonlanmalarının ardından *av* ve *yem* vektörleri içeren hücrelerin -80 °C'de muhafaza edilmek üzere gliserol stokları yapıldı. Genlerin maya hücrelerinde ifade edildiklerinin doğrulanmasından sonra maya-iki-hibrit sistemi ile proteinler arasındaki etkileşimler araştırılmaya çalışıldı.

3.6. Maya-İki-Hibrit Sistemi

Yapısal proteinleri ifade ettiği tespit edilen maya hücrelerinden kompetent hücreler hazırlandı. Her bir yapısal proteini içeren kompetent maya hücresine hazırlanan 47 *av* vektör 5 grup halinde (9+9+9+10+10) transform edildi. Pozitif etkileşimler iki marker gen açısından (adenin ve histidin) belirlendi. Transformasyonda kullanılan adenin, histidin, lösin, triptofan içermeyen seçici besiyerinde büyüyen koloniler pozitif etkileşimleri göstermektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Etkileşim oluşturan maya kolonileri. Pozitif etkileşim gösteren maya hücrelerinin adenin, histidin, lösin ve triptofan amino asitlerini içermeyen seçici besiyeri üzerinde oluşturduğu koloniler, her bir etkileşim için ayrı ayrı tespit edildi. Burada sadece bir örnek gösterilmiştir.

Bu transformasyonlardan pozitif etkileşimlerin olduğu tespit edilen gruplar, yani seçici besiyerinde büyümenin olduğu gruplar daha küçük üçerli gruplara ayrılarak yeniden transformasyonları yapıldı. Benzer şekilde üçerli transformasyonlarda da pozitif çıkan gruplardaki her bir *av* vektör teker teker transform edilerek hangi genin hangi gen ile

etkileşime girdiği böylece tespit edildi (Tablo 8). Çıkan pozitif etkileşimlerin transformasyonları ikişer kere tekrarlandı.

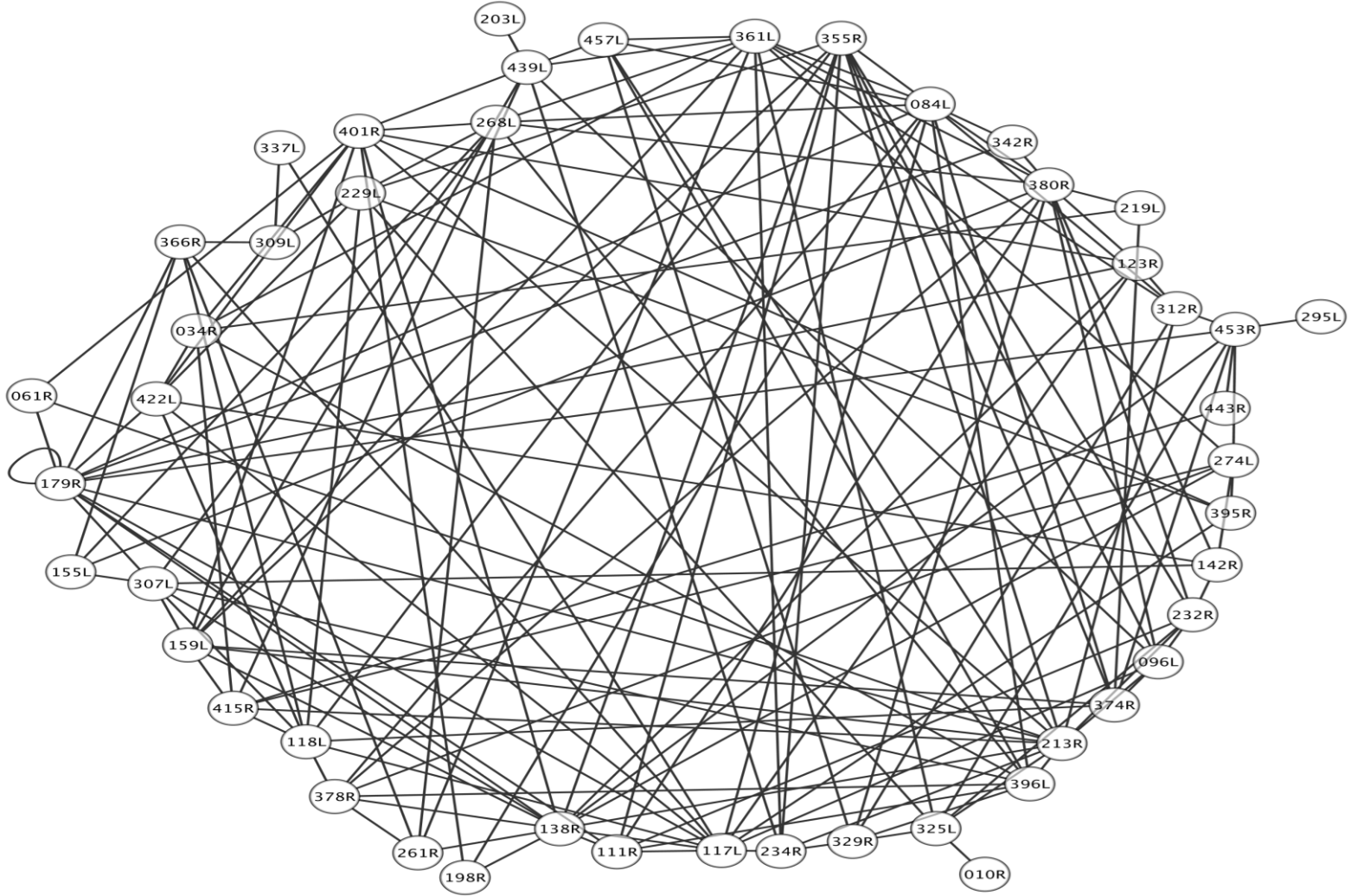
Tablo 8. Maya-iki-hibrit sistemi ile Chilo iridescent virüs yapısal proteinleri arasında belirlenen protein etkileşimleri

Yem	Av	Yem	Av	Yem	Av	Yem	Av	Yem	Av					
034R	219L	213R	396L	355R	084L	395R	117L	453R	374R					
	361L		061R		096L		229L		138R					
	396L		096L		111R		274L		179R					
	415R		138R		138R		401R		274L					
	401R		179R		232R		111R		295L					
	422L		159L		159L		034R		312R					
084L	117L	232R	234R	361L	396L	401R	213R	457L	325L					
	179R		312R				234R		268L	361L				
	198R		415R				374R		307L	084R				
	268L		457L				229L		329R	396L				
	312R		232R				034R		084L	439L				
	342R		355R				084L		378R	329R				
	355R		401R				084L		457L	213R				
	361L		325L				034R		034R	453R				
	378R		096L				159L		061R	337L				
	380R		111R				234R		123R	415R				
096L	396L	219L	142R	366R	415R	457L	159L	329R	453R					
	374L		380R				261R		198R	396L				
	457L		213R				274L		213R	380R				
	117L		325L				312R		268L	234R				
	213R		355R				325L		395R	312R				
	232R		034R				380R		439L	325L				
111R	355R	229L	374R	374R	415R	422L	439L	312R	457L					
	374R		380R				457L		138R	084L				
	380R		395R				118L		118L	213R				
	439L		422L				117L		439L	361L				
	117L		325L				155L		443R	123R				
	138R		309L				179R		274L	142R				
111R	179R	229L	355R	374R	415R	034R	213R	142R	329R					
	232R		118L				309L		034R	453R				
	355R		268L				084L		159L	307L				
	380R		329R				355R		034R	380R				
	117L		234R				329R		374R	415R	422L	034R	142R	380R
	138R													

Tablo 8'in devamı

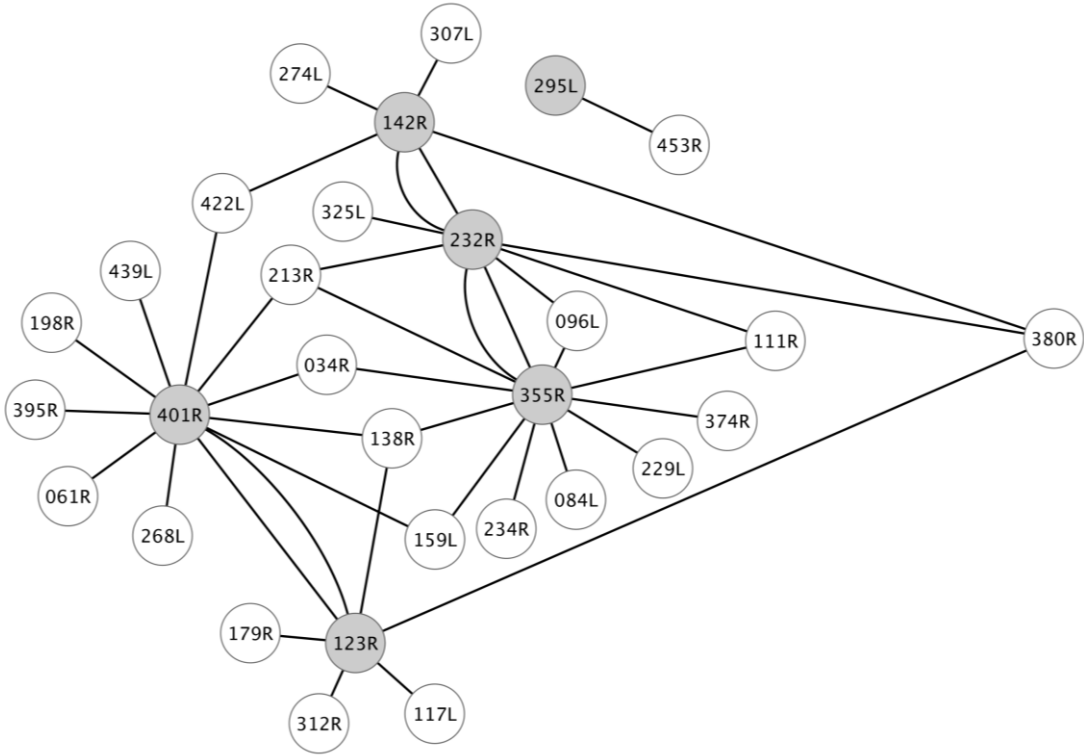
	396L		213R		219L		401R		422L	
118L	117L	268L	117L	378R	118L	439L	117L	380R	232R	
	229L		355R		096L		118L		274L	
	355R		361L		159L		142R		378R	
	366R		439L		453R		179R		361L	
	374R		155L		138R		229L		219L	
	307L		229L		274L		096L		084L	
	415R		261R		118L		361L		111R	
	422L		307L		084L		234R		123R	
	378R		084L		138R		457L		142R	
123R	138R	274L	229L	325L	261R	261R	159L	179R	155L	
	179R		380R		274L		203L		232R	
	312R		401R		380R		234R		268L	
	380R		361L		396L		401R		329R	
	401R		396L		329R		415R		342R	
	117L		415R		453R		378R		096L	
138R	179R	274L	453R	117L	361L	159L	268L	342R	084L	
	213R		142R		232R		361L		366R	
	261R		138R		010R		366R		422L	
	274L		378R		213R		138R		453R	
	307L		361L		229L		355R		061R	
	355R	395R	395R	213R	111R					
	378R	307L	268L	117L	084L	309L	361L		179R	117L
	453R		396L		096L		401R			123R
	111R		118L		111R		415R			138R
	117L		138R		366R		374R			179R
	123R		142R		118L		439L			213R
159L	155L		234R		307L		342R			
198R	159L	422L	138R	307L						
401R	179R	123R	123R	337L	309L	337L	342R	084L		
366R	061R	213R	138R	366R		366R		380R		
368L		179R	337L	229L		179R				
380R		401R	179R	309L	401R					
155L	307L	198R	084L	010R	325L	337L	117L			
	203L		439L	138R				295L		

Çıkan bu etkileşimleri analiz edebilmek amacı ile cytoscape programı kullanılarak interaktom şeması çizildi (Şekil 15). Virüse ait yapısal proteinlerden 47 protein arasında muhtemel 2209 (47 x 47) etkileşim maya-iki-hibrit sistemi ile test edildi ve 163 protein etkileşimi olduğu belirlendi. Bu etkileşimlerden sadece 179R proteinin homodimer oluşturduğu görüldü.



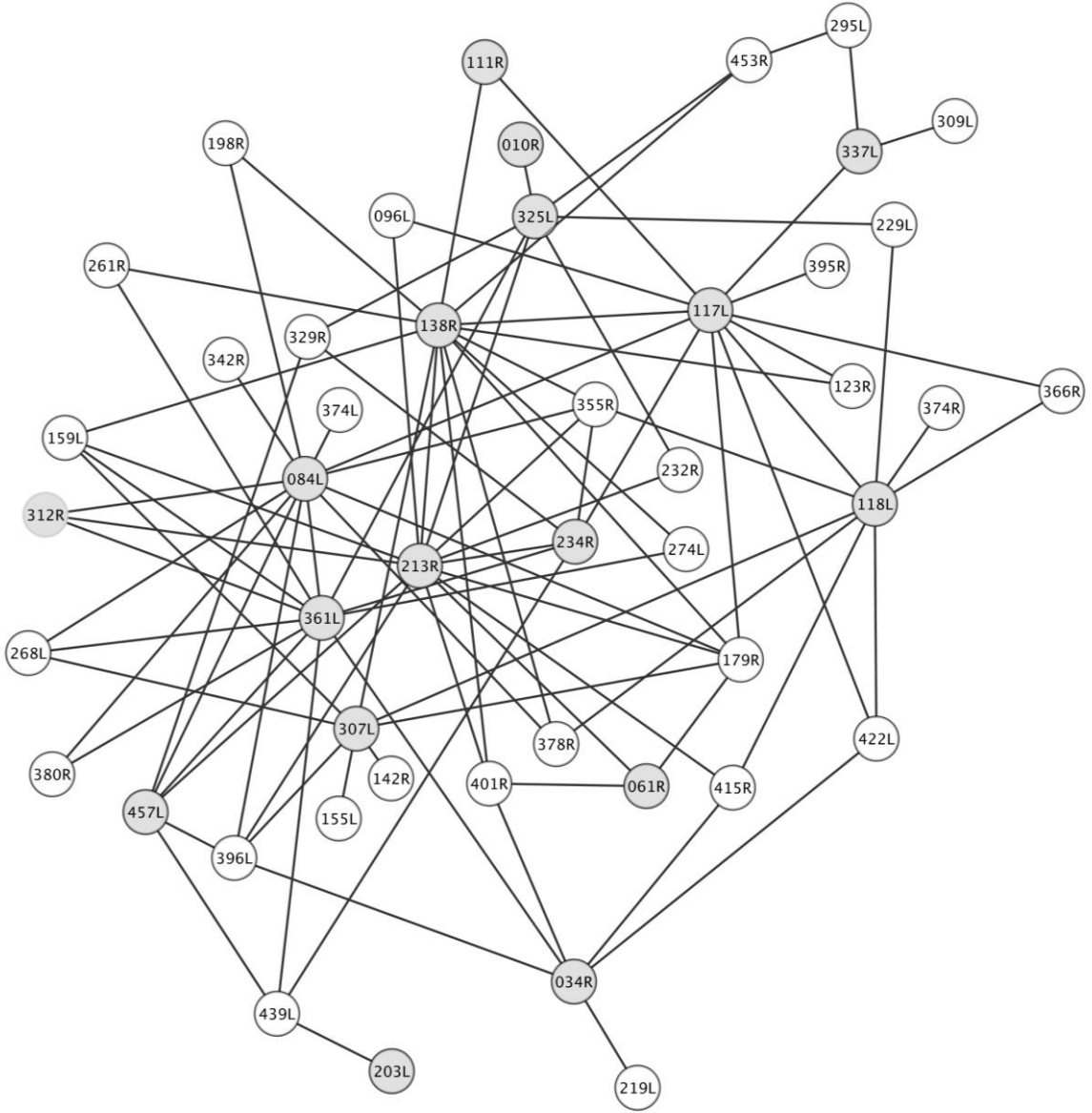
Şekil 15. Chilo iridescent virüs yapısal proteinleri arasındaki etkileşimlerin şematik görünümü. Protein arasındaki 163 etkileşim cytoscape programı kullanılarak çizildi. Yuvarlaklar proteinleri, çizgiler etkileşimleri göstermektedir.

DNA replikasyonu ve virüs transkripsiyonunda rol oynayan muhtemel yapısal proteinler arasında gerçekleşen protein etkileşimleri cytoscape programı kullanılarak çizildi (Şekil 16). Virüs DNA polimerazlarının N-terminal domeinini taşıyan 232R'nin muhtemel bir RNaz olan 142R ve fosfataz olan 355R ile etkileştiği belirlendi. HMG-box domeinine sahip 401R ile fosfataz domeinine sahip olan 123R birbiri ile etkileşmektedir. Nükleer lokalizasyon sinyali taşıyan 295L'nin ise diğer DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda rol oynayabilecek proteinlerle etkileşmediği belirlendi.



Şekil 16. DNA replikasyonu ve virüs transkripsiyonunda rol oynayan muhtemel yapısal proteinler arasındaki etkileşimler. Koyu renkli olan yuvarlaklar DNA replikasyonu ve virüs transkripsiyonunda rol oynayan muhtemel yapısal proteinleri göstermektedir.

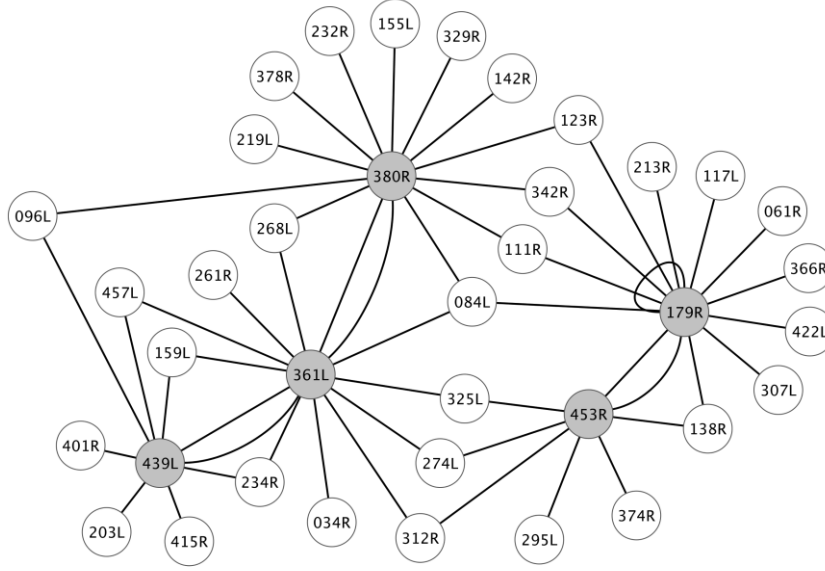
Çalışmada kullanılan 47 proteinden 17 tanesi transmembran domein içermektedir. Bunlar 010R, 117L, 118R, 203L, 213R, 307L, 337L, 361L, 457L, 234R, 111R, 325L, 084L, 061R, 034R, 138R, 312R proteinleridir. Transmembran içeren bu 17 protein çalışmada kullanılan transmembran domein içermeyen diğer 30 proteini de birbirlerine bağlamakta ve 17 transmembran proteinin birbirleri ile ve diğer 30 yapısal protein ile aralarında toplam 97 protein etkileşimi görülmektedir (Şekil 17).



Şekil 17. İntegral membran proteinler arasındaki protein etkileşimleri. Koyu renkli olan yuvarlaklar integral membran proteinlerini göstermektedir.

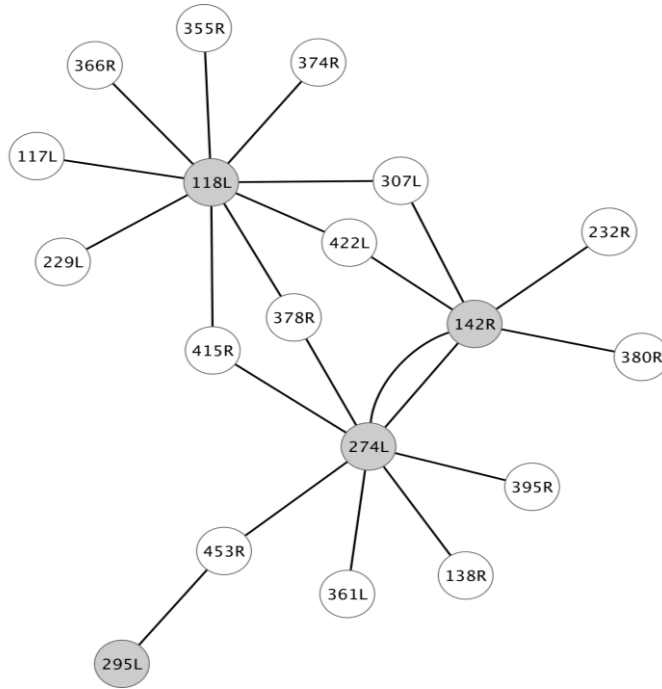
Proteinlerin işlenmesi ve modifikasyonu sürecinde rol oynayan proteinlerden serin/treonin kinaz domeini taşıyan 380R ile bir integral membran proteini ve peptidaz domeinine sahip olan 361L arasında; 361L ile protein kinaz domeinine sahip 439L arasında protein etkileşimi tespit edilmiştir. Çalışmada tirozin protein kinaz domeine sahip olan 179R'nin homodimer oluşturduğu tespit edildi. Aynı zamanda 179R proteininin, protein disülfit izomeraze domeinine sahip 453R ile etkileştiği tespit edildi. 378R proteini

2-sistein adaptör domeinine sahiptir. 378R'nin protein kinaz domeinine sahip olan 380R ile etkileştiği tespit edilmiştir. 453R ile 179R'nin birbiri ile etkileşimleri belirlendi (Şekil 18).



Şekil 18. Proteinlerin olgunlaşması ve modifikasyonu aşamasında rol oynaması muhtemel yapısal proteinler arasındaki etkileşimler. Koyu renkli olan yuvarlaklar proteinlerin olgunlaşması ve modifikasyonu aşamasında rol oynaması muhtemel yapısal proteinleri göstermektedir.

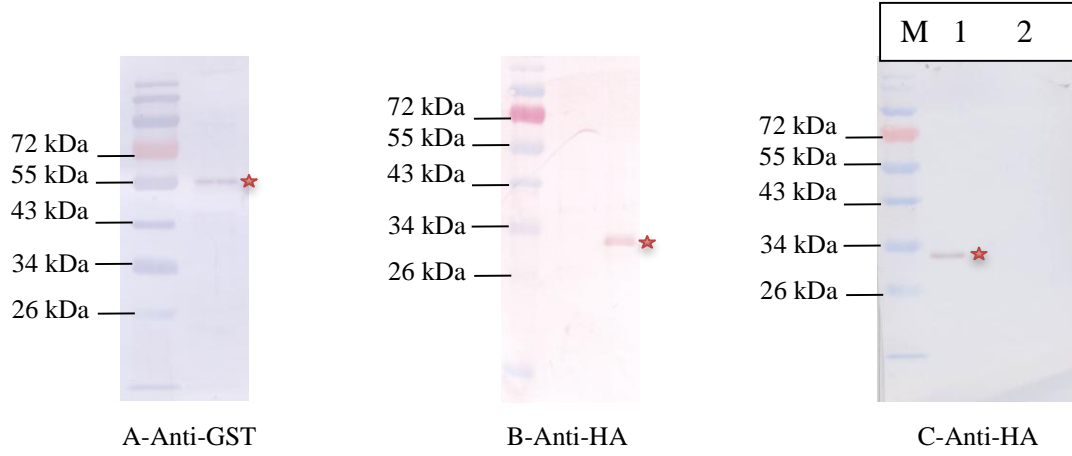
Çalışmada kullanılan yapısal proteinlerden dört tanesinin günümüze kadar DNA dizi analizi yapılmış bütün iridovirid ve ascovirüslerde homoloğu vardır. Bu sebeple bu proteinlere öz proteinler denilmektedir. Dört öz proteininin (118L, 142R, 274L, 295L) birbirleriyle etkileşimine bakıldığı zaman zarfta bulunan 118L proteininin kapsidin yapısını oluşturan 274L (MCP) ve 142R (bu çalışmadaki sonuçlara göre muhtemel tutunma proteini)'ye ikişer farklı proteinle bağlandığı görünmektedir. 295L proteini bu etkileşime thioredoxin domeinine sahip 453R proteini ile MCP'ye bağlanarak dahil olmaktadır (Şekil 19).



Şekil 19. Öz proteinler arasındaki protein etkileşimleri. Koyu renkli olan yuvarlaklar öz proteinleri göstermektedir.

3.7. Pull-Down Analizi

Tespit edilen bu etkileşimlerden biri seçilerek (118L ve 415R) pull-down analizi çalışmalarına başlandı. 118L pGEX-2T vektöründe GST kuyruk ile ifade edilirken 415R geni pET28a vektöründe primere ilave edilen HA kuyruk ile birlikte ifade edildi. Proteinlerin ifadesinden sonra bakteri hücrelerinde çokça üretilen proteinlerin çözülebilir kısımları birbirine karıştırıldı ve GST kuyruk kullanılarak protein saflaştırma işlemi yapıldı. GST kuyruk ile saflaştırılan protein SDS-PAGE’de ayrıldı ve HA kuyruğa özgü antikolar kullanılarak Western blot hibridizasyon analizi yapıldı. Sonuçta GST kuyruk ile saflaştırılan 118L ile birlikte HA-kuyruk ile ifade edilen 415R’nin de saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 20).



Şekil 20. 118L ve 415R'nin GST-pull down analizi. A: GST-kuyruk ile birlikte ifade edilen 118L proteini Western blot hibridizasyon analizi; B: HA-kuyruk ile birlikte ifade edilen 415R proteini western blot hibridizasyon analizi; C: GST-pull down analizi 1: 415R-118L 2: 415R-GST Western blot hibridizasyon analizi; M: Markır , markırın bantları şeklin yanında gösterilmiştir. GST: 26 kDa; 118L+GST: 54 kDa; 415R+HA kuyruk: 28 kDa.

4. TARTIŞMA

Chilo iridescent virus (CIV)'ün çeşitli zararlı böcekler üzerinde patojenite oluşturması ve yapısal proteinlerinin insektisidal aktiviteye sahip olması sebebi ile biyopestisit olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (Bilimoria, 2001; Bilimoria, 2009; D'Costa vd., 2012). Sahip olduğu virion morfolojisi ve özellikleri sebebi ile biyoteknolojide kullanılma potansiyeli vardır (Williams ve Ward, 2010). CIV nükleositoloplazmik büyük DNA virüslerinin (NCLDV) enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır (Yan vd., 2009; Bronkhorst vd., 2012; Bronkhorst vd., 2014). Bunlarla birlikte CIV'nin gen ifade ve terapi vektörü olarak geliştirilme potansiyeli bulunmaktadır.

CIV virionları oldukça ilginç bir yapı gösterir. İkozahedral simetrik olan virionlar, en içte DNA-protein özünü çevreleyen bir lipid tabaka, onu çevreleyen bir protein örtü (kapsid) ve her virionda olmamakla birlikte en dışta lipid bir zarf'tan oluşmaktadır (Jankovich vd., 2012). CIV genomunun dizin analizi gerçekleştirilmiştir ve 212,482 baz çifti büyüklüğünde olduğu tespit edilmiştir (Jakob vd., 2001). Genomda 211 tane açık okuma zinciri (ORF) olabileceği bioinformatik analizle belirlenmiştir (Eaton vd., 2007). Bu 211 ORF'den 2 veya daha fazla peptide göre 46, tek peptide göre ise 54 tanesi virüs yapısal proteini olarak tanımlanmıştır ve bunlardan 36 tanesinin diğer iridovirüs ve askovirüslerle homoloji gösterdiği belirlenmiştir (İnce vd., 2010).

CIV virion proteinlerinin insektisidal aktivite gösterdiği, konak makromoleküler sentezini durdurduğu, apoptosizi uyardığı ve en erken genlerin transaktivasyonunu sağladığı bilinmektedir; fakat hangi genlerin bu fonksiyonları yerine getirdiği bilinmemektedir. MS-LC analizi ile tespit edilen virüs yapısal proteinlerinden 274L'nin majör kapsid proteinini kodladığı ve 118L'nin diğer virüslerdeki homologları ile yapılan çalışmalara dayalı bilgiler mevcuttur. Bunun haricinde yapısal proteinleri kodlayan genlerin fonksiyonları bilinmemektedir. MS-LC analizi ile virüs yapısal proteinlerinin tespit edildiği yukarıda bahsedilen 54 adet virion proteininden biri olmayan iridoptin olarak adlandırılan 389L geninin bir virion proteini olduğu, aktif bir serin-treonin protein kinaz kodladığı ve apoptosizi uyardığı tespit edilmiştir (Bilimoria, 2009; Chitnis vd., 2011). MS-LC analizi ile tespit edilen 380R, 179R ve 439L yapısal proteinleri protein kinaz domainine sahip olduğundan bu yapısal proteinlerin de iridoptin gibi insektisidal

etkilerinin olduğu düşünölmektedir. Bu fonksiyonlarının ortaya çıkarılması, etkileşime girdikleri birçok fonksiyonu bilinmeyen proteinin de fonksiyonunun aydınlatılmasını sağlamada yardımcı olacaktır.

Bu doktora çalışmasında öncelikle iridovirüs ve askovirüslerde homolog olan 36 gen arasındaki protein etkileşimlerini aydınlatmak amaçlandı. Daha sonra iki veya daha fazla peptid varlığına göre belirlenen 46 yapısal protein arasındaki etkileşimlerin test edilmesine karar verildi. Homolog olan proteinlerle 46 yapısal protein birleştirildiğinde 50 proteine ulaşıldı. Böylece, bu doktora tezi süresince CIV'ne ait 50 yapısal protein arasındaki etkileşimler aydınlatılmaya çalışıldı. Bu 50 proteinden üç tanesini klonlamada büyük sıkıntılar yaşandı. Bu sıkıntıların muhtemelen şu sebeplerden kaynaklanabildikleri düşünölmektedir: i) genin içinde bulunan ters (inverted) tekrarlar fırtke (hairpin) yapıları oluşturacağından klonlamaya engel oluşturuyor olabilir, ii) vektörde genle benzer diziler olabilir. Böyle bir durumda rekombinasyon olacağından klonlama olmaz, iii) gen toksik olabilir. Az da olsa gen ifadesi gerçekleşiyorsa hücreler etkilenecektir. Birinci durum açısından bakıldığında genler içinde ters tekrarlara rastlanmadı, buna rağmen ligasyonda vektör ve insertler ısıtıldı. İkinci durumda vektör ve insertte benzer dizilere rastlanmadı, buna rağmen vektör değiştirilerek klonlama denendi. Ancak, yine de üç genin klonlaması yapılamadı. Bu sebeple doktora tez kapsamında yürütölen bu çalışmaya 47 yapısal proteinle devam edildi. Virüse ait yapısal proteinlerden 47 protein arasında muhtemel 2209 (47 x 47) potansiyel etkileşim maya-iki-hibrit sistemi ile test edildi ve 163 protein etkileşimi belirlendi. Bu etkileşimlerin hepsi literatürde ilk defa tanımlanmış muhtemel etkileşimlerdir. 47 proteinin hepsinin protein etkileşimine katılarak büyük bir aę oluşturduğu, bununla birlikte sadece 179R proteinin kendisi ile de etkileştiği belirlendi.

Protein etkileşimlerini tespit etmede kullanılan yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları olduğu için, protein etkileşimleri birden fazla yöntemle çalışılır. Maya-iki-hibrit sistemi ile etkileştikleri belirlenen proteinlerin etkileşimleri genellikle pull-down yöntemi gibi biyokimyasal metodlarla onaylanır. Ancak, bu işlemleri tüm etkileşimler için teyit etmek oldukça külfetli ve zaman alıcı olacağından etkileştikleri belirlenen sadece 118L ve 415R proteinlerinin etkileşimlerinin doğrulanması pull-down analizi ile gerçekleştirildi. Belirlenen etkileşimler virüsün hücreye giriş, replikasyon, virüs kapsidinin inşası, olgunlaşma ve tomurcuklanma aşamaları ile ilgili bilgiler ortaya koymaktadır. Bu güne kadar *Iridoviridae* familyasına ait virüsler üzerinde birçok çalışma yapılmıştır; fakat virion proteinleri arasındaki etkileşimler henüz hiçbir iridovirid için tespit edilmemiştir.

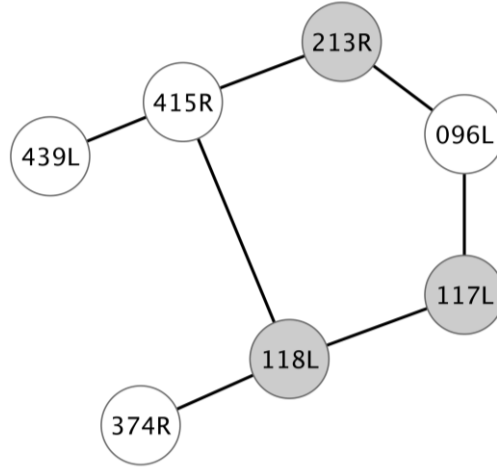
Çalışma kapsamında kullanılan 47 proteinin hepsi bir bütün oluşturacak şekilde birbirlerine 163 olası protein-protein etkileşimleri ile bağlanmaktadır. Çalışmada kullanılan 47 proteinden 17 tanesi transmembran domein içermektedir. Bunlar 010R, 117L, 118R, 203L, 213R, 307L, 337L, 361L, 457L, 234R, 111R, 325L, 084L, 061R, 034R, 138R, 312R proteinleridir. Transmembran domein içeren proteinler integral membran proteinleridir. Bu proteinlerle birlikte transmembran domein içermeyen 295L proteini de integral membran proteini olarak tanımlanmıştır (İnce vd., 2014). Transmembran domein içeren bu proteinler DNA protein özünü iç lipid tabaka ile ve iç lipid tabakayı kapsid ile bir araya getiren veya virionların bir kısmında görülen zarf üzerinde bulunan proteinler olmalıdır. Transmembran içeren bu 17 protein çalışmada kullanılan transmembran domein içermeyen diğer 30 proteini de birbirlerine bağlamakta ve 17 transmembran proteiniyle 47 protein arasında toplam 97 protein etkileşimi görülmektedir. Membran proteinlerinden bir veya bir kaç virüsün konak hücre membranına bağlanmasında görev almaktadır. Yapısal genlerden olan 118L bütün iridovirüs ve askovirüslerde homologdur. Bu genin Singapore grouper iridovirüsteki homoloğu olan VP088 proteini ile yapılan bir çalışmada VP088 proteininin yapısal proteinlerden biri olduğu ve hücre membran proteinlerinden 94 kDa'luk bir proteinle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bu bilgiler sonucunda VP088'in virüsün hücreye giriş-füzyon kompleksinin bir birimi olduğu düşünülmektedir (Zhou vd., 2011). Virüsün hücreye giriş-füzyon kompleksinin bilinmesi viral enfeksiyonun başlaması ile ilgili oldukça önemli bir bilgidir. Ayrıca başka bir çalışmada Frog virüs-3'e ait ve 118L'nin homoloğu olan 53R geninin virüs replikasyonu için hayati öneme sahip bir miristilasyonlu membran proteini olduğu belirtilmiştir (Whitley vd., 2010). Yine Rana grylio virüse ait 53R geninin virüs inşası için oldukça önemli olduğu, genin susturulması durumunda %58 oranında enfeksiyonun azaldığı tespit edilmiştir (Kim vd., 2010). İridoviridlerde zarflı olan virionlar 150 kata kadar daha yüksek bir enfeksiyon oluşturmaktadır. 118L'nin bir zarf proteini olması ve homologları ile ilgili yapılan çalışmalar bu proteinin virüsün giriş-füzyon kompleksinin bir birimi olabileceğini düşündürmektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada 118L'nin dokuz farklı proteinle (117L, 229L, 355R, 366R, 374R, 307L, 415R, 422L, 378R) etkileştiği tespit edilmiştir. Bunlardan biri coronavirüste sınıf I virüs füzyon proteini olarak sınıflandırılan bir protein ile homoloji gösteren 374R proteini ile olan protein etkileşimidir. Bu durum da 118L'nin virüsün giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olma durumunu kuvvetlendirmektedir. Daha sonraki çalışmalarda 118L'nin konak membran proteinleri ile etkileşip etkileşmediğinin tespit

edilmesi ve etkileşmesi durumunda virüse ait yapısal proteinlerden diğer dokuzu ile de etkileşimlerinin teyit edilerek hücrenin giriş-füzyon kompleksinin aydınlatılması literatüre oldukça önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca 118L'nin etkileştiği beş protein (117L, 229L, 366R, 415R, 422L) herhangi bir bilinen proteine benzememekle birlikte korunmuş herhangi bir domein de içermemektedir. Bu çalışma sonucunda konak membranına bağlanan virüse ait bir proteinin tespiti durumunda giriş-füzyon kompleksini oluşturan proteinler de açığa çıkarılmış olacaktır. Ayrıca görevi bilinmeyen bu proteinlerin görevlerini aydınlatmak daha da kolaylaşmış olacaktır.

Çalışma kapsamında 118L'nin 415R ile olan etkileşimi pull-down analizi ile doğrulanmıştır. 415R'nin amino asid sırasında herhangi bir korunmuş domeinle homolojisi bulunmamaktadır. 415R 4 farklı membran proteini (118L, 274L, 213R, 034R), iki fonksiyonu bilinmeyen protein (443R ve 159L) ve bir protein kinaz domeinine sahip olan protein (439L) ile etkileşmektedir. 415R proteini 118L ile etkileşiminden dolayı virüs giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olabilir. Bu sebeple virüsün konak hücreye tutunmasında önemli bir rol oynayabilir. Literatürde Singapore grouper iridovirüs ile yapılan bir çalışmada makropinositozun anahtar regülatörlerinden biri olan protein kinazların inhibisyonu virüs üretimini oldukça önemli bir biçimde düşürmektedir (Wang vd., 2014). Bu sebeple 415R'nin etkileşime girdiği protein kinaz da (439L) bu fonksiyon için oldukça önemli olabilir. Ayrıca 096L fasciclin domeinine sahiptir. Bu domein hücreye tutunma fonksiyonu yapmaktadır (Wang vd., 1993). 096L'nin bir integral membran proteini olan 213R ile etkileştiği görülmektedir. 415R ile 213R proteini de birbirleri ile etkileşmektedir. Bu proteinler virüsün hücreye giriş füzyonunda görev yapıyor olabilirler

Şekil 21.



Şekil 21. Virüsün konak hücreye girişinde görev yapabilecek proteinler arasındaki etkileşimler. Koyu renkli yuvarlaklar virüsün konak hücreye girişinde görev yapabilecek proteinlerdir.

İridoviridler dünya genelinde ekolojik çeşitlilik ve sucül kültürü yapılan hayvanlarda ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Williams vd., 2005). CIV'nin giriş-füzyon kompleksinin belirlenmesi genel olarak iridoviridlerin patolojisinin moleküler açıdan anlaşılması için oldukça önemlidir. Virüsün konak hücreye girişi enfeksiyonun başlayabilmesi için çok kritik bir basamaktır. Bu sebeple antiviral stratejilerin geliştirilmesinde bu basamak çoğunlukla hedef alınır.

Yapısal proteinlerden hangilerinin CIV virion yapısının oluşumu için hayati olduğunun ya da hangileri olmadan da yapının oluşabileceği konusunda herhangi bir bilgi literatürde bulunmamaktadır. Virion yapısı için hayati olmayan proteinler virüs enfeksiyonunun ilk aşaması ve gen ifadesinin regülasyonu için oldukça önemli olabilirler. Buna iki örnek verilebilir: i) Bu proteinlerden biri viral replikasyonu başlatması için viral DNA'yı nükleusa yönlendirmektedir (Willis ve Granoff, 1985). 295L DNA dizi analizi yapılmış bütün iridovirüslerde yapısal proteinler açısından beş ortak genden (274L, 295L, 142R, 118L, 022L) biridir ve virüs hayat döngüsü için hayati bir öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. 295L nükleer lokalizasyon sinyaline sahip transmembran domein içermeyen bir integral membran proteindir. Enfeksiyonun başında çok yoğun ifade edilmektedir; fakat enfeksiyondan 48 saat sonra yoğunluğu azalmaktadır (İnce vd., 2014). Aynı zamanda bu protein DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda görev alan proteinlerden biri olarak sınıflandırılmıştır. 295L 148kDa ağırlığında büyük bir proteindir ve virüs DNA'sını nükleusa yönlendiren protein olabilir. 295L protein disülfid izomeraz domeinine sahip olan 453R proteini ve miristilasyonlu membran proteini olan 337L ile

etkileşmektedir. Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) taşıyan proteinler virüs DNA replikasyonu ve virüs inşası (assembly) için gerekli proteinleri nükleusa yönlendirmektedir. Bazı proteinlerin miristilasyonu poliovirüs ve retrovirüslerde virüs partiküllerinin inşası için oldukça önemlidir. 337L muhtemel bir miristilasyonlu membran proteindir. 295L ve 337L'nin etkileşimi virüs partiküllerinin inşası, virüsün tomurcuklanması ve olgunlaşması için gerekli olabilir.

ii) Virion yapısı için hayati olmayan proteinlerden biri veya birkaçı en erken genlerin transaktivatörü olarak görev yapmaktadır. Çünkü saflaştırılmış CIV genomik DNA'sı hücreye transfekte edildiğinde enfeksiyon gerçekleşmemektedir. Buna rağmen, yapısal proteinlerle birlikte saflaştırılmış genomik DNA enfeksiyon oluşturabilmektedir (Cerutti vd., 1989; Nalçacıoğlu vd., 2003). Hangi yapısal proteinin hangi yapısal proteinlerle etkileştiği bilgisi en erken genlerin transaktivasyon proteinlerinin tespiti için oldukça önemlidir. En erken genlerin transaktivasyon proteinlerinin enfeksiyonun geç fazında üretildiği ve kapsidde birlikte paketlenildiği (İnce vd., 2014) ve büyük bir ihtimalle diğer iridoviridlerde homoloğu olduğu düşünülmektedir. En erken genlerin transaktivatör proteini olma ihtimali oldukça yüksek olan proteinler ise şunlardır: i) Serin/treonin protein kinaz domeini taşıyan 380R proteini enfeksiyon boyunca ve özellikle enfeksiyonun sonunda oldukça fazla miktarda üretilmektedir (İnce vd., 2014). Protein kinazların protein aktivitesini düzenleyen proteinlerin translasyon sonrası düzenlemeyi sağlamada oldukça önemli rolleri vardır. 380R'nin 13 yapısal proteinle etkileşime girdiği görülmektedir. ii) 232R geni de enfeksiyonun başından sonuna kadar fazla miktarda bulunan ve DNA polimeraz N terminalini kodlayan nükleer sinyal lokalizasyon sinyali taşıyan bir proteindir. Yedi farklı yapısal proteinle etkileşime girdiği tespit edilmiştir. iii) DNA bağlanma domeini içeren 401R proteini enfeksiyonun başında az, sonlarında ise fazlaca üretilen bir proteindir. Bu proteinde 11 yapısal proteinle etkileşmektedir. Bu proteinlerin etkileştiği belirlenen proteinlerle bir grup halinde en erken genlere ait bir promotör bölgesini çalıştırıp çalıştırmadığı tespit edilmelidir.

274L kodlu açık okuma zinciri majör kapsid proteinini (MCP) kodlar. MCP'ye bağlanan yedi farklı protein (415R: 26,66 kDa, 453R: 15,91 kDa, 142R: 33,64 kDa, 138R: 13,03 kDa, 378R: 22,21 kDa, 361L: 60,58 kDa, 395R: 17,28 kDa) tespit edilmiştir. Bunlardan üç tanesi (415R, 138R, 395R) herhangi bir tanımlanmış domein içermemektedir ve bilinen herhangi bir proteine benzememektedirler. MCP ile etkileşimlerinden dolayı görevi bilinmeyen bu proteinlerin fonksiyonları hakkında düşünceler oluşmuştur. MCP

transmembran domein içermez ve kapsidin yaklaşık %40'ını oluşturur. Bu çalışmada MCP'nin kendisi ile etkileşime girmediği görülmüştür. Bu durumda kapsomerleri bir arada tutmak için başka proteinlerin varlığına ihtiyaç vardır. Nitekim CryoEM çalışmaları (Yan vd., 2009) MCP proteininin yanında en az üç farklı minör kapsid proteini bulundurduğunu göstermektedir. Bunlar fermuar (zip) proteinleri (zip monomerleri ve zip dimerleri), parmak (finger) proteinleri ve tutunma (anchor) proteinleri olarak adlandırılmıştır. Minör kapsid proteinlerinin hangi genler tarafından kodlandığı herhangi bir iridovirid için de bilinmemektedir. Tutunma proteinleri kapsid yapısındaki pentasimetronlar ile iç lipid membranı birbirine bağlar. MCP'nin etkileşime girdiği proteinlerden 138R ve 361L transmembran domein içerdikleri için bu proteinler tutunma proteinler olabilir; fakat aynı çalışmada tutunma proteinlerinin MCP'nin ağırlığı ile orantılanarak tahmini moleküler ağırlığı 32,4kDa olarak hesaplanmıştır. 138R bu durumda tahmini ağırlığı 11,9 kDa \pm 1,5 kDa olarak hesaplanan fermuar proteinleri için uygun olan proteindir. CIV'nin proteomik çalışmasında da fermuar proteinleri için moleküler ağırlıklarına göre 138R, 010R ve 321R önerilmiştir (İnce vd., 2010). 142R ise moleküler ağırlık açısından tutunma proteinlerine uygun olan proteindir. 142R transmembran domein içermemektedir; fakat membran proteinleri her zaman transmembran protein olmak durumunda değildir. 19,7 kDa \pm 1,5 kDa olarak hesaplanan parmak proteinleri için ise 395R uygun olmaktadır. Bu üç protein haricinde MCP'ye bağlanan diğer proteinlerin de minör kapsid proteini olma durumu vardır. Böylece, bu doktora çalışması sonucunda oluşan bilgilere dayanılarak MCP'ye bağlanan bu proteinlerin hangilerinin gerçekte MCP ile etkileştikleri pull-down veya co-immunopresipitasyon deneyleri ile tespit edilerek minör kapsid proteinleri hangi genlerin kodladığı kesinlik kazandırılmalıdır. Tespit edilecek genlerin delesyonları ve elektron mikroskobu çalışmalarıyla bu proteinlerin aydınlatılması gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan yapısal proteinlerden 118L (miristilasyonlu membran proteini), 142R (RNazIII), 274L (majör kapsid proteini) ve 295L (nükleer lokalizasyon sinyali) genomu bilinen tüm iridovirüslerde bulunmuştur. Bu nedenle iridovirüs öz virion proteinleri olarak tanımlanmakta ve enfeksiyonda önemli rol oynadıklarına inanılmaktadır. 118L zarfta 274L ise kapsidde bulunan proteinlerdir. 415R ve 378R'nin bu tez çalışmasında 118L ile 274L proteinlerinin ikisine de bağlandığı belirlenmiştir. Bu durumda 415R ve 378R kapsid ve zarfı bir arada tutan proteinlerden olabilir. Aynı şekilde 118L ve muhtemelen tutunma proteini olan 142R arasında 422L ve 307L proteinleri aracılığı ile etkileşim vardır. Bu proteinler zarf ve kapsidi bir arada tutan proteinler olabilirler.

Proteinlerin işlenmesi ve modifikasyonu sürecinde rol oynayan proteinlerden protein kinaz domeini taşıyan 380R ve 439L proteinlerinin bir integral membran proteini ve peptidaz domeinine sahip olan 361L ile etkileşime girdikleri tespit edilmiştir. Literatürde peptidaz ve protein kinazların birbiri ile etkileştikleri görülmektedir (Gaetaniello vd., 1998). Tirozin protein kinaz domeinine sahip olan 179R'nin kendisi ile ve protein disülfid izomeras domeinine sahip 453R ile etkileştiği tespit edilmiştir. Protein kinazlar diğer proteinlerin aktivasyonu, sinyal iletimi, hücrel yolakların düzenlenmesi gibi oldukça önemli görevler üstlenirler. Bu etkileşimler bu proteinlerin aktivasyonu için önemli olabilir.

378R proteini 2-sistein adaptör domeinine sahiptir. Bu domeine sahip proteinler peptidaz ve kinazlarla spesifik olarak etkileşmektedir (Iyer vd., 2006). 378R'nin protein kinaz domeinine sahip olan 380R ile etkileştiği tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda Chilo iridescent virüs'e ait yapısal proteinler arasında gerçekleşen protein-protein etkileşimleri tespit edildi.

1) CIV yapısal proteinlerinden 17 tanesinin transmembran domein içerdiği TNHMM programıyla tespit edildi. Tespit edilen bu domeinler çıkartılarak genler çoğaltıldı ve maya-iki-hibrit sisteminde test edildi.

2) Maya-iki-hibrit sistemiyle CIV'ye ait çalışmada kullanılan 47 yapısal protein arasında bir bütün oluşturacak şekilde 163 olası etkileşim olduğu belirlendi.

3) Tüm yapısal proteinler arasından sadece muhtemel bir protein kinaz kodlayan 179R kodlu CIV yapısal proteinin kendisi ile etkileştiği belirlendi.

4) 17 integral membran proteininin (010R, 117L, 118R, 203L, 213R, 307L, 337L, 361L, 457L, 234R, 111R, 325L, 084L, 061R, 034R, 138R, 312R) diğer 47 proteinle toplam 97 protein etkileşimi gösterdiği belirlendi.

5) 17 integral membran proteininin, transmembran domein içermeyen 30 proteinle bir bütün oluşturacak şekilde etkileştiği görüldü.

6) Majör kapsid proteininin (274L) yedi farklı proteinle (415R, 453R, 142R, 138R, 378R, 361L, 395R) etkileştiği belirlendi. Bu proteinlerden en az üçü minör kapsid proteini olmalıdır.

7) Muhtemelen virüsün konak hücreye girişinde görev yapan 118L'nin dokuz farklı proteinle (117L, 229L, 355R, 366R, 374R, 307L, 415R, 422L, 378R) etkileştiği belirlendi. Etkileşimde bulunduğu proteinlerden 374R'nin Coronavirüs'ün füzyon proteiniyle homoloji gösterdiği belirlendi. Böylece virüs giriş-füzyon kompleksini oluşturabilecek grup tespit edilmiş oldu ve kanıtlanması gerekmektedir.

8) Protein modifikasyonunda ve işlenmesinde görev yapan yapısal proteinlerden protein kinazların (380R, 439L, 179R) protein modifikasyonunda görev yapan diğer proteinlerle (361L, 439L, 179R) etkileştikleri belirlendi.

9) DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda görev yapan proteinlerden fosfatazların (355R, 123R) DNA bağlanma domeini içeren proteinlerle (401R) ve virüs DNA polimerazlarının N terminal domeinini içeren proteinle (232R) etkileştiği belirlendi.

10) Öz proteinlerinin (118L, 142R, 274L, 295L) birbiri ile doğrudan bağlanmadığı; fakat birer farklı proteinle birbirlerine bağlandıkları tespit edildi.

11) Tirozin protein kinaz domeini içeren 179R, serin treonin protein kinaz domeini içeren 380R ve protein kinaz domeini içeren 439L proteinleri 27 yapısal proteinle toplam 34 etkileşim yaptığı belirlendi.

12) 118L ile 415R arasında maya-iki-hibrit sistemi ile belirlenen protein etkileşimi pull-down analizi ile kanıtlandı. Virüsün giriş füzyonunda görev yaptığı düşünülen 118L ile etkileşime giren 415R'nin virüs giriş füzyonunda görev yapabilecek 096L ve 439L ile etkileşime girdiği belirlendi.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada CIV'ye ait yapısal proteinler arasındaki etkileşimler maya- iki-hibrit yöntemi ile tespit edilmiştir. Maya-iki-hibrit yöntemi ile tespit edilen bu etkileşimlerin her birinin diğer yöntemler kullanılarak kanıtlanması gereklidir. Ayrıca *Iridoviridae* familyasının üyeleri için CIV yapısal proteinlerinin fonksiyonlarının aydınlatılması iridoviridlerde kapsidin inşası, olgunlaşma ve tomurcuklanma aşamalarının anlaşılması için oldukça önemlidir. Bu doktora çalışmasından sonra yapılabileceklerden bazılarını şöyle önerebiliriz:

1) Majör kapsid proteinle etkileştiği tespit edilen yedi farklı yapısal proteinin her birinin doğruluğu pull-down veya co-immunopresipitasyon gibi yöntemlerle kanıtlanması gerekmektedir. Çünkü MCP'nin etkileşimde bulunduğu tespit edilen genler minör kapsid proteinleridir ve bu yedi proteinden en az üçü minör kapsid proteini olmalıdır.

2) Majör kapsid proteinine bağlandığı kanıtlanacak bu minör kapsid proteinlerinin virüs genomundan delesyonu sonucu virion yapısının nasıl etkilendiği elektron mikroskobu çalışmalarıyla tespit edilerek hangi genin hangi tip minör kapsid proteinini (zip monomerleri, zip dimerleri, finger proteinler, anchor proteinler) kodladığı tespit edilmelidir.

3) 118L bir zarf proteindir ve kuvvetle muhtemel virüsün hücreye giriş kompleksinin bir üyesidir. Bu çalışma kapsamında 118L'nin dokuz farklı proteinle etkileştiği tespit edilmiştir. 118L'nin konak membran proteinleriyle etkileşiminin tespit edilmesi gerekmektedir. Ayrıca 118L'nin virüs genomundan delesyonu sonucu virüsün hücreye girişinin ne ölçüde etkilendiği tespit edilmeli ve diğer dokuz yapısal proteinle olan etkileşimlerinin de kanıtlanarak virüs-giriş füzyon kompleksinin tespit edilmesi gerekmektedir.

4) 374R coronavirus'e ait spike proteinine benzemektedir. Coronavirüs spike proteini ise bir sınıf I füzyon proteindir ve 3. maddede önerdiğimiz virüsün giriş füzyon kompleksininin bir birimi olabileceğini düşündüğümüz 118L ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir. Bu etkileşimin doğrulanması ve 374R'nin de fonksiyonunun aydınlatılması gerekmektedir.

5) Saflaştırılmış CIV genomik DNA'sı hücreye transfekte edildiğinde aktif değildir, yani enfeksiyon gerçekleşmez. Buna rağmen, yapısal proteinlerle birlikte saflaştırılmış genomik DNA enfeksiyon oluşturabilmektedir. Bu durum CIV yapısal proteinlerinden en az bir tanesinin veya bir grup proteinin en erken genlerin transaktivasyonunu sağladığını gösterir. Bu doktora çalışmasından çıkan hangi yapısal proteinin hangi yapısal proteinlerle etkileştiği bilgisi, en erken genlerin transaktivasyon proteinlerinin tespiti için oldukça önemlidir. Protein-protein etkileşimi yaptığı belirlenen proteinlerin bir grup halinde en erken genlere ait bir promotor bölgesini çalıştırıp çalıştırmadığı tespit edilmelidir.

6) CIV virion proteinlerinin hücrede apoptosizi indüklediği, hücrenin makromoleküler sentezini durdurduğu ve böcekler üzerinde metamorfik deformasyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Yapısal bir protein ve protein kinaz aktivitesine sahip olduğu önerilen; fakat CIV'nin proteomik çalışmalarında tespit edilemeyen saflaştırılmış 389L proteininin apoptosizi indüklediği tespit edilmiştir. 380R, 179R ve 439L yapısal proteinleri protein kinaz domainine sahiptir ve bu yapısal proteinlerin fonksiyonunun aydınlatılması gerekmektedir. Fonksiyonları aydınlatılacak bu proteinler, etkileşime girdikleri birçok fonksiyonu bilinmeyen proteinin de fonksiyonunu aydınlatmak daha kolay olacaktır.

7) Miristilasyonlu membran proteini olan 337L, poliovirüs ve HIV virüste olduğu gibi virüs kapsidinin inşası ve tomurcuklanması için önemli bir protein olabilir. Bu protein fonksiyonu bilinmeyen iki yapısal proteinle etkileşmektedir. 337L'nin fonksiyonunun tespiti ile birlikte fonksiyonu bilinmeyen bu proteinler de virüs kapsidinin inşası ve tomurcuklanmasında rol oynayabilirler. Böylece fonksiyonu bilinmeyen bu proteinlerin fonksiyonunu tespit etmek daha kolay olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Alberts, B., 1998. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists, Cell, 92, 3, 291–294.
- Auerbach, D. ve Stagljar, I., 2005. Yeast Two-Hybrid Protein–Protein Interaction Networks. Proteomics and Protein–Protein Interactions: Biology, Chemistry, Bioinformatics, and Drug Design. Waksman. New York, Springer.
- Balange-Orange, N. ve Devauchelle, G., 1982. Lipid composition of an iridescent virus type 6 (CIV), Archives of Virology, 73, 3-4, 363-367.
- Bigot, Y., Piegu, B., Casteret, S., Gavory, F., Bideshi, D. K. ve Federici, B. A., 2013. Characteristics of inteins in invertebrate iridoviruses and factors controlling insertion in their viral hosts, Mol Phylogenet Evol, 67, 1, 246-254.
- Bilimoria, S. L., 2001. Use of viral proteins for controlling the cotton boll weevil and other insect pests, United States Patent no. 6200561,
- Bilimoria, S. L., 2009. Use of Iridoptin to Induce Toxicity in Insects United States Patent no. US2009/0069239A1,
- Boumans, L. ve Aarnes, E., 2010. Blue craneflies in Finnmark, a putative case of Iridovirus infection (Diptera, Tipulidae; Iridoviridae), Norwegian Journal of Entomology, 57, 120-122.
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M. G., Suzan-Monti, M., La Scola, B., Koonin, E. V. ve Raoult, D., 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms, Proc Natl Acad Sci U S A, 106, 51, 21848-21853.
- 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.
- Brent, R. ve Ptashne, M., 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor, Cell, 43, 729–736.
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W., Vodovar, N., Ince, 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, Proc Natl Acad Sci U S A, 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.

- Bruckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. ve Schlattner, U., 2009. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology, Int J Mol Sci, 10, 6, 2763-2788.
- 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.
- 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., 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.
- 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, J Virol 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.
- 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., 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.
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C. ve Brunetti, C. R., 2007. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes, Virology Journal, 4, 11.
- Estojak, J., Brent, R. ve Golemis, E., 1995. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements., Mol Cell Biol., 15, 5820-5829.
- Fields, S. ve Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions, Nature, 340, 6230, 245-246.

- Friedel, C. C. ve Haas, J., 2011. Virus-host interactomes and global models of virus-infected cells, Trends Microbiology, 19, 10, 501-508.
- 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.
- Gaetaniello, L., Fiore, M., de Filippo, S., Pozzi, N., Tamasi, S. ve Pignata, C., 1998. Occupancy of dipeptidyl peptidase IV activates an associated tyrosine kinase and triggers an apoptotic signal in human hepatocarcinoma cells, Hepatology, 27, 4, 934-942.
- 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.
- Goorha, R., 1982. Frog virus 3 DNA replication occurs in two stages, Journal of Virology, 43, 2, 519-528.
- 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.
- Grigoriev, A., 2003. On the number of protein-protein interactions in the yeast proteome, Nucleic Acids Res 31, 14, 4157-4161.
- Guarente, L., 1993. Strategies for the identification of interacting proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1639-1641.
- Hartschuh, R. D., Wargacki, S. P., Xiong, H., Neiswinger, J., Kisliuk, A., Sihm, S., Ward, V., Vaia, R. A. ve Sokolov, A. P., 2008. How rigid are viruses, Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 78, 2 Pt 1, 021907.
- 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.
- Hemmerich, P., Schmiedeberg, L. ve Diekmann, S., 2011. Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance, Chromosome Research, 19, 1, 131-151.
- 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.
- 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.
- Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V. ve Aravind, L., 2006. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses, Virus Research, 117, 1, 156-184.

- İnce, I. A., Functional Genomics of Chilo Iridescent Virus: A transcriptomic approach, Doktora Tezi, Wageningen Universitesi, Hollanda, 2012.
- İnce, I. 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, I. A., Boeren, S. A., van Oers, M. M., Vervoort, J. J. ve Vlak, J. M., 2010. Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405, 1, 253-258.
- İnce, I. A., Ozcan, K., Vlak, J. M. ve van Oers, M. M., 2013. Temporal classification and mapping of non-polyadenylated transcripts of an invertebrate iridovirus, Journal of General Virology 1, 94, Pt 1, 187-192.
- İnce, I. A., Westenberg, M., Vlak, J. M., Demirbag, 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.
- Keegan, L., Gill, G. ve Ptashne, M., 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein, Science, 231, 4739, 699-704.
- Kelly, D. C. ve Tinsley, T. W., 1972. The proteins of iridescent virus types 2 and 6, Journal of Invertebrate Pathology, 19, 2, 273-275.
- Kelly, D. C. ve Tinsley, T. W., 1973a. 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., 1973b. The lipid content of two iridescent viruses, Journal of General Virology, 21, 2, 417-423.
- Kim, Y. S., Ke, F., Lei, X. Y., Zhu, R. ve Zhang, Q. Y., 2010. Viral envelope protein 53R gene highly specific silencing and iridovirus resistance in fish Cells by AmiRNA, PLoS One, 5, 4, e10308.

- Lee, J. H., Vittone, V., Diefenbach, E., Cunningham, A. L. ve Diefenbach, R. J., 2008. Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1, Virology, 378, 2, 347-354.
- 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.
- 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.
- Marina, C. F., Arredondo-Jime' nez, J., Castillo, A. ve Williams, T., 1999. Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito, Oecologia, 119, 383-388.,
- 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.
- Mohamed, M. R., Rahman, M. M., Lanchbury, J. S., Shattuck, D., Neff, C., Dufford, M., van Buuren, N., Fagan, K., Barry, M., Smith, S., Damon, I. ve McFadden, G., 2009. Proteomic screening of variola virus reveals a unique NF-kappaB inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses, Proc Natl Acad Sci U S A, 106, 22, 9045-9050.
- 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.
- Ngounou Wetie, A. G., Sokolowska, I., Woods, A. G., Roy, U., Deinhardt, K. ve Darie, C. C., 2014. Protein-protein interactions: switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches, Cell Mol Life Sci, 71, 2, 205-228.
- Ohba, M., Aizawa, K., 1979. Multiplication of Chilo iridescent virus in non insect arthropods. Journal of Invertebrate Pathology, 33, 278-283.
- Ozgen, 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.

- 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.
- Paul, F. E., Hosp, F. ve Selbach, M., 2011. Analyzing protein–protein interactions by quantitative mass spectrometry, Methods 54, 4, 387–395.
- 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., 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.
- Radloff, C., Vaia, R. A., Brunton, J., Bouwer, G. T. ve Ward, V. K., 2005. Metal nanoshell assembly on a virus bioscaffold, Nano Lett, 5, 6, 1187-1191.
- 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.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. ve Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, Genome Research, 13, 11, 2498-2504.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Vittone, V., Diefenbach, E., Triffett, D., Douglas, M. W., Cunningham, A. L. ve Diefenbach, R. J., 2005. Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1, Journal of Virology, 79, 15, 9566-9571.
- Wang, S., Huang, X., Huang, Y., Hao, X., Xu, H., Cai, M., Wang, H. ve Qin, Q., 2014. Entry of a Novel Marine DNA Virus, Singapore Grouper Iridovirus, into Host Cells Occurs via Clathrin-Mediated Endocytosis and Macropinocytosis in a pH-Dependent Manner, Journal of Virology, 88, 22, 13047-13063.
- Wang, W. C., Zinn K Fau - Bjorkman, P. J. ve Bjorkman, P. J., 1993. Expression and structural studies of fasciclin I, an insect cell adhesion molecule, The Journal of Biological Chemistry, 268, 0021-9258, 1448-1455.
- Whitley, D. S., Yu, K., Sample, R. C., Sinning, A., Henegar, J., Norcross, E. ve Chinchar, V. G., 2010. Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro, Virology, 405, 2, 448-456.
- Williams, T., 1996. The Iridoviruses, Advances in Virus Research, 46, 345-412.
- Williams, T. (2008). Iridoviruses of Invertebrates. Encyclopedia of Virology, Elsevier Ltd. . 3: 161-167.
- 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 Cory, J. S., 1994. Proposals for a new classification of iridescent viruses, Journal of General Virology, 75, 6, 1291-1301.
- Williams, T. ve Ward, V. K., 2010. Iridoviruses. Insect Virology. S. Asgari and K. N.J. Norfolk, 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.
- 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, J Mol Biol, 385, 4, 1287-1299.
- 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, S., Wan, Q., Huang, Y., Huang, X., Cao, J., Ye, L., Lim, T. K., Lin, Q. ve Qin, Q., 2011. Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088, Proteomics, 11, 11, 2236-224.

ÖZGEÇMİŞ

08.04.1983 tarihinde İstanbul'da doğdu. Orta öğretimini Gazi ilköğretim Okulunda, lise eğitimini Kumburgaz Mehmet Erçağ Ticaret Meslek Lisesinde tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimini fakülte ve bölüm birincisi olarak tamamladı. Şubat 2009 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı 2009 Şubat'ta Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora eğitimine başladı. 2007 Kasım ayından itibaren Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. 2009-2014 yılları arasında 2211-TÜBİTAK yurtiçi doktora bursu almaya hak kazandı. 2010 Aralık-2011 Mayıs'ta 6 aylığına Hollanda'nın Wageningen Üniversitesinde TÜBİTAK-2214 Yurt Dışı Araştırma Burs programından yararlanarak doktora çalışması için bulundu. Evli ve iki çocuk annesidir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

Yayınları:

Makaleler:

- Ozsahin, E.**, Sezen, K., & Demirbag, Z., 2015. Amsacta moorei Entomopoxvirus Encodes a Functional Esterase (AMV133) with Protease Activity. *Intervirology*, 58, 41-48, Doi: 10.1159/000369018
- Ozsahin, E.**, Sezen, K., & Demirbag, Z., 2014. Transcriptional analysis of ORF AMV133 of Amsacta moorei entomopoxvirus. *Archives of Virology*, 159(10), 2541-7, Doi: 10.1007/s00705-014-2096-1
- Ozsahin, E.**, Sezen, K., Demir, I., & Demirbag, Z., 2014. Bacterial isolates from *Palomena prasina* (Hemiptera: Pentatomidae) include potential microbial control agents. *Biocontrol Science and Technology*, 24(9), 1039-1051. Doi: 10.1080/09583157.2014.918584
- Kahriman, N., Iskender, N. Y., Yücel, M., Yayli, N., **Demir, E.**, & Demirbag, Z., 2012. Microwave-Assisted Synthesis of 1,30-Diaza-flavanone/flavone and Their Alkyl Derivatives with Antimicrobial Activity. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 49, 71.
- Yayli, N., Mısır, G., Yayli, N., Yaşar, A., **Demir, E.**, & Demirbag, Z., 2010. Synthesis and antimicrobial activity of N-alkyl substituted p-methyl (E)-3- and 4-azachalconium bromides. *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 219-228.
- Yayli, N., Üçüncü, O., Yayli, N., **Demir, E.**, & Demirbag, Z., 2008. Microwave-Assisted Synthesis of 1,4 -Diazaflavone and N-Alkyl Derivative Pigments with Anti-Microbial Activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 32, 785-795.

Bildiriler:

- Küçük E., **Ozsahin E.**, Demir İ., Demirbağ Z. (2014). Interaction Takes Place Between 337L and 295L Proteins Belong to Chilo Iridescent Virus. Paper presented at the Congress of Molecular Biology and Biotechnology, Bosna.
- Oğuzoğlu T.Ç., Muz D., Timurkan M. O., Koc B.T., Burgu I., Postel A., **Ozsahin E.**, Nalcacıoğlu R., Demirbag Z. (2013). Characterization and Expression of Immunodominant E Gene of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) Field Isolates from Turkey using Baculovirus Expression System for the Purpose of Preventing of BVDV Infection. Epizone, 7th Annual Meeting, 1-4.10.2013, p.161, Brussel-Belçika.
- Ozsahin, E.**, Nalcacıoğlu, R., Vlak, J., Oers, M., & Demirbag, Z. (2013). Interactions between structural proteins of Chilo iridescent virus. Paper presented at the Insect pathogens and entomoparasitic nematodes IOBC-WPRS Bulletin. Zagreb, Croatia.
- Ozsahin, E.**, Sezen, K., & Demirbag, Z. (2012, August 05-09). Molecular and functional analysis of ORF AMV133 encoded by Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV). Paper presented at the 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Buenos Aires, Arjantin.
- Ozsahin, E.**, K., S., & Z., D. (2012, September 23-26). Structural and functional analysis of lipase gene of Amsacta moorei entomopoxvirus. Paper presented at the 15th European Congress on Biotechnology (ECB15), Istanbul, Türkiye.
- Ozsahin, E.**, Nalcacıoğlu, R., & Demirbağ, Z. (2010). Molecular Analysis of ORF AMV133 Encoded by Amsacta moorei Entomopoxvirus (AMEV). Paper presented at the 43rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Trabzon, Türkiye.