

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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* PROTEİN KİNAZLARININ VİRAL  
PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Mehtap DANIŞMAZOĞLU**

**ARALIK 2016**

**TRABZON**



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



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei entomopoxvirus* Protein Kinazlarının Viral Proteinlerle Etkileşimlerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “doktora” tezi olarak hazırlanmıştır. Bu tezde ilk defa *Amsacta moorei entomopoxvirus* her iki protein kinaz proteininin virüs genomundaki proteinlerle etkileşimlerine bakılmıştır.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan tez izleme jürisi üyelerim sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Biyoloji Bölümü mikrobiyoloji grubu hocalarıma, tez süresince yardımlarından dolayı Aydın YEŞİLYURT, Cihan İNAN ve Çağla AKSU’ya tezin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan 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 dışı doktora araştırma burs programı (2214) ve 113Z081 numaralı proje kapsamındaki desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na teşekkür ediyorum.

Maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan, hayattaki en büyük moral ve sevgi kaynaklarım anneme ve bu tezi bitirmem için söz verdiğim babama, bu yolda beni hiç yalnız bırakmayan, bana güç veren ablam Meriç AYDIN’a ve hayatta her daim yanımda olduğunu bildiğim eşim Murat DANIŞMAZOĞLU’na sonsuz teşekkür ederim.

Mehtap DANIŞMAZOĞLU

Trabzon 2016

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Amsacta moorei entomopoxvirus* Protein Kinazlarının Viral Proteinlerle Etkileşimlerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU ‘nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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. 23/12/2016

Mehtap DANIŞMAZOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK 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. Poksvirüsler.....	3
1.2.1. <i>Poksviridae</i> Familyasının Genel Özellikleri .....	3
1.2.2. Poksvirüslerin Sistematığı.....	6
1.2.3. Entomopoksvirüsler .....	7
1.3. Entomopoksvirüslerde Genom Özellikleri .....	9
1.4. Entomopoksvirüslerde Enfeksiyon .....	10
1.5. <i>Amsacta moorei entomopoxvirüs</i> (AMEV).....	11
1.6. Viral Protein Kinazlar .....	11
1.7. Protein Etkileşimleri .....	13
1.7.1. Maya-İki-Hibrit Sistemi .....	17
1.8. Çalışmanın Amacı.....	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	22
2.1. Virüs ve Hücre .....	22
2.2. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyonunun Tayini .....	22
2.3. Primer Tasarımı.....	22
2.4. Viral DNA İzolasyonu .....	23
2.5. Elektrokompentent Hücrelerin Hazırlanması.....	23
2.6. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'e ait Protein Kinaz ve Diğer Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve Ara Vektör pJET 1-2'ye Klonlanması .....	24

2.7.	Genlerin <i>Av</i> ve <i>Yem</i> Vektörlerine Klonlanması .....	25
2.8.	Kompetent Maya Hücrelerinin Hazırlanması .....	25
2.9.	Kompetent Maya Hücrelerine Protein Kinaz Genlerini İçeren <i>Yem</i> Vektörlerin Transformasyonu .....	26
2.10.	<i>Yem</i> Vektörleri İçeren Maya Hücrelerine <i>Av</i> Vektörlerin Transformasyonu .....	26
2.11.	<i>Yem</i> Vektörleri İçeren (AMV153 ve AMV197) Mayalardan Protein İzolasyonu .....	27
2.12.	<i>Yem</i> Proteinlerin Western Blot Hibridizasyonu .....	27
2.13.	Tespit Edilen Etkileşimlerin Teyit Edilmesi .....	28
2.13.1.	Etkileşen Protein Genlerinin pGEX-2T Vektörüne Klonlanması.....	29
2.13.2.	AMV153 ve AMV197 Genlerinin pET28a Vektörüne Klonlanması .....	29
2.13.3.	<i>E. coli</i> BL21-pLysS Hücrelerinin Kompetent Yapılması .....	30
2.13.4.	Vektörlerin <i>E. coli</i> BL21 Hücrelere Transformasyonu ve Rekombinantların Analizi .....	30
2.13.5.	Etkileşen Proteinlerin Bakteriyel Sistemde İfadesi.....	30
2.13.6.	Etkileşen Proteinlerin GST-Pull Down Analizi .....	30
2.13.7.	Etkileşen Proteinlerin Western Blot Hibridizasyonu .....	31
3.	BULGULAR .....	32
3.1.	Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyon Tayini .....	32
3.2.	Primerlerin Tasarımı .....	32
3.3.	Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması .....	47
3.4.	Genlerin Transfer Vektörüne Klonlanmaları .....	49
3.5.	Genlerin <i>Av</i> Vektörlerine Klonlanmaları .....	53
3.6.	<i>Yem</i> Vektörlerine Klonlanan Protein Kinaz Genlerinin Maya Hücrelerinde İfade Edilmeleri.....	57
3.7.	Maya-İki-Hibrit Sistemi ile Etkileşimlerin Belirlenmesi .....	57
3.8.	Pull-Down Analizi ile Doğrulama.....	58
4.	TARTIŞMA.....	62
5.	SONUÇLAR.....	67
6.	ÖNERİLER .....	68
7.	KAYNAKLAR .....	69
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

*AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* PROTEİN KİNAZLARININ VİRAL  
PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMLERİNİN BELİRLENMESİ

Mehtap DANIŞMAZOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU  
2016, 90 sayfa

Entomopoksvirüsler, sadece böcekleri enfekte eden önemli bir virüs grubudur. Bunlar, aile olarak hem omurgasızları hem de insanların da dahil olduğu omurgalıları enfekte eden poksvirüs grubundandır. Protein kinazların, bazı omurgalı poksvirüslerde virüs morfogenezisinde, konak seçiciliğinde, hücre bölünmesinin düzenlenmesinde ve apoptozis üzerinde faaliyet gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e ait 2 protein kinaz proteini ile 230 virüs genom proteininin arasındaki etkileşimler, maya-iki-hibrit sistemi kullanılarak araştırıldı. Genomdaki genler *av*, protein kinaz genleri ise *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 gösterdi. AMV153 (protein kinaz) ile 5 adet protein etkileşimi, AMV197 (protein kinaz) de 11 adet protein etkileşimi olduğu belirlendi. Elde edilen bilgiler AMEV protein kinazlarının etkileştikleri proteinlerin aydınlatılmasında ve bunların virüs replikasyonundaki rollerinin anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** *Amsacta moorei entomopoxvirüs*, serin/treonin protein kinazlar, maya-iki-hibrit sistemi, protein-protein etkileşimleri



PhD. Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF PROTEIN PROTEIN INTERACTIONS AMONG  
PROTEIN KINASES OF *AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* (AMEV) AND  
PROTEIN KINASES WITH THE OTHER PROTEINS OF AMEV

Mehtap DANIŞMAZOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Assoc. Prof. Remziye NALÇACIOĞLU  
2016, 90 pages

Entomopoxviruses are an important group of virus, which infect only insects. These are from poxviruses group which can, as a family, infect both invertebrates and vertebrates, including humans. Protein kinases were known to have roles at virus morphogenesis, host selectivity, the regulation of cell division and apoptosis in some vertebrate poxviruses. In this study, interactions between 2 protein kinases and 230 virus genomic proteins of *Amsacta moorei entomopoxvirus* have been investigated by yeast-two-hybrid system. The protein kinases genes were cloned in *bait* and virus genomic genes were cloned in *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. 5 and 11 interactions were determined among AMV153 and AMV197 protein kinase proteins, respectively. The interacted proteins of AMEV protein kinases and their roles at virus replication will be identified.

**Key Words:** *Amsacta moorei entomopoxvirus*, serin/threonin protein kinases, yeast two hybrid system, protein-protein interactions

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Poksvirüslere ait genel görünüm .....	4
Şekil 2. Vaksinya virüs replikasyon şeması .....	5
Şekil 3. <i>Poxviridae</i> familyasının nükleositoplazmik çift zincir DNA virüsleri ile filogenetik ilişkisi .....	6
Şekil 4. Maya GAL4 transkripsiyon aktivatör proteini yapısı.....	18
Şekil 5. Maya İki Hibrit Metodu işleyiş modeli .....	19
Şekil 6. AMEV'e ait 230 ORF'nin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan zincirlerinin agaroz jel görüntüleri.....	48
Şekil 7. Genlerin ara vektöre klonlanması.....	50
Şekil 8. Genlerin ara vektöre klonlanması.....	52
Şekil 9. Genlerin av vektöre klonlanması.....	54
Şekil 10. Genlerin av vektöre klonlanması.....	55
Şekil 11. Protein kinaz genlerinin maya hücrelerinde ifade edilmeleri sonucu western blot hibridizasyonu ile doğrulanması.....	57
Şekil 12. Etkileşim oluşturan maya kolonileri.....	58
Şekil 13. Genlerin pull down analizi .....	59
Şekil 14. Maya-iki-hibrit sistemi ile AMEV protein kinaz proteinlerinin birbirileriyle ve virüsün diğer proteinleriyle belirlenen protein etkileşimleri.....	61

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik dağılımı.....	7
Tablo 2. Protein-protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan metotlar.....	16
Tablo 3. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'e ait genleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.....	33



## SEMBOLLER DİZİNİ

AD	: Aktivasyon domeini
AMEV	: <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
DBD	: DNA bağlanma domeini
ddH <sub>2</sub> O	: İki kere damıtılmış su
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ICTV	: Virüs taksonomisi uluslararası komitesi
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

Böcek virüslerini, doğaya ve insanlara yaptıkları olumlu ve olumsuz etkilere göre iki açıdan ele almak gerekir. Bu etkilerden biri, ipek böceği ve bal arıları gibi, insanlara ve çevreye faydalı olan böceklerin, virüsler yüzünden hastalanıp ölmeleri, diğeri ise çeşitli tarım ve orman ürünlerini veya insan sağlığını tehdit eden zararlı böceklerin virüsler ile kontrol altına alınabilmesidir. Bu ikinci etkisinden dolayı böcek virüsleri tarım ve ormancılıkta zararlı böceklerle mücadelede kullanılan önemli biyolojik mücadele materyali haline gelmiştir (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000; Sezen ve Demirbağ, 2005). Ayrıca, böcek virüsleri gen ifade vektörü (Anderson vd., 1996; Ciccarone vd., 1997) ve gen terapi vektörü (Merrihew vd., 2001; Stanbridge vd., 2003) olarak kullanılma potansiyeline sahip olduklarından endüstriyel bakımdan da öneme sahiptirler.

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, aşular 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.

Başlıca böcek virüslerinden olan Entomopoksvirüsler (EPV), ilk kez Vago (1963) tarafından keşfedilmiştir. EPV'lerin mikrobiyal mücadele ajanı olarak geliştirilmesi hem çok sayıdaki böcek takımından izole edilmelerinden hem de bakülovirüslerin kullanımını tamamlaması açısından çok büyük bir potansiyele sahiptir. Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera gibi dünyanın en önemli tarımsal zararlılarını içeren bu takımlardan izole edilmeleri, son yıllarda artan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları ve moleküler biyolojileri üzerine devam eden çalışmalar, bu virüsleri çok önemli kılmaktadır. EPV'ler birçok zararlı tür için, özellikle de bakülovirüslerin hiç izole edilmediği, çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisineklere karşı, biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülmektedir. Biyolojik kontrolde, EPV'lerin bakülovirüslere kıyasla en önemli dezavantajı, konaklarını öldürme sürelerinin uzun olmasıdır. Bu problem, EPV genomuna yabancı genlerin yerleştirilmesi sonucu genetik olarak değiştirilmiş EPV'lerin oluşturulmasıyla aşılabilir. Özellikle, son yıllarda entomopoksvirüsler biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektörü olarakta kullanılmaya başlamıştır (Moyer ve Hall, 1993). Böyle bir çalışmada, bir entomopoksvirüs olan *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e (AMEV) ait sferoidin (*sph*) kodlama bölgesi çıkartılıp yerine kloramfenikol asetil transferaz (*cat*) geni yerleştirilmiştir (King vd., 1998). Bu örneğe benzer olarak yapılan diğer çalışmalarda, interlökinler, sitokinler, büyüme faktörleri, interferonlar, enzimler ve yapısal proteinleri kodlayan genler, büyük DNA fragmentlerini yapısına alabilen poksvirüs vektörlerine klonlanıp ekspresyonları yapılabilmektedir.

AMEV tarımsal zararlıların kontrolünde biyolojik mücadele materyali olarak kullanılabilirdiği gibi, gen terapi ve gen ekspresyon vektörü olarak da kullanılma potansiyeline sahiptir. AMEV'nin sahip olduğu bu potansiyelinden faydalanabilmemiz için virüsün moleküler mekanizmasının aydınlatılması, genlerinin görevlerinin bilinmesi, bu gen ürünlerinin birbirleriyle olan etkileşimlerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

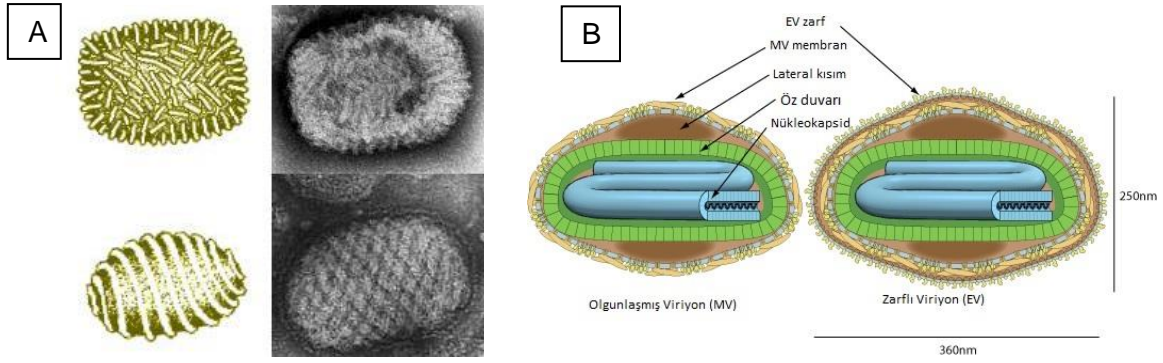
AMEV, entomopoksvirüslerin tip türüdür. Hücre kültürüne uyarlanmış ve genomunun nükleotit dizilimi tamamıyla analiz edilmiştir. Dizin analizi sonuçlarına göre AMEV genomunda 254 adet muhtemel açık okuma zinciri (ORF) belirlenmiş ve bugüne kadar yapılan çalışmalar ile bu ORF'lerin bir kısmının da görevleri aydınlatılmıştır (Hall ve Moyer, 1991; Gruidl vd., 1992; Lytvyn vd., 1992; Alaoui-Ismaili ve Richardson, 1996, 1998; Sriskanda vd., 2001; Becker vd., 2004, 2008; Li vd., 2005; Means vd., 2007; Nalcacioglu vd., 2010; Muratoglu vd., 2010).

AMEV genomunun biyoinformatik analizine göre, AMV153 ve AMV197 ORF'lerinin serin/treonin protein kinaz kodladıkları belirtilmiştir (Bawden vd., 2000). Bunlardan, AMV197'nin anatomik yapısı aydınlatılmış ve transkriptomik özellikleri belirlenmiştir (Muratoğlu vd., 2010). Protein kinazların, bazı omurgalı poksvirüslerde virüs morfogenezinde, konak seçiciliğinde, hücre bölünmesinin düzenlenmesinde ve apoptozis üzerinde faaliyet gösterdiği bilinmesine rağmen, bahsedilen olaylarda AMEV protein kinazlarının tam rolü hala aydınlatılamamıştır. Protein kinazlar görevlerini yerine getirirken birbirleriyle ve diğer virüs proteinleriyle etkileşim halindedirler. Bu etkileşim halinde olan proteinleri belirlemede maya-iki-hibrit (Y2H) sistemi önemli başlangıç noktası oluşturmaktadır (Field ve Song, 1989). Maya-iki-hibrit sistemi birçok protein arasındaki etkileşimleri tespit etmek için kullanılan yaygın bir yöntemdir (Friedel ve Haas, 2011, Giot vd., 2003, Grigoriev 2003, Ito vd., 2001, Peng vd., 2010). Bu yöntem 1989 yılından beri giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bu şekilde çeşitli proteinler arasındaki etkileşimleri gösteren birçok interaktom haritaları şu ana kadar oluşturulmuştur. Bu çalışmada da bu sistem kullanılmıştır. Böylece AMEV protein kinazlarının etkileştikleri viral proteinler tespit edilmiştir.

## **1.2. Poksvirüsler**

### **1.2.1. Poxviridae Familyasının Genel Özellikleri**

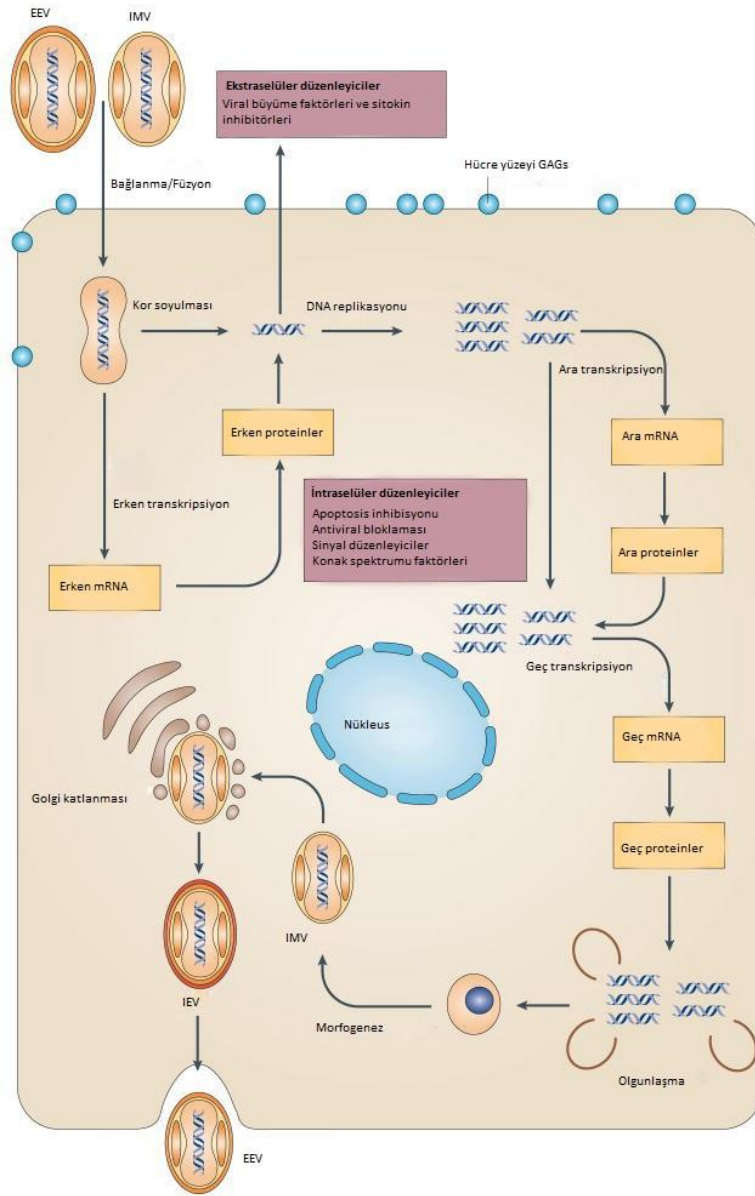
Poksvirüsler, oldukça değişken şekilli, tuğla biçimli (uzunluğu 220-450 nm, genişliği 140-160 nm, kalınlığı 140-260 nm) veya düzenli spiral filamentlere (çapı 10-20 nm) sahip ve ovoid (uzunluğu 250-300 nm, çapı 160-190 nm) yapıdadırlar (Murphy vd., 1995; Cann, 2005) (Şekil 1).



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

Viriyon parçacığının protein içeriği ağırlığının yaklaşık %90'ını oluşturur. Cinslere göre değişen, virüs genomu tarafından 150-300 protein kodlanmaktadır ve bunların yaklaşık 100 tanesi viriyonda bulunmaktadır. Virüs parçacığı, RNA transkripsiyonu, DNA replikasyonu, protein-nükleik asitlerin modifikasyonu için gerekli birçok enzime sahiptir (Carter ve Saunders, 2007). Zarflı viriyonlar, viriyon parçacığının etrafını saran çift tabakalı lipit arasına yerleşmiştir ve virüs tarafından kodlanan polipeptitlere sahiptir. Viriyon parçacığının ağırlığının yaklaşık %4'ü lipitlerden, %3'ü ise karbonhidratlardan oluşmaktadır (Murphy vd., 1995). Poksvirüs genomları, tek parçalı, çift zincirli DNA içermektedir ve viriyonun genom ağırlığının yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır.





Şekil 2. Vaksinya virüs replikasyon şeması (Mc Fadden, 2005)

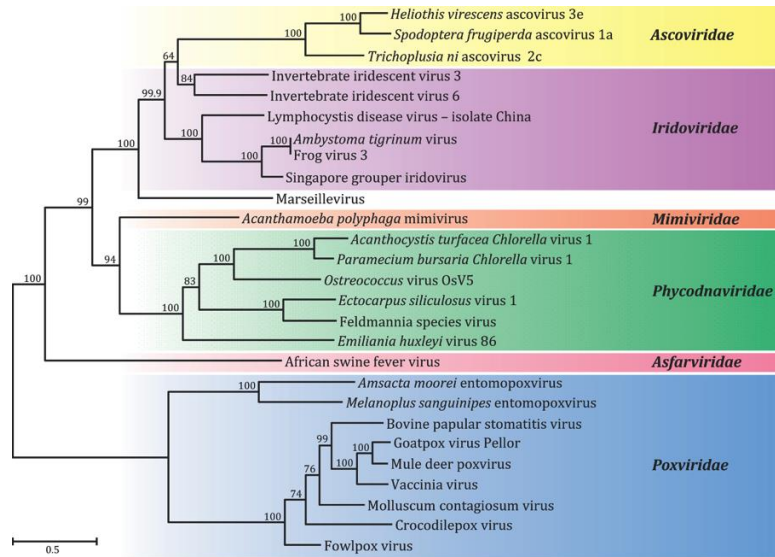
Konak hücelere giriş, viriyon hücreye tutunduktan sonra plazma membranı ve viral yüzey membranı arasındaki kaynaşma sayesinde gerçekleşmektedir. Virüs özündeki çoklu alt ünitelere sahip RNA polimeraz enzimleri sayesinde, her iki DNA zincirinden de viral transkriptler oluşturulur. Transkriptler, konak ribozomları tarafından translasyona uğratılır. Erken virüs moleküllerinin sentezi esnasında, konak makro moleküllerinin sentezi durdurulur. Virüsler, konak hücre sitoplazmasında çoğalır (Şekil 2) ve bunun sonucunda viroplazma veya virüs faktörleri olarak adlandırılan bazofilik (B-tipi) inklüzyonlar oluşur.

Genomda, farklı promotorların kontrolü altında açık okuma zincirleri (ORF) bulunmaktadır. Bu promotorlar, zamana bağlı olarak, genomun soyunması öncesinde veya esnasında ifade edilen erken genler, DNA replikasyonu sırasında ifade edilen ve geç genlerin transkripsiyonunu ayarlayan ara genler ve DNA replikasyonu sonrasında ifade edilen ve birçok viriyon proteinini kodlayan geç genler olmak üzere üç sınıf genin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Mc Fadden, 2005) (Şekil 2).

Erken protein sentezi, genellikle geç gen ifadesi esnasında azalmaktadır. Ancak bazı genler, ilk önce erken promotordan ifade edilmeye başlar ve daha sonra geç promotordan ifade edilmeye devam etmektedir (Murphy vd., 1995).

### 1.2.2. Poksvirüslerin Sistematığı

Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre Poxviridae familyası Chordopoxvirinae ve Entomopoxvirinae olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (URL-1, 2016). Omurgalı konaklardan elde edilen izolatlar, Chordopoxvirinae alt familyasına aitken, omurgasız konaklardan elde edilen izolatlar, Entomopoxvirinae alt familyasına aittir (Murphy vd., 1995) (Tablo 1). Şekil 3’de *Poxviridae* familyasının, diğer nükleositoplazmik çift zincir DNA virüsleri ile olan filogenetik ilişkisi gösterilmiştir.



Şekil 3. *Poxviridae* 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).

Tablo 1. Poksvirüslerin taksonomik dağılımı

<b>Familiya</b>	<b>Poxviridae</b>	<b>2 Alt familiya</b>
<b>Alt familiya</b>	<b><i>Chordopoxvirinae (Konakları omurgalı)</i></b>	<b>10 cins</b>
Cins	<i>Avipoxvirus</i>	10 tür
Cins	<i>Capripoxvirus</i>	3 tür
Cins	<i>Cervidpoxvirus</i>	1 tür
Cins	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	1 tür
Cins	<i>Leporipoxvirus</i>	4 tür
Cins	<i>Molluscipoxvirus</i>	1 tür
Cins	<i>Orthopoxvirus</i>	10 tür
Cins	<i>Parapoxvirus</i>	4 tür
Cins	<i>Suipoxvirus</i>	1 tür
Cins	<i>Yatapoxvirus</i>	1 tür
Cins	Tanımlanmamış	2 tür
<b>Alt familiya</b>	<b><i>Entomopoxvirinae (Konakları omurgasız)</i></b>	<b>3 cins</b>
Cins	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	7 tür
Cins	<i>Betaentomopoxvirus</i>	16 tür
Cins	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	6 tür
Cins	Tanımlanmamış	2 tür

### 1.2.3. Entomopoksvirüsler

Entomopoksvirüsler (EPV) ilk kez böcekler için özel yeni bir grup virüs olarak Vago tarafından 1963 yılında keşfedilmişlerdir (Vago, 1963) ve zaman içerisinde birçok ülkede yaygın olarak bulunan zirai bakımdan oldukça zararlı olan böceklerden de izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Arif, 1984). Biyolojik kontrol materyallerine karşı gelişen ilgi ve önemli tarımsal zararlıları içeren Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera takımlarına ait böceklerden izole edilmeleri, EPV'lerin replikasyonlarının detaylı anlaşılmasına artan bir önem kazandırmıştır (King vd., 1998). Hastalık belirtileri konaklar arasında çok çeşitlilik gösterir. Örneğin; AMEV ile enfekte olmuş *Estigmene acrea* larvaları enfeksiyonun geç saatlerine kadar hareket ve denge eksikliği gibi çok küçük belirtiler gösterir. EPV enfeksiyonlu *Elasmopalpus lignosellus* larvalarının ise renkleri kahverenginden kırmızıya dönüşür ve hemolenfin sferoidlerle dolması yüzünden hemolenf beyazımsı-mavi bir renk alır (Mitchel vd., 1983). Entomopoksvirüsler son yıllarda Orthoptera grubu böceklerden olan çekirgelerden de izole edilmişlerdir. Bugüne kadar bakülovirüslerin izole edilmediği bu grup böcekler için entomopoksvirüslerin gelecekte potansiyel bir biyokontrol ajanı olabileceği düşünülmektedir. Özellikle *Locusta migratoria*'dan izole edilen entomopoksvirüs çok önemlidir, çünkü bu çekirge türü Afrika ve Asya'da çok büyük ekonomik zarara sebep

olmaktadır. Virüsle enfekte olmuş böceklerin larval büyümesi ve gelişme oranında önemli seviyede bir gerileme görülür. Birçok sivrisinek türü de EPV enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlıdır. Henry ve Jutila (1966) tarafından izole edilen *Melanoplus sanguinipes* EPV'nin aynı cinse dahil bir çok türü enfekte ettiği gözlenmiştir (Oma ve Henry, 1986). Özellikle son yıllarda birçok virüs izolatu *Ips typographus* (kabuk böceği; Wegensteiner ve Weiner, 1995), bir tür çekirge olan *Melanoplus sanguinipes* (Beaudoin vd., 1994) ve *Adoretus versutus* (kakao zararlısı, McGuire vd., 1991) gibi çeşitli zararlılar için potansiyel biyolojik mücadele ajanı olarak önerilmektedir. EPV'ler özellikle de bakulovirüslerin hiç izole edilmediği, çekirgeler, ağustos böcekleri ve sivrisinekler gibi birçok zararlı tür için biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülmektedir. EPV'lerin bakulovirüslerle kıyaslandıklarında en önemli dezavantajı, konaklarını öldürme sürelerinin uzun olmasıdır. Bu problem EPV genomuna yabancı genlerin yerleştirilmesi sonucu genetik olarak değiştirilmiş EPV'lerin oluşturulmasıyla aşılabılır (Sezen ve Demirbağ, 2005).

Poksvirüslerin çeşitli özellikleri bu virüslere ekspresyon vektörü olarak geniş bir kullanım alanı sağlamaktadır (Moss, 1996). Bu özelliklerden bazıları, rekombinant virüslerin oluşturulması ve izole edilmelerinin kolay olması, büyük miktarda DNA alma kapasiteleri, yüksek ekspresyon sağlama kabiliyetleri ve geniş konak spektrumuna sahip olmalarıdır (Moss, 2001). Rekombinant virüsler *in vivo* veya *in vitro* protein sentezinde ve aşı olarak kullanılmaktadırlar (Moss, 2001). Son yıllarda entomopoksvirüsler biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmaya da başlanmıştır. Bir çalışmada AMEV'nin sferoidin kodlama bölgesi çıkartılıp yerine kloramfenikol asetil transferaz (*cat*) geni yerleştirilen rekombinant virüsler Ld652 hücrelerinde üretilmiştir (King vd., 1998). Ayrıca yapılan bu tip çalışmalarda interlökinler, sitokinler, büyüme faktörleri, interferonlar, enzimler ve yapısal proteinleri kodlayan genler büyük DNA fragmentlerini yapısına alabilen poksvirüs vektörlerine klonlanıp ekspresyonu yapılabilmektedir. Başka bir çalışmada kanser gen tedavisinde kullanılan interlökin-2 geni (IL-2) vaksinya virüs ekspresyon vektörüne klonlanıp (pMJ601) büyük miktarda ekspresyonu sağlanmıştır (Hengjun vd., 2001). Ekspresyon poksvirüs promotorları veya bakteriyofaj RNA polimerazları veya akraba virüs promotorları kullanılarak başarılmaktadır (Moss, 2001).

EPV'lerin en önemli karakteristik yapısı enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında büyük oval şekilli sferoidlerin oluşumudur. Bu yapılar 5-20 µm boyunda ve orijinal olarak

“sferule” olarak adlandırılır. Ultra yapısal çalışmalar sferoidlerin parakristal bir ağ içine gömülü virüsleri içeren elektronca yoğun yapılar olduğunu göstermiştir.

Spindıllar alfaentomopoksvirüsler ve bazı Lepidoptera grubu üyelerin EPV’leri ile enfekte olmuş hücrelerinin sitoplazmalarında ikinci bir protein yapı olarak bulunurlar. Bu yapılar şu ana kadar hiçbir Orthoptera veya Diptera konakta enfeksiyon oluşturan EPV’de gözlenmemiştir. Spindıllar 1-15 µm boyunda, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmalarında veya bir sferoid içinde virüs partikülleriyle beraber görülebilirler. Fusolin proteini tarafından oluşturulan bu yapılar sferoidlerden çok farklıdır ve ilk olarak Bergoin ve arkadaşları (Bergoin vd., 1970) tarafından çalışılmıştır. Spindıllar bilateral simetriye sahiptirler. Bu özellikleri ile kolayca sferoidlerden ayrılırlar. Sferoidlerden diğer bir önemli farkı ise spindılların virionlara sahip olmamasıdır.

### 1.3. Entomopoksvirüslerde Genom Özellikleri

Entomopoksvirüsler büyük, doğrusal, çift zincir, yaklaşık 225 kb’lik bir genoma sahiptirler (Arif, 1995; Hall ve Hink, 1990). Entomopoksvirüs DNA’sı vaksinya virüsün sahip olduğu %37’lik G+C oranına karşın %18-24’lük düşük bir G+C oranına sahiptir (Arif, 1984). Virüs genomu, iki membran veya bir ya da iki yanal yapı ile çevrili nükleoid yapı içinde bulunur. Bu yapılar dış virion zarı ile çevrilidir. EPV genlerinin bir kaçı tanımlanmış ve bazılarının sıraları belirlenmiş olmasına rağmen, halen daha genom organizasyonu bakımından çok az şey bilinmektedir (King vd., 1998). Sadece *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arctiidae) ve *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae)’den izole edilen EPV’lerin (AMEV, MsEPV) tüm genomları aydınlatılmıştır (Bawden vd., 2000; Afonso vd., 1999). DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda, 3 Orthoptera EPV genomu arasında yüksek oranda baz sırası homolojisi belirlenmesine rağmen, MsEPV DNA’sı ile vaksinya virüs, Lepidoptera veya Coleoptera orjinli EPV DNA’ları arasında ya çok düşük ya da hiç homoloji olmadığı belirlenmiştir (Langridge, 1983). EPV virionlarının protein yapısı SDS-PAGE ile aydınlatılmış ve bir virionun 12-250 kDa arasında değişen ağırlıklarda yaklaşık 40 yapısal proteine sahip olduğu belirlenmiştir (Bilimoria ve Arif, 1980; Langridge ve Roberts, 1982; Levin vd., 1993; Mitchel vd., 1983). Bu polipeptidlerin virüs partikülündeki dağılımı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Arif ve Kurstak, 1991; Bilimoria ve Arif, 1980).

Yapılan araştırmalarla AMEV protein sentez modeli karakterize edilmiş ve viral proteinler üç sınıfa ayrılmıştır. Erken proteinler enfeksiyondan 3 saat sonra, ara genler 6 saat sonra, geç proteinler ise 12 saat sonra belirlenebilmiştir. Sferoidin sentezinin en erken 15. saatte başladığı ve 72. saate kadar devam ettiği tespit edilmiştir (Winter vd., 1995). Winter ve arkadaşları (1995) aynı zamanda inhibitörlerin AMEV replikasyonu üzerine etkilerini araştırmıştır. İsatın- $\beta$ -thiosemikarbazon (IBT), 1- $\beta$ -D-arabinofuranozilsitozin (Ara-C) ve fosfonoasetik asit (PAA) inhibitörlerinin tümünün vaksinya virüs ile enfekte olmuş hücrelerde geç gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ve bu inhibitörler poksvirüs replikasyon döngüsünün erken (DNA sentezinden önce) ve geç (DNA sentezinden sonra veya aynı anda) fazlarını belirlemek için kullanılır. Şekil 2 vaksinya virüsün replikasyon Őemasını ve transkripsiyon sınıflarını göstermektedir.

#### 1.4. Entomopoksvirüslerde Enfeksiyon

EPV'lerin replikasyonu *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda çalışılmıştır. EPV viyonları sferoid proteinini meydana getirdiği protein yapı içerisine gömülü olarak bulunurlar. Sferoidler larva tarafından yenildikten sonra orta bağırsakta özölür ve serbest kalan viriyonlar epitel hücrelerine saldırırlar. Bağlantıyı sağlayan reseptörlerin yapıları aydınlatılmıştır (Granados, 1973). Replikasyonu takiben inklüzyon yapıların oluşumu 8-10 gün alır. Gömülü virionların sayısı aynı konağın farklı hücrelerinde oldukça farklılık gösterir. Viroplazma olarak bilinen elektronca yoğun bölgeler DNA replikasyon yeri olarak aydınlatılmışlardır (Granados ve Roberts, 1970). Coleoptera grubu böceklerin EPV enfeksiyonunda spindil adı verilen ikincil inklüzyon yapılar da oluşur. Spindillar olgun virionlarla birlikte ya sferoidlere gömülürler ya da bağımsız yapı olarak bulunurlar (Gauthier vd., 1995). Viral replikasyonun ilk kısmı yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasında gerekleşmesine rağmen hücre dışı viriyonlar ve inklüzyon yapılar aynı zamanda hemositler, hipodermis (=epidermis), kas ve genital doku hücrelerinde görülebirlirler (Henry ve Jutila, 1966; Robert ve Granados, 1968). Şekil 2 vaksinya virüsün replikasyonunu Şematik olarak göstermektedir (McFadden, 2005).

Çok az sayıda EPV kültür kültürlerinde çalışılabildiği için, *in vitro* replikasyonları hakkında hücresel ve moleküler seviyede yeterli bilgi mevcut değildir. AMEV için iki üretken hücre suğu tespit edilmiştir. *E. acraea* (BTI-EAA) hücre suğu Granados ve Naughton (1975) ve *L. dispar* (IPLB-Ld652) hücre suğu ise Goodwin ve arkadaşları (1990), tarafından tespit edilmiştir. Genellikle hücre kültüründe görünen replikatif olaylar *in vivoda*

görünenlerle benzerdir. *E. acraea* hücrelerinde yapılan çalışmada, hücrelerin 12-24 saat sonra yuvarlaklaştığı, 48 saat sonra sitoplazmanın tanecikli bir hal aldığı ve 72 saat sonra ise sferoid oluşturduğu gözlenmiştir (Marlow vd., 1993). AMEV'nin *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinde replike olduğu da gösterilmiştir (Aloui ve Richardson, 1996). Ayrıca *Bombyx mori* ve *Pseudaletia separata* hücre suşlarının PsEPV için üretken oldukları da ispatlanmıştır (Hukuhara vd., 1990).

### **1.5. *Amsacta moorei* entomopoxvirus (AMEV)**

AMEV hücre kültüründe rahatça üretilebilen ve çalışılabilen tek entomopoksvirüstür (Becker vd., 2008). Böylece bu virüs ile moleküler seviyede daha detaylı karakterizasyon çalışmaları yapılabilen ve ekspresyon vektörü olarak kullanılma potansiyeli oluşmaktadır. Ayrıca bu avantajından dolayı betaentomopoksvirüs grubunun temsilcisidir. Biyolojik kontrol materyallerine olan ilginin artması ve EPV'lerin bakülovirüslerin izole edilmediği zirai açıdan oldukça zararlı türlerden izole edilmeleri bu virüslerin replikasyonlarını daha iyi anlama ve potansiyel biyokontrol materyali olarak geliştirme çabalarını arttırmıştır (King vd., 1998, Sezen ve Demirbağ, 2005). Virüsün gen ekspresyon ve gen terapi vektörü olarak geliştirilebilmesi ve biyolojik kontrol amaçlı kullanılabilmesi için virüse ait morfolojik, biyolojik ve moleküler özelliklerin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda AMEV'nin tüm genom analizi 2000 yılında Bawden ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve genomun 232,392 bazdan oluştuğu ve biyoinformatik analizine göre muhtemel 294 açık okuma zinciri (ORF) bulunduğu ortaya konulmuştur. Bazı genlerin fonksiyonel analizleri gerçekleştirilmiştir (Peterson vd.,1997; Becker vd., 2004; Li vd., 2005; Means vd., 2007; Mitsuhashi vd., 2007; Becker vd., 2008). Daha sonra Guo ve Yu (2007) yaptıkları bir çalışmada AMEV'e ait 294 ORF'nin 38 tanesinin protein kodlamadığını biyoinformatik analizlerle belirlemiştir. Bu genlerden ikisi, muhtemel serin/treonin protein kinaz olarak tespit edilmiştir.

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

Protein kinazlar, ATP'deki bir fosfatı, hedef substrat proteinin serin, treonin veya tirozin aminoasidine taşınmasını sağlayan büyük bir enzim grubudur. Bu enzimler, protein fosfatazlarla birlikte hücrel sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde anahtar bir role sahiptir. Bilinen protein kinazlar, fosforilledikleri hidroksiaminoasitlere göre, serin/treonin protein kinazlar ve tirozin protein kinazlar olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. Serin/treonin

protein kinazlar, substratlarının serin ve treonin aminoasitlerini fosforiller. Bir çok kanser türünde, serin/treonin kinaz aktivitesinde değişiklik belirlenmiştir (Capra vd., 2006). Ayrıca, bir serin/treonin protein kinaz olan p90 ribozomal S6 kinazın prostat kanser hücrelerinin çoğalmasında düzenleyici olduğu belirlenmiştir (Clark vd., 2005). Bu çalışmalar, protein kinazların biyokimyasal olaylardaki düzenleyici rollerinin önemini göstermesi açısından önemlidir.

Fosforilasyon, hücrenel veya viral aktiviteyi düzenleyen en genel ve yaygın protein modifikasyonlarından biridir (Manning vd., 2002). Kinazlar tarafından ayarlanan bu modifikasyon, transkripsiyon, translasyon, hücre bölünme döngüsü, protein degradasyonu, hücreler arası taşınma ve apoptosiz gibi hücrenel olaylarda etkilidir (Manning vd., 2002). Hücreleri enfekte eden virüslerin de aynı mekanizmaları kullandığı rapor edilmiştir. Örneğin, proteinin fosforilasyonu, bir poksvirüs olan vaksinya virüsler için önemli bir düzenleyici mekanizmadır. Virüs parçacıklarının inşasından sorumlu birkaç protein, serin ve treonin aminoasitlerinden fosforillenir (VanSlyke ve Hruby, 1990). Ayrıca, B1R olarak bilinen vaksinya enziminin de viriyona paketlenildiği bilinmektedir (Watanabi vd., 1974; Kleiman ve Moss, 1975a). Bu enzimin, hem viral hem de viral olmayan proteinleri serin ve treonin aminoasitlerinden fosforillediği gösterilmiştir (Kleiman ve Moss, 1975b). B1R proteini, *E. coli*'de ekspreslendiğinde, kazein de dahil olmak üzere, yalancı substratları fosforillediği gösterilmiştir (Banham ve Smith, 1992; Lin vd., 1992; Rempel ve Traktman, 1992). Rekombinant B1R'nin en iyi substratları, 40S ribozomal alt ünitenin S2 ve Sa proteinleridir (Banham vd., 1993). Bu proteinler, hücrelerin vaksinya virüsle enfeksiyonu sırasında fosforillendiği için, B1R kinazın potansiyel substratlarıdır (Kaerlein ve Horak, 1976).

Diğer yandan, büyük DNA virüslerinden olan herpes simpleks virüs 1 (HSV1)'in, en az üç protein kinaz (US3, UL13 ve UL39) kodladığı ve bunların, viral ve hücrenel proteinlerin fosforilasyonu sayesinde hem kendi replikasyon işleminin düzenlenmesinde hem de hücrenel proteinlerin modifikasyonunda görev aldığı tespit edilmiştir (Kawaguchi ve Kato, 2003). Bunlardan UL13'ün, virüs zarfına yerleştiği belirlendiği için, enfeksiyondan hemen sonra meydana gelen olaylarda rol aldığı düşünülmektedir. Böylece, UL13, yeni enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmasına geçer ve fosforillediği zarf proteinlerinin daha kolay parçalanmasını sağlayarak enfeksiyona yardımcı olabilir (Morrison vd., 1998). Benzer şekilde, HSV2'nin de protein kinazlara sahip olduğu tespit edilmiştir (Smith, 2005). HSV2 R1 olarak bilinen bu protein, serin/treonin protein kinaz aktivitesine sahiptir ve ICP10PK



proteinindeki ilk 411 aminoaside yerleşmiştir. ICP10PK'nin, Ras/MEK/ERK biyokimyasal yolunda, sinyalin iletiminden sorumlu büyüme faktörü reseptörünü aktifleştirdiği bilinmektedir. Bu proteinin, ölümsüz hücrelerde transformasyon aktivitesine, normal diploid hücrelerde mitojenik aktiviteye (transform edici olmayan) ve merkezi sinir sistemindeki post mitotik nöronlarda anti-apoptotik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ICP10PK sayesinde Ras/MEK/ERK biyokimyasal yolunun aktivasyonunun, virüsün çoğalması için gerekli olduğu da bu çalışmada belirtilmiştir.

### 1.7. 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 yol 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 hücresel süreçlerdeki önemli rollerini gerçekleştirmek için, çok büyük bir ağ 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 DNA ile etkileşir; 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, hücresel yapıların oluşumu ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli hücresel 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 seçiciliği sağlayabilir, diğer proteinleri inaktive edebilir veya onları parçalanmaktan 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 metotlarından 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 etkileşmesidir. NFkB proteini çok fazla sayıda bağışıklık sistemi elemanını kodlayan genlerin transkripsiyonel faktörüdür. Poksvirüs ve diğer birçok virüs konağın NFkB sinyal iletim yolunu etkileyerek virüse karşı bağışık cevabın oluşmasına engel olur, bu sayede virüs hayatta kalmayı başarır (Mohamed vd., 2009). Bu sebeplerden dolayı protein etkileşimlerinin tanımlanması son yıllarda 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 splaying 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 metotlarla test edilerek bir sonuca ulaşılır. İkinci olarak biyoinformatik çalışmalar bu konuda oldukça fazla yapılmaktadır. Bilinen protein etkileşimlerinde rol oynayan protein kısımları, diğer proteinlerde araştırılarak etkileşimde bulunabilecek proteinler biyoinformatik olarak tanımlanmaktadır. Yine deneysel sonuçlardan çıkan etkileşimler biyoinformatik çalışmalarla birleştirilmekte ve birçok karmaşık sinyal iletim yolları açıklanmaktadır.

Protein etkileşimlerini tespit etmek için deneysel yöntemler kullanılır. Protein etkileşimlerinin karakterizasyonunda kullanılan deneysel metotlar 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 analizi 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 kromotografisi-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 2’te gösterilmiştir.

Tablo 2. Protein-protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan metotlar

<i>Metot</i>	<i>Deneyisel Amaç: Yeni Keşif</i>	<i>Deneyisel 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	+	-	+	-
Afinite kromotografisi ve Kütle Spektrometrisi	+	+	+	+
Pull-down Analizi (Çöktürme)	-	+	+	+
Co-immunopresipitation (immünçökeltme)	-	+	+	+
Colocalization/FRET/BRET (floresan rezonans enerji transferi)	-	+	+	-
Cross-linking (çapraz bağlanma)	-	+	+	+
Analitik ultrasantrifügasyon	-	+	-	+
İmmunofloresan/konfokal mikroskopi	-	+	+	-
Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	-	+	-	+

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.

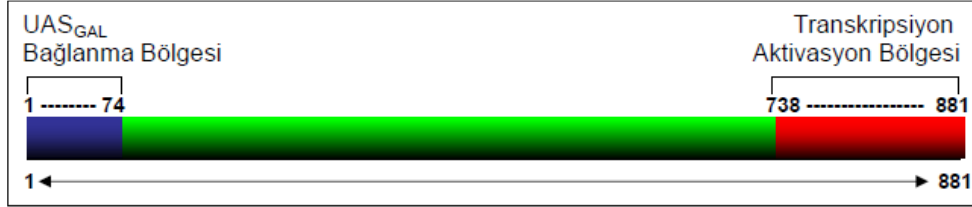
Çünkü çıkan bütün etkileşimleri doğrulamak çok fazla zaman ve masraf gerektirir (NgounouWetie vd., 2014).

### 1.7.1. Maya-İki-Hibrit Sistemi

İki-hibrit teknikleri, ökaryotik ya da prokaryotik organizma hücrelerinde transkripsiyonun regülasyonunda iş gören, özellikle transkripsiyon aktivatör proteinlerinin fiziksel ve işlevsel olarak ayrılabilen iki farklı bölgeye sahip olmaları temeline göre geliştirilmiş, protein-protein ya da protein-DNA etkileşimlerini (tek-hibrit metodu) saptamakta başarılı bir şekilde uygulanan tekniklerdir. Memeli hücreleri için de iki-hibrit teknikleri geliştirilmiş olmakla birlikte, özellikle genom kitaplığı tarama çalışmalarında maya hücreleri için geliştirilen maya-iki-hibrit tekniği çok daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinler arasındaki etkileşimleri belirlemeyi esas alan maya iki hibrit tekniği ilk kez 1989'da Field ve Song tarafından geliştirilmiş, SNF1 ve SNF4 proteinleri arasındaki etkileşimleri saptamak amacıyla kullanılmıştır. Halk arasında hamur mayası ya da bira mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae* için geliştirilen bu metot birçok araştırmacı tarafından standart bir protokol olarak kullanılmaktadır. *S. cerevisiae*, genetik çalışmalarda sıkça kullanılan ve tüm genom dizisi ortaya konan ilk ökaryotik model organizmadır. Bir bakteri gibi kolay üretilebilmesi ve gıda olarak kullanılabilir kadar insan için herhangi bir enfeksiyon riski taşıması *S. cerevisiae*'nin çalışmalarda tercih edilmesinin önemli nedenlerindedir.

*S. cerevisiae* galaktoz metabolizmasında rol alan genlerin bir kısmı maya iki hibrit metodunun temelini oluşturmaktadır. Mayalarda GAL gen ailesi içerisinde birçok yapısal ve düzenleyici gen yer almaktadır. Bunlardan Gal3, Gal4 ve Gal80 düzenleyici genlerdir. Gal1, Gal2, Gal7, Gal10 ve MEL1 (Gal5) genleri ise galaktoz metabolizması ile ilgili yapısal genlerdir. Düzenleyici genlerden Gal80 negatif regülasyon sağlar. Maya iki hibrit metodunun ana aktörlerinden biri olan GAL4 proteinini kodlayan gen 16. kromozom üzerinde yer almaktadır. Maya GAL4 proteini 881 aminoasitten oluşan, yaklaşık 92 kDa ağırlığında bir proteindir ve homodimer yapıda transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür. GAL4 proteininin amino-terminal bölgesi (1-74. amino asitler) DNA molekülünde kendine özgü dizilere bağlanmada rol oynar (DNA binding domain: BD). GAL4 proteini BD bölgesi ile DNA üzerinde 17 nükleotidlik bir diziyi (upstream activation sequence: UAS) tanıyarak buraya bağlanır. Proteinin amino-terminal bölgesi aynı zamanda hücre nükleusunda lokalizasyon işlevi de üstlenir. GAL4 proteininin karboksi-terminalinde yer alan 738-881.

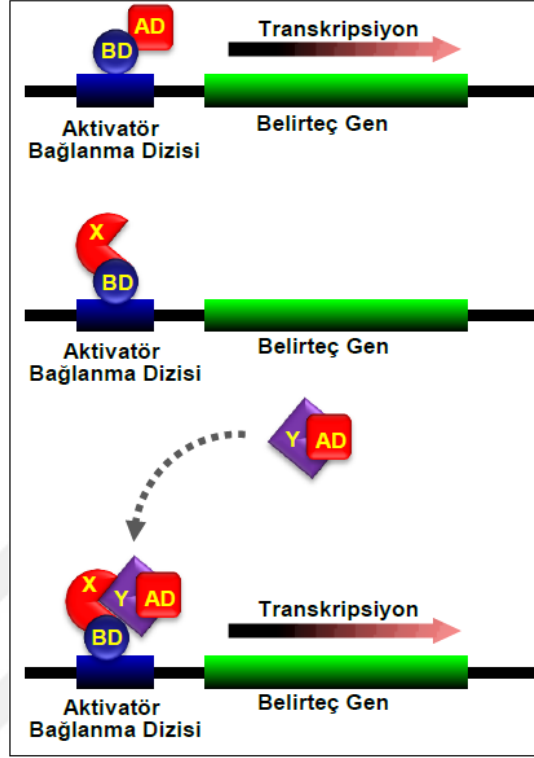
aminoasit bölgesi ise ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eden bölgedir (activation domain: AD) (Şekil 4). Galaktoz metabolizmasında negatif regülatör olarak rol alan Gal80 proteini GAL4 proteininin karboksi-terminal bölgesine bağlanır.



Şekil 4. Maya GAL4 transkripsiyon aktivatör proteini yapısı. Maya GAL4 proteini 881 aminoasitten oluşmaktadır. 1-74 aminoasit bölgesi DNA bağlanma bölgesini ve 738-881 aminoasit bölgesi transkripsiyon aktivatör bölgesini içerir.

Hücrelerde transkripsiyonu düzenleyen proteinlerin çoğunda DNA bağlanma bölgesi ve aktivasyon bölgeleri, işlevlerini kaybetmeksizin birbirinden ayrılabilir. Transkripsiyon aktivatörlerinin DNA'ya bağlanma ve transkripsiyon aktivasyon bölgelerinin modüler özelliği gerek memeli gerekse maya iki hibrit metotlarının temelini oluşturmaktadır. Maya GAL4 proteini, *Herpes simplex virus*'ü VP16 proteini ve *E. coli* LexA proteininin DNA bağlanma bölgeleri ve/veya aktivasyon bölgeleri iki hibrit çalışmalarında hibrit (melez) proteinlerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Oluşturulan iki ayrı melez proteinin etkileşimlerini ölçmek için, transkripsiyon aktivatör proteinler tarafından regüle edilen belirteç (raportör) genlerden yararlanılmaktadır. Bu genler arasında en çok kullanılanları, ateşböceği *lusiferaz* geni, denizanası yeşil floresan protein (green fluorescent protein-GFP) geni ve *E. coli*  $\beta$ -galaktozidaz genidir. İki-hibrit metotları için oluşturulan iki proteinden biri transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanma bölgesi ile füzyon oluşturup ekspres olurken; diğer protein aktivasyon bölgesi ile birleşerek ekspres olur. Eğer bu iki protein arasında bir etkileşim olursa ilgili belirteç genin ifadesi teşvik edilir (Şekil 5). Belirteç genler, memeli iki-hibrit metotlarında olduğu gibi bir plazmit üzerinde hücrelere aktarılabilir. Mayalar için geliştirilen metotta ise, belirteç gen (ya da genler), genomun bir parçası olarak hücrelere aktarılmıştır. Maya iki hibrit metodunun en önemli avantajlarından biri, transkripsiyon aktivatörü bağlanma bölgesi ile füzyon halinde sentez edilen yem (bait) protein ile herhangi bir organizmaya ait cDNA kitaplığı üzerinden,

aktivasyon bölgesi ile füzyon halinde kodlanan binlerce proteinin olası etkileşimlerinin belirlenebilmesidir.



Şekil 5. Maya-İki-Hibrit Metodu işleyiş modeli.

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 ikili *yem* sisteminde X1 proteini LexA'nın DNA bağlanma bölgesi (BD) ile X2 proteini de lamda bakteriyofajın cI represörünün BD 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 seçici bölgeleriyle protein etkileşimi olduğunu tanımlamak için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Klasik maya-iki-hibrit sistemi GAL4'ten farklı diğerk DNA bağlanma proteinlerinin (örneğin, *E. coli* represör proteini olan LexA'nın BD), transkripsiyonel aktivatörlerin (örneğin *Herpes simplex virus*'ün 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 seçici 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 metottur. Bu etkileşimler biyokimyasal olarak tespit edilemeyebilir; fakat kompleks biyolojik sistemlerin tam fonksiyonunu tespit etmek için önemli olabilir. Bununla birlikte, iki-hibrit sistemi *in vivoda* gerçekleştirildiği için proteinler doğal konformasyonlarına çok benzerdir. Bu metot 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 toplanıp yerleşen proteinler gibi neredeyse bütün hücresel proteomun etkileşimini çalışabilmek için kullanılabilir.

### 1.8. Çalışmanın Amacı

*Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV), önemli bazı tarım zararlısı böcekleri enfekte edebilen ve hücre kültüründe kolaylıkla büyüeyebilen bir Entomopoksvirüstür. Bu virüs, gen ekspresyon vektörü, gen terapi vektörü ve insan virüslerinin mekanizmalarının anlaşılmasında çalışılabilecek model virüs olmasının yanında, muhtemel biyopestisit materyali olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Protein kinazların literatürde bilinen rollerine dayanarak, AMEV protein kinazlarının da (AMV153 ve AMV197) bu veya benzeri görevleri yerine getirebileceği ve her iki protein kinazın şelale mekanizmasıyla görevlerini yerine getirirken birbirleriyle veya virüse ait diğerk genlerin ürünleriyle etkileştiği hipotezi kurulmuştur.

Bu hipotezi araştırmak için yaptığımız bu tez çalışmasının amacı, *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) protein kinazlarının (AMV153 ve AMV197 ORF'lerinin ürünleri) birbirleri ve diğerk virüs proteinleriyle etkileşimlerini belirlemektir. Böylece, etkileştikleri viral protein veya proteinlere göre, her bir viral protein kinazın görevi hakkında bilgiler elde



edilmiş olacaktır. Protein-protein etkileşimlerini belirlemede en etkili yöntem olan maya-iki-hibrit sistemi kullanılarak gerçekleştirilen bu tezde, AMV153 ve AMV197 kodlu genlerin ürünlerinin, birbirleriyle ve yaban tip AMEV'e ait tüm ORF'ler ile etkileşimleri araştırılmıştır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Virüs ve Hücre

*Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) (Roberts ve Granados, 1968) ve *Lymantria dispar* hücre kültürü (Ld652) Prof Dr. Basil M. Arif (Great Lakes Forestry Centre, Sault Ste Marie, ON P6A 2E5, Canada)'den temin edildi. AMEV, *Lymantria dispar* (Ld652) hücre kültüründe çoğaltıldı (Goodwin vd., 1990). Hücreler 28 °C'de, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma, Kat No: F-0643) ihtiva eden besiyeride (%45 Grace's Insect Medium-GIBCO; %45 Excell420, SAFC-Biosciences) büyütüldü.

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

### 2.2. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Ld652 hücreleri hemositometre ile sayıldı.  $1 \times 10^7$  hücre/ml T-75 kültür kabına aktarıldı. Kültür kapları hücrelerin tabana tutunmaları için etüvde 2 saat bekletildi. Hücre başına düşen enfeksiyon yapan virüs sayısı (MOI): 0,1 olacak şekilde hücreler enfekte edildi ve 5 gün sonunda hücreler besi ortamı ile birlikte toplandı. Hücreler ve virüsler 1000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre dışı virüsleri içeren süpernatant 4 °C'de muhafaza edildi. Virüs konsantrasyonu TCID<sub>50</sub> metodu (Reed ve Muench, 1938) ile belirlendi.

### 2.3. Primer Tasarımı

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 bölgesini içeren proteinler hücrenin membranında yerleşeceklerinden nükleusa geçemezler ve membranda proteinlerin fazlaca birikmesi de hücrede toksik etkiye sebep olur. Bu sebeple Y2H sisteminde genlerin yapılarında bulunan transmembran bölgeleri çıkartıldıktan sonra ifade edilmeleri gerekir.

Virüse ait protein kinaz genlerinin (AMV153 ve AMV197) birbirleriyle ve virüsün diğer genleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesini amaçlayan bu çalışma kapsamında, bütün genlerin öncelikle transmembran bölgeleri ve sinyal peptit varlığı araştırıldı. Bunun için SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ve TMHMM yazılımı

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) kullanıldı. Transmembran ve sinyal peptid bölgeleri içeren genlerin bu kısımları çıkartıldıktan sonra primerler tasarlandı. Primerler, 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 hazırlandı. Bölgeler çıkarıldıktan sonra 100 nükleotitten az kalan ORF'ler için primer tasarlanmadı.

#### **2.4. Viral DNA İzolasyonu**

T75 kültür kaplarındaki Ld652 hücreleri AMEV ile enfekte edildi. Enfekte hücreler, 28 °C'de 4 gün inkübe edildi. Hücreler 1000 x g'de 15 dakika çöktürüldü. Sıvı kısım atıldıktan sonra pellet 9 ml TE ile çözüldü. Üzerine 30 µl β-merkaptoetanol, 100 µl proteinaz K, 0,4 ml 5M NaCl ve 1 ml %10 SDS eklendi. Karışım 37 °C'de 5 saat inkübe edildi ve sonrasında gece boyu +4 °C'de saklandı. Bu süre sonunda üzerine 15 ml 1:1 oranında fenol kloroform eklendi ve 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni ependorfa aktarıldı ve fenol kloroform uzaklaştırılmış oldu. Bu işlem iki kere tekrar edildi. Bundan sonraki işlemlere buz üzerinde devam edildi. Üst fazın üzerine 1/10 hacminde 3M NaOAc (pH 7) eklendi ve son hacmin 2,5 katı kadar da %100 EtOH eklenip karıştırıldı. DNA'nın çökmesi için -20 °C'de 1 saat bekletildi. 16000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Pellet 5 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan pellet, 200 µl dH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve +4 °C'de 1 gece beklettikten sonra homojenizasyon için karıştırıldı.

#### **2.5. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması**

Petride büyütülmüş *E. coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden 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 ulaşınca hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti soğuk %10'luk gliserolde çözüldü ve 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 kullanılmaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

### 2.6. *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e ait Protein Kinaz ve Diğer Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması ve Ara Vektör pJET 1-2'ye Klonlanması

AMEV'e ait 230 gen ve 2 protein kinaz geni olmak üzere toplam 232 gen doğrulama aktivitesi bulunan Phusion DNA polimeraz (Finnzymes) kullanılarak PCR ile uygun koşullarda çoğaltıldı.

PCR Karışımı	PCR Koşulları
1 µl AMEV DNA'sı	98 °C'de 30''
1,5 µl Fw (10 mM)	
1,5 µl Rv (10 mM)	98 °C'de 10''
1 µl dNTP (10 mM)	55-65 °C'de 30''
3 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	72 °C'de 1'
10 µl Tampon (2x)	
0,5 µl Taq DNA polimeraz	72 °C'de 10'
36 µl ddH <sub>2</sub> O	8 °C'de ∞

} 35 döngü

PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapıldı ve uygun büyüklüğe sahip DNA bantları agaroz jelden temizlendi. Konsantrasyonları ölçüldü ve klonlanacak gen ve vektör oranı 1:3 olacak şekilde CloneJET™ PCR Klonlama Kiti (Fermentas) kullanılarak genlerin pJET1.2 vektörüne ligasyonu yapıldı. Ligasyon ürünlerinin kompetent *E. coli* DH10β hücrelerine transformasyonu sağlandı. Koloni PCR ile rekombinant klonlar analiz edildi. Bunun için PCR reaksiyonu toplamda son hacim 20 µl olacak şekilde kuruldu.

5X Green Go-Taq tamponu	: 4 µl
10 mM dNTP	: 0,4 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	: 1,2 µl
pJET1.2' ye özgü ileri ve geri primerler	: 0,8 µl
dH <sub>2</sub> O	: 12,6 µl
Taq-DNA polimeraz	: 0,1 µl

Karışıma transformasyondan sonra oluşan koloniler kürdanla aktarıldıktan sonra seçici besiyerine inoküle edildi. Koloni PCR ile klonlanan geni içerdiği belirlenen birer tane klon *Bgl*III enzimi ile kesilerek doğruluğu teyit edildi.

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

Klonlanan genleri içerdiği doğrulanan pJET 1.2 vektörler Tablo 3’de belirtilen herbir gen için uygun enzimler ile kesildi ve kesilen DNA’ler 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 µg 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 U alkalın fosfataz ilave edildi. Kesim reaksiyonundan sonra klonlanacak gen ve vektörler kit (Nucleospin Gel and PCR cleanup, REF740609.50) kullanılarak jelden temizlendi. Konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü. Vektör:klonlanacak gen oranı 1:5 olacak şekilde ligasyon ve transformasyonları yapıldı. Ligasyonda kullanılacak klonlanacak gen nanogram miktarı şu formül ile tespit edildi: (Reaksiyonda kullanılacak vektör nanogram miktarı x 5) / (vektör baz çifti uzunluğu / klonlanacak gen baz çifti uzunluğu). Ligasyon reaksiyonu için: 50 ng vektör DNA, hesaplanan ng klonlanacak gen DNA, son hacmin yarısı kadar 2X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz, 1 µl 10 mM ATP ve dH<sub>2</sub>O kullanıldı. Ligasyon ürünü +4 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra elektrotransformasyonla hücrelere aktarıldı. Oluşan klonlardan klonlanan geni içerenleri bulmak için her petriden 4-10 koloni gene özgü geri ve plazmidde özgü ileri primerlerle yukarıda belirtilen koloni PCR reaksiyonu kurularak analiz edildi. PCR sonucu pozitif çıkan kolonilerden plazmid DNA’ları izole edildi ve uygun restriksiyon endonükleazlarla doğruluğu belirlendi. Doğruluğu belirlenen klonlar DNA dizi analizine gönderildi.

### **2.8. Kompetent Maya Hücrelerinin Hazırlanması**

Muhafaza edilen (-80 °C) maya hücreleri (AH109 suşu) YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; 20 gr Difco Pepton, 10 g yeast extract, 950 ml dH<sub>2</sub>O, pH: 6,5, otoklavdan sonra 50 ml steril %40 dekstroz 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. Maya hücreleri 30 °C de 16-18 saat, OD<sub>600</sub>>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. Yine 30 °C de 3 saat, absorbansı (OD<sub>600</sub>) 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 dH<sub>2</sub>O (toplam 25-50 ml) ile yıkandı ve bir tüpte birleştirilerek yeniden santrifüj edildi. Hücre çökeltisi yeni hazırlanmış 1X TE/1X LiAc (8 ml dH<sub>2</sub>O, 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 Protein Kinaz Genlerini 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.

Klonlanacak geni içeren her bir pGBK-T7 vektörü (*bait*, *yem* vektörler) 100 ng olacak şekilde ependorf 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<sub>600</sub>>1,5 olacak şekilde büyütüldü. Bölüm 2.8.'de belirtilen şekilde kompetent hücre hazırlandı.

Klonlanacak geni içeren pGADT7 vektörleri teker teker 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 protein kinaz genleri içermeyen pGAD-T7 vektörü *yem* plazmidleri içeren maya hücrelerine transform edildi.

### **2.11. *Yem* Vektörleri İçeren (AMV153 ve AMV197) 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 aşılandı. Hücre yoğunluğu, absorbansı OD<sub>600</sub> 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 dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. 1000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti sıvı azot içinde hızlıca donduruldu ve -80 °C'de muhafaza edildi. Hücrelerin OD<sub>600</sub> üniteleri (Absorbans x 50 ml) hesaplandı. Her 7,5 OD<sub>600</sub> 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-merkaptotanol, 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. *Yem* Proteinlerin 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 (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 antikoru (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 dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak, reaksiyon durduruldu.

### **2.13. Tespit Edilen Etkileşimlerin Teyit Edilmesi**

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 metotlardan 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 genlerin maya hücreleri dışında etkileşimlerinin doğruluğunu teyit etmek için biyokimyasal bir yöntem olan GST-pull down analizi yapılmıştır. Bu çalışmayı gerçekleştirmek için AMV026, AMV035, AMV040, AMV062, AMV063, AMV069, AMV083, AMV120, AMV162, AMV165 ve AMV230 genlerinin pGEX-2T vektörüne ve



AMV153 ve AMV197 genlerinin pET28a vektörüne klonlanması sağlandı. *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. Öncelikle, genlerin transmembran ve sinyal peptid bölgeleri delesyona uğratıldıktan sonra vektörlere uygun enzim kesim bölgelerini içeren genlere özgü primerler tasarlandı. Genler doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimiyle PCR da çoğaltıldı ve CloneJET™ PCR Klonlama Kiti (Fermentas) kullanılarak pJET 1.2 ara vektörüne klonlandı.

### 2.13.1. Etkileşen Protein Genlerinin pGEX-2T Vektörüne Klonlanması

GST-pull down analizi için AMV026, AMV035, AMV040, AMV062, AMV063, AMV069, AMV083, AMV120, AMV162, AMV165 ve AMV230 genleri 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. Genleri 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:klonlanacak gen oranı 1:3 olacak şekilde bölüm 2.7'de açıklandığı gibi ligasyon reaksiyonu kuruldu.

### 2.13.2. AMV153 ve AMV197 Genlerinin pET28a Vektörüne Klonlanması

AMV153 ve AMV197 genleri N-terminali HA (hemaglutinin) kuyruk içerecek şekilde bakteriyel sistemde ifade edildi. Bunun için AMV153 ve AMV197 genlerini çoğaltmak amacıyla kullanılacak geri primere, HA kuyruk sırası (*AGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA*) ilave edildi. Doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimiyle genler çoğaltıldı ve pJET1.2 ara vektörüne klonlandı. Daha sonra AMV153 ve AMV197 genlerini içeren pJET1.2 ve pET28a vektörü *Bam*HI ve *Sac*I enzim kesim bölgeleriyle Bölüm 2.7'de belirtildiği gibi kesildi ve klonlanacak gen:vektör oranı 1:3 olacak şekilde ligasyon reaksiyonu kuruldu.

### 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 indüklemeye önce azda olsa ifade edilmesi pLysS vektörü varlığında engellenmektedir. Böylece yalnızca indüklemeye sonra ifade edilecek genin transkripsiyonu gerçekleşir. 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

Genlerin ifade edilebilmesi için, genlerin füzyon halinde bulunduğu vektörler elektrokompotent hale getirilen *E. coli* BL21 hücrelerine elektroporator cihazı (BioRad) kullanılarak transform edildi. 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. Etkileşen Proteinlerin Bakteriyel Sistemde 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 dH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve sonikasyon işlemi ile patlatıldı. 13.200 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı (çözünabilir proteinler) ve çökelti (çözünemeyen proteinler) ayrı ayrı %12'lik SDS-PAGE'de yürütüldü.

### 2.13.6. Etkileşen Proteinlerin GST-Pull Down Analizi

Genleri 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. pGEX-2T vektörüne klonlanan (AMV026, AMV035, AMV040, AMV062, AMV063, AMV069, AMV083, AMV120, AMV162, AMV165 ve AMV230) ve pET28a vektörüne klonlanan (AMV153 ve AMV197) genler tarafından üretilen hücrelerin çözünebilir kısımları, her protein kinaz için ayrı ayrı olmak üzere, 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 kromatografi 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. Kromatografi 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 pH 8) 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. Etkileşen Proteinlerin Western Blot Hibridizasyonu**

GST kuyruk ile saflaştırılan proteinler ile birlikte AMV153 ve AMV197 proteinlerinin de saflaştığını görüntüleyebilmek için HA kuyruğuna özgü antikorlarla Western blot hibridizasyon analizi yapıldı. Bölüm 2.12'deki metotlar uygulandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyon Tayini

Yapılan çalışmalar için, yaban tip *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) *Lymantria dispar* böceğinden geliştirilmiş Ld652 hücre kültürü kullanılmıştır. Hücreler, 28 °C'ye ayarlanmış etüvde, %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma, Kat No: F-0643) katkılı besiyeride (%45 Grace's Insect Medium, GIBCO, Kat No: 11605-045; %45 Excell™ 420, Biosciences, Kat No: 14420C) özel hücre kültürü kapları (Corning) içerisinde büyütülmektedir. Çalışmada kullanılan yaban tip virüsün çoğaltılması için konak olarak Ld652 hücre kültürü kullanıldı (Becker vd., 2004). Hücreler AMEV ile büyük ölçekli hücre kültürü kaplarında (75 cm<sup>2</sup>'lik flasklar) enfekte edildi ve enfekte edilmiş hücreler 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildi. Enfeksiyon sonucunda virüsün konsantrasyonu 7,76×10<sup>8</sup> pfu/ml olarak belirlendi ve DNA izolasyonu için kullanılmak üzere +4°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

#### 3.2. Primerlerin Tasarımı

Bu çalışma kapsamında AMEV'e ait ORF'lerin dizileri SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ve TMHMM yazılımıyla analiz (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) edilerek transmembran bölge ve sinyal peptidi içerip içermedikleri belirlendi. Bu analizler sonucu 69 genin transmembran bölgesine, 12 genin sinyal peptide ve 7 genin ise hem transmembran bölgesine hem de sinyal peptide sahip olduğu belirlendi. Transmembran bölgeleri ve sinyal dizileri belirlendikten sonra genlerin bu bölgeler dışında kalan yerlerini çoğaltmak için uygun primer dizileri oluşturuldu (Tablo 3). Genlerden bu bölgeler dışındaki kısımları 100 nükleotitten küçük olan 13 gen, çalışma dışı bırakılarak kalan 230 gen için primer tasarımı tamamlandı.

Tablo 3. *Amsacta moorei entomopoxvirus* 'e ait genleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri\*

ORF	Nükleotit çifti (bp)	Domain	Av vektör için ileri diziler	Av vektör için geri diziler	Çoğaltılan büyüklük(bp)
AMVITR1	1383	-	GGAATTCGAGTTACCTGTAGAAA TGTTAGAA	CGGGATCCCATAAATAATATTTGTA TTAAAATAATATAAT	-
AMVITR2	201	TM	GGAATTCATTCTTATTAATTATTC TGAATCATATAAAT	CGGGATCCCTTTAGAAAAAATTCTT AATATTTTAACTGAA	183
AMVITR3	273	-	GGAATTC AATGCTAACGAAGAT ATGTTAAATGAAA	CGGGATCCCATT TTTGTTTTGTTGAA TATAATATTTTA	-
AMVITR4	342	SP	GGAATTC CAAAGTAAGTATTTCT GTGATATATA	CGGGATCCCATACTTTATTTTTTCTA AAATACTTTTAC	339
AMVITR5	695	TM	GGAATTC AAAAAAGAAAGTAAC TATAATAATGATA	CGGGATCCCAGTACAATTTCTTATA TTATTTTTAAAC	681
AMVITR6	546	-	GGAATTCGATTTTATAAAATTAC AAGATATAGCA	CGGGATCCCTATATACTCTCTAATA CATATTTTATAA	-
AMVITR7	276	-	GGAATTCGATTCTATTAATCAA CTGATTCTAC	CGGGATCCCTTTCAATAAAAATGTT TTATACATTTGT	-
AMVITR8	1506	TM	GGAATTC AATAAATGATGAAT ATGATATTGAAA	CGGGATCCCAGTTGATTTAATAGAA TCTGGTAAG	1476
AMVITR9	207	-	GGAATTCCTGAGAATAGAATTAA AAAAAAATTATTC	CGGGATCCCTATCCATGGTCTCCAA TATCTTC	-
AMVITR10	607	TM	GGAATTC AATAAAATACAAGTTA TAGGTTTTAATA	CGGGATCCCATTATTTAATGTTAGT ATAGCATAATC	390
AMVITR11	423	TM	GGAATTCCTCAGTTAATAATATTA ATAATTATGATAA	CGGGATCCCAACAGTATCAGGCCAT AATGATTC	204
AMVITR12	513	TM	GGAATTCGACAAGTATATAATAA TAAATGGATT	CGGGATCCCATATTTTGACATTAGT CCTACTTTAT	456
AMVITR13	195	-	GGAATTC TATGGAGATGAAAAA GGAACACAA	CGGGATCCCATAAAAATCCGTATTT TTTATATAATTTA	-
AMV002	432	-	GGAATTCGAACCAATATTTAAAT ATATGTTTGTT	CGGGATCCCATTATAACCAGTAGAT CCAAAACC	-
AMV003	3107	TM, SP	GGAATTC AATTTACATACAATAA TTTCTGATTGT	CGGGATCCCAATATAATAACTTTTT TGTATATATATAAC	2316
AMV004	810	SP	GGAATTCGATACAAATTATGTAA ATATATCAAATT	CGGGATCCCTGGTATATAACCTATA AATTTTATAAC	756

Tablo 3'ün devamı

AMV005	1053	-	GGAATTCGACTTACCTACGGAAA TGTTAGA	CGGGATCCCAAGAATATAATTTGTG TTACAACAATA	-
AMV006	399	-	GGAATTCCTTTAATAATTATATTTT ATATATATATTTTC	CGGGATCCCTGAATATAATTCTACA ATTATCGGAA	-
AMV007	240	SP	GGAATTCAAATTAATAAATAATA ATATTTGTAATGAA	CGGGATCCCAATTAACATTTATTA ATACAATCTTCA	183
AMV008	300	-	GGAATTCATACCTAATAATGATT TAGATTTTATAA	CGGGATCCCTATTATTTTAATAATT ACATTAACAACAT	-
AMV010	819	-	GGAATTCGTGTTTTAATGATTATG ATATTTTATTAAA	CGGGATCCCTTCGACTGTAATTTT ATATTGTCAT	-
AMV011	456	-	GGAATTCGATAAATATATAAAA AATATATTGGAAAT	CGGGATCCCAACACATTATTAATA TTATTTAATATTTT	-
AMV013	603	-	GGAATTCATTAGATTAATATCAT TATCTAATAATAA	CGGGATCCCTTTGTCTAATGTTATTA ATAATTTTGTA	-
AMV014	1461	-	CGGGATCCTTGATTTACTAAATT CTGATATAATTTAA	CCCTCGAGAAATAATTTCTATTTCTA CATTAGTGT	-
AMV016	549	-	GGAATTCGATAGAATTAATAA TTGGTCCTA	CGGGATCCCATATGAATTATTATAA CATAATCTACAC	-
AMV017	201	-	GGAATTCCAAATAATGATAATT ATTATTCTGATA	CGGGATCCCTAAACAACAATCATAT TTTTTTAAAGAA	-
AMV018	315	-	CGGGATCCTTGATAATAATAAAC TTGAATTATTTGGT	CCCTCGAGATAAATATTTAACTTGA ATTCTCCATTG	-
AMV019	1575	-	GGAATTCGTTTATATTATATTAG ATGTCCGGAAG	CGGGATCCCTAAGAGTTTATAAAAT TCAGAAAGTTT	-
AMV020	1203	-	GGAATTC AATATAAATAAATGTA TAGAATTGGGA	CGGGATCCCAATATATTAATTTCG TAATTATAATCA	-
AMV021	795	-	GGAATTCATGGATGACATTAACT TGTATAATG	CGGGATCCCAGGATAATACACGCG AGTTAAGT	-
AMV022	579	-	GGAATTCCTTGATTTTGTTC A A AATATAAATTTAA	CGGGATCCCATACTTTTCGTTTAT CGTCATAA	-
AMV023	408	-	GGAATTCGAGAATGTTACGTTTA AAAAAATTG	CGGGATCCCATTAAGTAATAAAAAT ATTTTATCTATGT	-

Tablo 3'ün devamı

AMV024	1065	-	GGAATTCCTTTAATTGATGTGT GTTATGAAC	CCCTCGAGAATAATTATATTGTTCTT CTTTAATTTA	-
AMV025	1362	-	CGGGATCCTTTATAATAATGAAT ATTTACTAATCGTG	CCCTCGAGAAGACTTAATTACATTA TCGAAATTAT	-
AMV026	354	-	GGAATTCGTGATAAAATTAATA ATTTCAAAAAA	CGGGATCCCTATAATATTGTTTATA TAAATTAGATTTG	-
AMV027	306	-	GGAATTC AATTT CATAAATGATA ATTTTTATTTTATA	CGGGATCCCATAAAAATAATCAATT TCTTTTTTATTGT	-
AMV028	468	-	GGAATTCGACAAAATAAATATA AATACATATATTA	CGGGATCCCCAAAATAAATTTTCC ACATTATAAAAAT	-
AMV029	873	-	GGAATTC A AATTACAATTTAATG ATTTGCCTTC	CGGGATCCCTATATATAAATAATTT TTAAATTCTCTAAT	-
AMV030	435	-	GGAATTC ACTAAACCGACACAA ACATTAACA	CGGGATCCCTAATTGTAACGATAAA TTTTTTAAATAAT	-
AMV032	474	-	CGGGATCCTTGCACCACCAGTAG ATCCTGTA	CCCTCGAGATTGTTTTCTACGTCCAA CTGGAA	-
AMV033	1290	-	GGAATTCCTGAAAAATATTATAG ATTATATAAACG	CGGGATCCCTAATTTTTTATCTGTTA AGTAATATATTC	-
AMV034	393	-	GGAATTC AATCTGGAATATGATA ATAGTGGAA	CGGGATCCCTAGTATATTAAAAAA CATTCAATATAG	-
AMV035	1304	TM	GGAATTCGGAGGCAGTGTTGAC ATCGAA	CGGGATCCCTCTATAATCTTCTGATT CTCTCAAT	933
AMV037	823	SP	GGAATTCATTAATATTTGTGATG AAAATATTAAC	CGGGATCCCAATTTTTAATTTAAGA TCATATAATAAAAAT	687
AMV038	1722	-	GGAATTC AATATATATTTAAAAA ATGCATCCAATG	CGGGATCCCATATCCTCCATTTATA TTAGTTAAATC	-
AMV039	1599	-	GGAATTC AATATTAGCAAAAATT ATCCACAGTG	CGGGATCCCTCGAGGTAATACAAAA TTATATATTTT	-
AMV040	555	-	GGAATTC AAGATAGATATAAAA ATAGATGAACT	CGGGATCCCCCTCGATAAAAATAATA TTAATTTTATG	-
AMV041	642	-	GGAATTC AATAATTTATTAAGAG GATCTGTAATA	CGGGATCCCATTTATGCATATTTTTT CATTATTTGTT	-
AMV042	351	-	GGAATTCCTTAATATTAAGAAACA TCGATTATAAAA	CGGGATCCCATATTCGACAAAAGGA TTAAAATATG	-

Tablo 3'ün devamı

AMV043	204	-	GGAATTCGTTTATTTACTAGAAT ATCAGGGAA	CGGGATCCCGACTGGTGATATCATA TCCATAG	-
AMV044	1749	-	GGAATTCATATACATCACAGA TCCAATCC	CGGGATCCCACTATTTTTAACATAT GCATTATATTTA	-
AMV045	2500	TM, SP	CGGGATCCAAGATGTTAATTCAA ATTTTACAGATGT	CCCTCGAGATAATATTTAAAATTTA AGCGGAGAATC	1806
AMV047	780	-	GGAATTCCTTAAACAGATTTAA CTAATGAAGAA	CGGGATCCCATTGTGAATAAATAAT TCTACTTTAGTT	-
AMV048	1062	-	GGAATTCCTGTTACCTATACCCG ATTTAAC	CGGGATCCCATTATTTTCTCTTTCAA TTCTTTTAATT	-
AMV049	564	-	GGAATTCCTGATAAGTAGGTTAA AGTGTAATG	CGGGATCCCTGAACCACAATGAATA TAATAAATGT	-
AMV050	3318	-	GGAATTCCTTTTTAGGAACTG GTATATTTAA	CCCTCGAGATTGTGGTTCATAACTA TTTAAACATAA	-
AMV051	1050	-	GGAATTCGTTTTCGAACATAAGA TATTTTCATA	CGGGATCCCATATATATTTTTACTAT TTAAACGTTCT	-
AMV052	1205	TM	GGAATTCAAAAAAAAATATAAT AATACATAAAGAT	CGGGATCCCATTGGTTAATTCTTTTA ATTTATCTAC	996
AMV053	939	-	GGAATTCGCATCTGAACGTGCAA ATCAAAA	CGGGATCCCATCAGAATCTTCTTCT AATTCATTAG	-
AMV054	2530	TM	GGAATTCGATCAGATAGAAATA ATTAAAATATT	CGGGATCCCATATATATTTTTAACA TAAAATCTTAAAG	1463
AMV055	402	-	GGAATTCGAAAATATACTTATCA ACAATTACAC	CGGGATCCCTATTACATATTCTTTA AAAACAATAGCA	-
AMV057	1062	-	GGAATTCGAAAATATAATTATTA AATCCGATAAAT	CGGGATCCCTATATCATATTGTTCA TTTTCAATAGA	-
AMV058	831	-	GGAATTCACTTTAGTTAAACATA ATACGATGC	CGGGATCCCACAATAGATTAATTGT TTTTGTACATA	-
AMV059	1410	-	GGAATTCGTTAAATATATTAAT TAAATAAAAAAATAT	CGGGATCCCATATGAACATTTTATT TCTACACATTC	-
AMV060	888	-	GGAATTC AATTTTATGCCACAAT ATTACTATATA	CGGGATCCCATAATAACCCATTTCT TTAGATAATG	-
AMV061	768	-	GGAATTC TATTGTAAACCAATAG CATTATATC	CGGGATCCCTTAGTAGTATTTATA TACTTATCAAAA	-



Tablo 3'ün devamı

AMV062	495	-	GGAATTCGACGAATGTACTGTAA ATGAACTT	CGGGATCCCACAATAATCCTCATAT TTAAATATATG	-
AMV063	618	-	GGAATTCGGTCATAATAATTCCA AAGAAAAAC	CGGGATCCCTAAATTATAATTCATT TTTGTTAATGTAG	-
AMV064	531	-	GGAATTCGATAGCTACTACCATG AATCAAAA	CGGGATCCCTAAAAAAAATTTCTA TTTAATAAATATTTT	-
AMV066	3591	-	GGAATTC AATAATAATCCGATTG AAGAAGATAT	CGGGATCCCAGTATTAATAGTATTA TCGTCAGAAA	-
AMV067	186	-	GGAATTCCTTATCATTAGATAATG CTATTATTAATG	CGGGATCCCTCTGGCATTTCATTAGT AAAAAACC	-
AMV068	610	SP	GGAATTCGACATTGATAATAAAG ATATAAAGGA	CGGGATCCCAAACATGTTTGATAA TAATCTATAGA	501
AMV069	1047	-	GGAATTCCTCTGATAACTACAT TTATGACTAA	CGGGATCCCTATTAAACATAGATCA TTTTTTCCTAT	-
AMV070	890	TM	GGAATTC AATAAATTTTATCA AAAAAATAATATATA	CGGGATCCCTAATCTATTAATATCA AAATAATGTAATA	690
AMV071	350	TM	GGAATTCATATATGAATTAATGA GTTTTACTACT	CGGGATCCCTGATGCTAGTATTATC ATTGGTATA	249
AMV072	474	-	GGAATTC TATAAATATTATTTTCG GTTATGGAGC	CGGGATCCCTAATAAATATTCTTTA AATATATTATTTATA	-
AMV073	255	-	GGAATTCGATAACTTAGTAAAAT GGCCTACT	CGGGATCCCTATATCACAATCTTTA GAGTGAAA	-
AMV075	477	-	GGAATTCGATTTAATAAATATAT TAATTAATAAAAAAT	CGGGATCCCATAAATTTTCATATGGA TCTTTGTCG	-
AMV076	354	-	GGAATTCCTTAGAAGAAATTGATT GTATGTATTG	CGGGATCCCTTTATATTTTATATTAA TATTATTAGAATTA	-
AMV078	620	TM	GGAATTC AATATATCAAATATAA ATAATGATATATAT	CGGGATCCCTTTAATTGAAGTATA AAAAATATATTTG	423
AMV079	210	-	GGAATTCAGTGAAAATTTATATT ATGTACCAGA	CGGGATCCCCTTATAATAACCATTT CTAATAAATAAT	-
AMV080	400	TM	GGAATTCATACCACCAGGAACA AATTCATTA	CGGGATCCCCTCATTTATATTAAT AAATAATTAGTAT	309
AMV081	2163	-	GGAATTC CAAGAAATTA AAAAAT ATTTATGATTTTAA	CGGGATCCCATCTCTCATAATAATC AGTGGATTT	-

Tablo 3'ün devamı

AMV082	189	-	GGAATTCGATAATTGTGATTTAA TAAATAGTATTA	CGGGATCCCATTATATATATTATTG TTGTATGAATAAA	-
AMV083	260	TM	GGAATTCGAAGAATTAATTTTAA TATATAATAATATA	CGGGATCCCATTATATTATTATTTT TCAAAAAATTATT	234
AMV084	813	-	GGAATTCCTATATACAAATACCAG AATATAAAAAG	CGGGATCCCTTTCAATAATTTTTTCA GATCATTATAT	-
AMV085	615	-	GGAATTCGCAGCATATATAATTT TAAATATGAAA	CGGGATCCCTAAATTATTATTAACA ATAATAGAAATATA	-
AMV086	288	-	GGAATTCGAATTAATCTGATT TAATTTTTACTG	CGGGATCCCATTAAAGCTTGATATT TTATATAAAGC	-
AMV087	2181	-	GGAATTCCTCAGACGAATATATAT ATTTACAGAA	CGGGATCCCATTGTTTATCAAAA AAGTCAGGG	-
AMV088	330	-	GGAATTCGAATACTTGTGGAAGTT ACGGCG	CGGGATCCCTACTGGATAAGTCTCT ACTGTTG	-
AMV089	162	-	GGAATTCAAAAATTTGGAGA ACATATACTA	CGGGATCCCTTATCCATTCCTACA CTTGTACT	-
AMV090	792	-	GGAATTCGATTTAATAGAATACG ACAATAATCA	CGGGATCCCATTAACTAAAAAT GCGTTTCTG	-
AMV091	1071	-	GGAATTCGAAGAATTATATTCAT TAATAAACTAC	CGGGATCCCTTTCAATAAATTATTG AAATATATTTTATT	-
AMV093	789	-	GGAATTCCTCGATATAACCAAAT CTATTATATC	CGGGATCCCATTGAAATCCCAA ATATTATCATAT	-
AMV094	183	-	GGAATTCGCTAATAAGAACGTCG AAATAATAG	CGGGATCCCATTGTTTATTATATAG GTATTGACTTA	-
AMV096	1014	-	GGAATTCCTATATAAAAATTTAAAA TAGAATGTTTACG	CGGGATCCCATTATCATATTTCAAT ATTGGCATAAA	-
AMV097	189	-	GGAATTCCTAAAAGATAATAATT CTTGATATTTG	CGGGATCCCAATGTATATAAAAATTT AAAATAGAATGTT	-
AMV098	428	-	GGAATTCACGAAGATAATATTA TTAAGCATTG	CGGGATCCCCTCATTTTTTTCATCGT TATATTCT	-
AMV099	1323	-	GGAATTCGAAAAACACTATATTA ATTTAGCAAAT	CGGGATCCCTACTCTTTTAAATTTTT TATTAATATG	-
AMV100	411	-	GGAATTCCTCTTCTATAATATATG ATGAAAAATAA	CGGGATCCCATAATTTCTATTATTTT TATATATAGATAA	-

Tablo 3'ün devamı

AMV101	429	-	GGAATTCGAATGCGAAATGTGTA AAAATTACT	CGGGATCCCTTTTTCAAAAAACATA TTTTTACATTTA	-
AMV102	447	-	GGAATTCATAATTTACCTTAATG AATATAAAATTTA	CGGGATCCCATTTTTGTATATATATT TATAATCATAATA	-
AMV104	462	-	GGAATTCCTCTAACGCAGATTATG TTATAATATA	CGGGATCCCAGGTAAATTATCATAA TTAAATACTTTT	-
AMV105	2304	-	CGGGATCCTTGATATAACAGATA ATAGTTATGAATAT	CCCTCGAGAAATACTTTTTTTTGACA ATATAACAGA	-
AMV106	186	-	GGAATTCCTCAAAATATTGTTTAA AATACTTTTCTA	CGGGATCCCTATAATATCCAATATA CGAAATCCAA	-
AMV107	450	-	GGAATTCCTTATTATAAATGTGA TATGGAATAAC	CGGGATCCCATTAATATATATTCA AGATCTGGATT	-
AMV109	1353	-	CGGGATCCTTTATATACATTTTA TATTAATTTTATATAATA	CCCTCGAGAATCTTCTATTTACAAT TATGATCAG	-
AMV110	1089	-	CGGGATCCTTTCACTTAATAATA TATGTTATGAACAC	CCCTCGAGAATAATTATATTGTTCTT CTTTTAATTTA	-
AMV112	1047	-	GGAATTCCTTTAATTGATGTAT GTTATGAACA	CGGGATCCCATAATTATATTGTTCTT CTTTTAATTTAT	-
AMV114	318	-	GGAATTCCTTACCAAAATATTGGG GAAGAGG	CGGGATCCCTACATAGTTAAAAGTA TCATATGTTTT	-
AMV115	882	-	GGAATTCGATGTTAATAAATATA TATATGAATATAA	CGGGATCCCAATATATTTTTCTTTTG ATCTAAATATTT	-
AMV116	396	-	GGAATTCATTGATAAAATATTAA AAATAAGTAATAAA	CGGGATCCCCTAAGAAATTCTATC ATATAATTATAT	-
AMV117	357	-	GGAATTCCTTTATTAATGATAGTT TCCATTATAATA	CGGGATCCCTATATAATATTTATTC AAATTATTTAATATT	-
AMV118	1500	TM	GGAATTCGGTGGTAGAGTAAGT ATATCGTT	CGGGATCCCTCCCATGTTTGATTT ATTTTTATAT	1044
AMV119	1077	-	GGAATTCGGCAATCAATTAACA TTCCTATAT	CGGGATCCCCTGACAGCTCGAATA TTTTTTATA	-
AMV120	423	-	GGAATTCGAAGAAGCATTAAAT CATTCCC	CGGGATCCCTTTATTTTTTTAGAAAT TACTTAATTTTTT	-
AMV121	819	-	GGAATTCATTGACCCGTCAGATT TTTTAACA	CGGGATCCCTTTATTTGTATTACAGT TACAACAATT	-

Tablo 3'ün devamı

AMV122	1704	-	GGAATTCAAAAGAACGTTTATAC CATTTAGTAA	CGGGATCCCCTCTAGAATATGAACG GTTATAATA	-
AMV123	435	-	GGAATTCCTATGATATATGTACTA TTAAATTAATAA	CGGGATCCCAGTAATAACGATAGTT TCTATAATATC	-
AMV124	2300	TM	GGAATTCGATTACAATGAAAATT ATAATAAATATTT	CCCTCGAGATGAAGATATTATATTA ATTCTTCTAAC	1812
AMV127	432	TM	GGAATTCCTGGGAACCTCTGGTTC AGTTAG	CGGGATCCCTATATTATTATTAGAT AATATATTTAATGC	432
AMV128	890	TM, SP	GGAATTCGATATTAATTGGAAAG ATATATGTAAT	CGGGATCCCATAATATGTTTTAGTG CAAACGTTTA	552
AMV129	186	-	GGAATTCCTGTAATATTATCATGA AATTAAGCA	CGGGATCCCAATTATTTTTTCAATAT ACAATCAATAT	-
AMV130	2500	TM	GGAATTCCTTAATATATAAAATAT GTAAAAAATATATG	CGGGATCCCTGAAAATAATTGTTCT ATATTTGTATC	2160
AMV131	774	-	GGAATTCGAATTTAGAAATTTAT GGAAAATAAATA	CGGGATCCCATAATCTTCTAAATAA TAAGAAAATAATA	-
AMV132	624	-	GGAATTC AATACGCATATCATAA ATTACAATATA	CGGGATCCCATATTTTAAATATATA TTTTTATAATTATATT	-
AMV133	812	TM	GGAATTCAAAAGAAGAATATAC GAAATATTAATG	CGGGATCCCAATTTCTAAATATTTT AGATTATCAATAT	780
AMV134	1608	-	GGAATTC AATAAAGAAGAAGCT CAAGAATATTT	CGGGATCCCTATATCTACTGTTTCTA TATCATCGTC	-
AMV135	2619	-	GGAATTCCTCTATCGACGTTTCTG ATATTATTA	CGGGATCCCTTTACAAGATGAATAA ACAAAAGTATA	-
AMV137	580	TM	GGAATTC TATTATAATATTTTCAT ATTTACCAGAAT	CGGGATCCCAACATTTCTAATGGAA TTATATAAATTT	576
AMV138	963	-	GGAATTC CATGTATCAAATTAG TTGAAGATAA	CGGGATCCCGAAATTAACATAATTA CCAATTATTTTA	-
AMV139	3450	-	GGAATTCAGAAATAATAAAGAA AAGTATATGAATC	CGGGATCCCACATGTATCAAACACA CTATCATA	-
AMV140	933	-	GGAATTC ACTGAACAACAAATTA CTGAACAAA	CGGGATCCCTTTATTATTATCAGATT TTTCTTTTAAAT	-
AMV141	1300	TM	CGGGATCC TTTTATCTATTATGC CATATTATCAAGT	CCCTCGAGATTCAGTAATTATTTTA GCAGGATTAT	1278

Tablo 3'ün devamı

AMV143	270	TM	GGAATTCAAACTATTTAAATTTT TTTTGAAAAAATAT	CGGGATCCCCTGAATAGTATTTATA AATATAGAATTA	255
AMV145	546	-	GGAATTCAAATCAAATTTAATTA ATTTAATTGATATA	CGGGATCCCTATGGGTTTACATCTT CTATAATCA	-
AMV147	2007	-	GGAATTC AATGTTTTT GAAATGG ATAGTATAAAT	CGGGATCCCATAATATCTTCTCAGT GGTAACATA	-
AMV150	723	-	CGGGATCCTTTCCGAATTCGATT ATGATAAACTG	CCCTCGAGAATTTAGTATATGAGAT TTAATCACGG	-
AMV151	654	-	GGAATTCACAGATACTACAAC TG ACGTGG	CGGGATCCCACGTGTCAAATACTA CTTAACAAT	-
AMV153	912	TM	GGAATTCAGTAATATTGAAATAT ATGATATGTTTTG	CGGGATCCCATCTAACCAATAATTA AATAATCCAG	888
AMV156	3712	TM	CGGGATCCTTTATATTATTTTAT ATACATATTTGACATT	CCCTCGAGAATTATTGGTTAGATTA AATTTATTTTTTA	3468
AMV157	512	TM	GGAATTCGAAGATCTATATATTA ATGATTCATTG	CGGGATCCCATATGACATATTAGTC AATATTCCAT	465
AMV159	920	TM, SP	CGGGATCCTTAAATTTAAATTTA ATAATAAATATATTTGTA	CCCTCGAGATTATATAAGTATATTTT TTATTATTTACAA	508
AMV160	520	TM	GGAATTCGACATAGAATTATGTT TATATTTAAATA	CGGGATCCCTGTATATTTTTTATTAT AATCATTAAATATA	374
AMV162	486	-	GGAATTCATAATATTATCTATTG ATATTGGTGTA	CGGGATCCCTATTATTTGAATAGAT TCAATTATAATAT	-
AMV163	210	TM	GGAATTCGAATATTTAAATGAAA TTTTGATGGAT	CGGGATCCCTTTTATTATATGTAAT AATTTTTTCATATA	117
AMV164	220	TM	GGAATTC AATAACAATGTTTT TAGCAAATAATG	CGGGATCCCATTAGTAATTATAATA TCTTCTTCAGT	153
AMV165	650	TM	GGAATTCGATGATATATATGGAA TAAATACAAAT	CGGGATCCCATAAAATTTAGTTATT TTTTTTTTATATATT	534
AMV166	708	-	GGAATTCCTCGACGTCGATTATG ATGATG	CGGGATCCCTAAATTTTCATAATCA TAATTTGTTATAA	-
AMV167	241	-	CGGGATCCTTCAAATATTCATTA AAACATTAACAGG	CCCTCGAGAATAATTTATATTCGTT CACCTCTA	-

Tablo 3'ün devamı

AMV168	450	TM	GGAATTCATTATATATTATTAT ATACGCATAATC	CGGGATCCCTTCTTTATTTTCTGTTT CTATTTTATC	310
AMV169	250	TM	GGAATTCCTATGAATCATATAATA AATATAAAGAAG	CGGGATCCCTTCTACGTTGGCTTTTA ATTTATCA	126
AMV170	1590	-	GGAATTCGAAGAAGATTTTGATT TAATATCTAAA	CGGGATCCCCTAAATAAAAATGTTT AAATATGTATTTT	-
AMV172	339	-	GGAATTCGAAAAACAACATA GTATGTATGTA	CGGGATCCCATTAAACATTATACTA TCTAAAAATGA	-
AMV173	1317	-	GGAATTCCTATTATAGCAATCATA ATTTATTAATAG	CGGGATCCCGTTAGATTGTGAATTT TTATATATATG	-
AMV174	2007	-	GGAATTCATAAAGTTATATTAG ATGATTTGAGA	CGGGATCCCCAATCTAACTGATAAT AGATGATTAT	-
AMV175	1035	-	GGAATTCGAAAATATACTTATTA AAGATTCTACA	CGGGATCCCTATATCATATTGTTCA TTTTCAATAGA	-
AMV177	1077	-	GGAATTCGAAAATATACTTATTA AGTCTAATAATT	CGGGATCCCTATATCATATTGTTCA TTTTCAATAGA	-
AMV179	245	-	GGAATTCGGCATAAAATATTTAT ATAATAATTTATT	CGGGATCCCTTTTCGTTAATTTTTTT ATTTATAATTCC	-
AMV180	489	-	GGAATTCGAAGATATATTAAGTA AATATGAATTAA	CGGGATCCCGAAATTAATATTTTCA ATAAAATTATATAT	-
AMV181	1389	-	GGAATTCATAAATAAAATTAGA AGATTTCCAAATA	CGGGATCCCAATATTAGATTCTAAA CTATTCTTCTC	-
AMV183	810	TM	GGAATTCCTTGTGTTAATATAG ATTTTTAATAAAA	CGGGATCCCTGGATTTATGACAAAA AGTGTTC	600
AMV184	240	TM	GGAATTCCTTAGTGATTACTA AATATTATGGA	CGGGATCCCTGCTATTATAACTAAT GTGAGATTAA	123
AMV185	231	-	GGAATTCCTTCATCAAAAAAAAA ATAATCTTGG	CGGGATCCCTTTTTTTTTTTTGGCTTT TAGGTATAATT	-
AMV186	420	TM	GGAATTCCTATGCCGAAAATTACG AATATATATT	CGGGATCCCTGATGTATTGGCCATC AATAATCT	354
AMV187	3006	-	GGAATTCAGTAACGTACCTTTAG CAACCAA	CGGGATCCCGCATCCTGCATCACAT TTTGATG	-
AMV191	320	TM	GGAATTCGTGAACAACACGTATA CGAAAATA	CGGGATCCCTGCATCGGCACAATT GTCATAA	138

Tablo 3'ün devamı

AMV192	1941	-	GGAATTCCTTGCATTAGATTCTA TTGTTGGTA	CGGGATCCCTTCATAATAATCATCT GCTATATATAT	-
AMV193	420	TM	GGAATTCATAATAATAAAAAATT ATATACAATATATG	CGGGATCCCTATTAACCTAAGATGT TTCATAATTTTA	324
AMV194	1500	TM	GGAATTC AATCATAATATTA AAAA TCGAAAATAATAA	CGGGATCCCATATTTTAAAATAATA TTATTAATATAGAC	1413
AMV195	2100	TM	GGAATTC AAAAAAAAAATATGAA GAAGAAGAAATAG	CGGGATCCCTAACAATATATATCTA ACGCCATTAT	1830
AMV197	894	-	CGGGATCCTTGACGAAACAATA AATTTTAATAATAAAT	CCCTCGAGATTTACAAAAACTAAT TTATCATTTAAAT	
AMV199	1593	-	GGAATTC AATCATATTA AAAAAA TTTTAAAAATAAAAA	CGGGATCCCATACTTTATATTTAAA GCGTTTAAAATA	-
AMV200	681	-	GGAATTCCTCCGATATTACTATAT ATCAATCAG	CGGGATCCCTTCCAAGCTGACTTT ATTTATTTA	-
AMV201	440	TM	GGAATTCGATTCTAATGTTATAG AAATAAAAAAAG	CGGGATCCCAAATGTTATAAGAGAC ATTATTAACAA	339
AMV203	225	-	GGAATTCGCAGATTTTATTTTGG ATATGGATTA	CGGGATCCCTT TAGATAATAATTTA GACTTTACTTCG	-
AMV205	681	-	CGGGATCCTTAGCGATAATATAA AATGTAAATATTGT	CCCTCGAGAAATAATATTACGCAA CATATATTATTT	-
AMV206	459	-	GGAATTCGATAAATATATATTAA CGAATAAATTATA	CGGGATCCCTTGATTAATATAGTTT TTTTCATATGC	-
AMV207	1425	-	GGAATTCATTGAAATATTAATTT TTATAATAAAAAATAA	CGGGATCCCATAAAGTTATTGTTAAT TTTTTATCATTAT	-
AMV209	1386	-	GGAATTC AATTCTATAAATTATA ATAATTTTACAATT	CGGGATCCCATATATTATCGTTAAT TTTTTATCATTAT	-
AMV210	1383	-	GGAATTC AATGATATCGATAAAA ATAATATATTTAAA	CGGGATCCCAATATTCCTTTTATTAT TTGGTATGTA	-
AMV211	317	-	GGAATTCGTATGGTATTTTAGTA TAAACGGAT	CGGGATCCCTTCATCGTGGTTATAT TTAACAAATG	-
AMV212	849	-	GGAATTCGATGCAGATATATTAT TTCTAAATAAT	CGGGATCCCTTTTCTAATAATATTGT GTTTCAGATAT	-
AMV213	204	-	GGAATTCGAGAAACAAAATATT AGTAAAGAATTA	CGGGATCCCAAATAGTATTTTCTA CAAACCTTTTGA	-

Tablo 3'ün devamı

AMV214	1209	-	GGAATTC AAGATAATAAATTCCA TAATTGATTCT	CGGGATCCCATCATTATTATTTTCTA AATTTAAATATG	-
AMV216	2100	TM, SP	GGAATTC TTTTATATGTGATAAAC AAAGTTCAGA	CGGGATCCCAAAAACCTACCAAAG CTAATATTTTC	1429
AMV217	260	TM	GGAATTC GAGCGTCCGCAAGT ATTAATA	CGGGATCCCTTCTTGT TTTTGTTC AAGTTAAATT	255
AMV218	276	-	GGAATTC GAGAATATAAATAATT ATATCGGGG	CGGGATCCCTTTTAATATTTTATATT TAATACAATGTAA	-
AMV219	894	-	GGAATTC TCATATTGGATTAATA AATCAATATGT	CGGGATCCCAAATAAATATATGCTT TCGCTCAAAT	-
AMV221	3900	-	CGGGATC CTTACAAC TTTTAAAT ATACTTTGTTAGAT	CCCTCGAGAGAAATTTTCAATTATT TCACTTGTTAT	-
AMV224	567	-	GGAATTC GATAAATATATAAAAT TTAAAGAATTAATT	CGGGATCCCTACTGAAAAAATATTT TTCTTATGTTTC	-
AMV225	552	-	GGAATTC AATAAAAAATATCAAT ATTTGGGTTTTA	CGGGATCCCATTA AAAAGATATATTA TTATCATAATACA	-
AMV226	489	-	GGAATTC GATAAGCATAATAATA ATATTTTTTATTT	CGGGATCCCATTAATTATTTTAGCT ATATTATTAATAG	-
AMV228	477	-	GGAATTC GAAAGAAGTTTACAA ATTATAAATAATA	CGGGATCCCTCCATTTACTTGAGTA TTTATGTAAT	-
AMV229	223	-	GGAATTC TATATCAATAAATATA AAATTATTTCAAAA	CGGGATCCCATTAATTATTTATATAT TTATACATATTACA	-
AMV230	534	-	GGAATTC GACAATAATACAATTA CTAAACATATT	CGGGATCCCTATTTCTTCGTCTTGCA AAATACC	-
AMV231	729	-	GGAATTC AATAACATTTTCATATA AAAATTTTATCG	CCCTCGAGAATTATTTTTATTAATT CAGATAACCAA	-
AMV232	420	TM	GGAATTC TTAAGTAATTATGAAA ATGATAATAAAAT	CGGGATCCCTGGTATGTCAAATGAC GTAAATTA	351
AMV233	621	-	GGAATTC GAAGTTCTTAATAAAT ATTATAGTGAT	CGGGATCCCAATATCAGAATGATAT ACTTTAATTTTA	-
AMV234	708	-	GGAATTC GAAAATTATGATTTTA AAATTGATAAATA	CGGGATCCCTATGTTTTTATTTATTA AATGTAATATATT	-
AMV234	672	-	GGAATTC CTGATTAATTGTATGA GTAATATTAATT	CGGGATCCCATTAATAAATATAT GATTTTTTTTTATTA	-



Tablo 3'ün devamı

AMV236	612	TM	GGAATTC <del>CC</del> ATTTAAGAAATATA TATTTTTAAATTA	CGGGAT <del>CC</del> CATTATTAATTTTTAAA TATAAATTTAATAAAT	543
AMV237	234	-	GGAATTCGAAAAAGAACAAAAT GTTGCTGATG	CGGGATCCCTCCTTGAACCTCAGTT TGTTTATC	-
AMV238	1350	TM	GGAATTCATAAATTTTATAAGCA ATCATAAAAAATTA	CGGGATCCCATTAATATTATATTCT ATAATAATATTTTTT	1263
AMV240	795	-	GGAATTCGATATATTACTAATTG CGTCTAAAC	CGGGATCCCATTAATTTTTTATTAT TATAATCTATATT	-
AMV241	213	-	GGAATTCGAAAAAGAATTAATT GAAAATATTTATAC	CGGGATCCCTGTATTAATTATTTTAT CTAATTGAGAT	-
AMV242	327	-	GGAATTC <del>TT</del> TATTGACAATTTAA ACAATAATATGT	CGGGATCCCTTTATTTATTATATTTT GTAACCTATTATT	-
AMV243	570	TM	GGAATTC <del>CA</del> ATGAATCGCAATTAC AAACCAGA	CGGGATCCCATCTATCATTTTTATAT TAAACAATAATT	564
AMV244	220	TM	GGAATTC <del>CA</del> ATCCAGTATCATTTT CATTTATTATA	CGGGATCCCTTGTAATATAGTTTTA AGTAATAAATGT	177
AMV245	473	-	GGAATTCGATATTTCTGAATATA CAAATGCTAT	CGGGATCCCTATTTTTAAATTATTTA TATTATGTGTAA	-
AMV246	468	-	GGAATTC <del>TT</del> TACCTTATAAATGGA ATAATTATTTTG	CGGGATCCCAAATATAATAAATTA TTTATATATATTTCT	-
AMV247	414	-	GGAATTC <del>CG</del> AATTGAGTATATAA ACGAAGATT	CGGGATCCCTAATAATAAATATAAA TTTAATTCCTCTG	-
AMV248	780	TM	GGAATTCGAAAATTATCATATTA TTATATTAACAAT	CGGGATCCCTGAGATTAACATTATT ATTATATAAAAAT	771
AMV249	270	TM	GGAATTCAGATTATATTTAGATA AATTAATTTTTGA	CGGGATCCCTAAAGTAAACATTAAT TCTAACAAAGC	264
AMV250	303	-	GGAATTCGATGTTAATATTTTCAG AATATGTTGA	CGGGATCCCATGTTTTAATATTATG TTTTAAAAACGT	-
AMV253	1452	-	GGAATTC <del>TT</del> TATTTTTTAAATAATA ATTATTTATTAGAAA	CGGGATCCCTTTTTCAAAAATAAAT AAATTTAAATTTTTA	-
AMV254	642	-	GGAATTCGATACTTTACCATCCG AATTATTAT	CGGGATCCCTAAAAATGATGTTTGA TTATTATCCC	-
AMV255	453	-	GGAATTC <del>CA</del> AAGCTATATGTGTTA TGACCGG	CGGGATCCCATCTTTTGCAATACCA ATAATACCA	-

Tablo 3'ün devamı

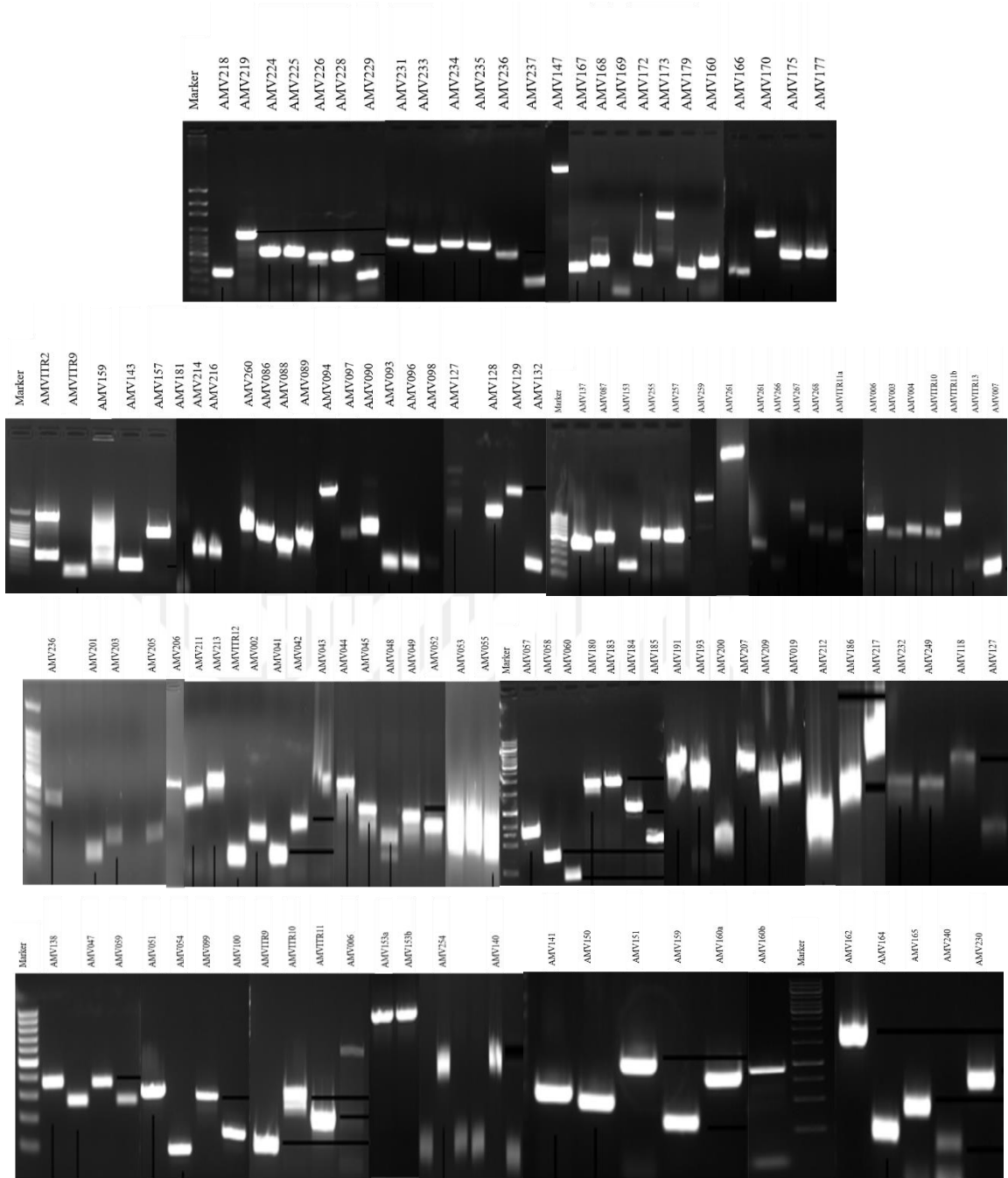
AMV256	1824	-	<b>GGAATTC</b> CAATATAAAAATTATTA AAAATGGAATGC	<b>CGGGATCC</b> CATTGAAGGTTATGTAT TTATTTAATAAT	-
AMV257	372	-	<b>GGAATTC</b> GAAAATATAATAGATT CTTTATAGATA	<b>CGGGATCC</b> CTTTTATTAATTATAT CGAATATTTTCG	-
AMV258	2400	TM, SP	<b>GGAATTC</b> GATATATAGAATGCGA AAGTATAGA	<b>CGGGATCC</b> CATAATCTTTATCTGTG TGATCGCC	2357
AMV259	423	-	<b>GGAATTC</b> GAAAGTAGTTGACGAAT TATTAATAAA	<b>CGGGATCC</b> CCTAATGATTGATATATA ATATCATTTTCTA	-
AMV260	1509	-	<b>GGAATTC</b> TTAATAGATATTAATG ATATTTTAAATAAT	<b>CGGGATCC</b> CTTTATTATTATGAAA TATTGATCATTAT	-
AMV261	440	TM, SP	<b>GGAATTC</b> AAACCAAACATATCAT TATGTTGTG	<b>CGGGATCC</b> CTTTTATTAATAAAAAT ATATTATCATCATT	414
AMV262	612	-	<b>GGAATTC</b> ACCATTATTAACAAA TATATATTTCTG	<b>CGGGATCC</b> CCTATACATTCTTCGATA CAAATTAATTG	-
AMV263	861	-	<b>GGAATTC</b> CAATATTCCGATAGAAA TATTGGAAA	<b>CGGGATCC</b> CATAAAAAAATATATAA AAATTTTATTATATT	-
AMV264	820	TM	<b>GGAATTC</b> TATTTCGATAGATAGTA TTAATATTGAT	<b>CGGGATCC</b> CATATAATTTAATATTA TTATTATTATTATT	708
AMV265	780	TM	<b>GGAATTC</b> GATTCAATTGATAAAA TTAATATTGATA	<b>CGGGATCC</b> CATATAATGTATTATTA TTGTTATTATTATT	762
AMV266	549	-	<b>GGAATTC</b> GCGAATGATAATAATT TATTTTAAATA	<b>CGGGATCC</b> CTTTATTCAAAAATCGT TTACGTTCTA	-
AMV267	147	-	<b>GGAATTC</b> CAATTATAGTATAAATA TTATTACTTTTTTA	<b>CGGGATCC</b> CTCTATGTAAACAAAAA CCAAAACTG	-
AMV268	117	-	<b>GGAATTC</b> GAGTTACCATTAGAAA TATTAGAAAT	<b>CGGGATCC</b> CTTTATTTGCCCTAATAT ATATAAGTTT	-

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

### 3.3. Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılması

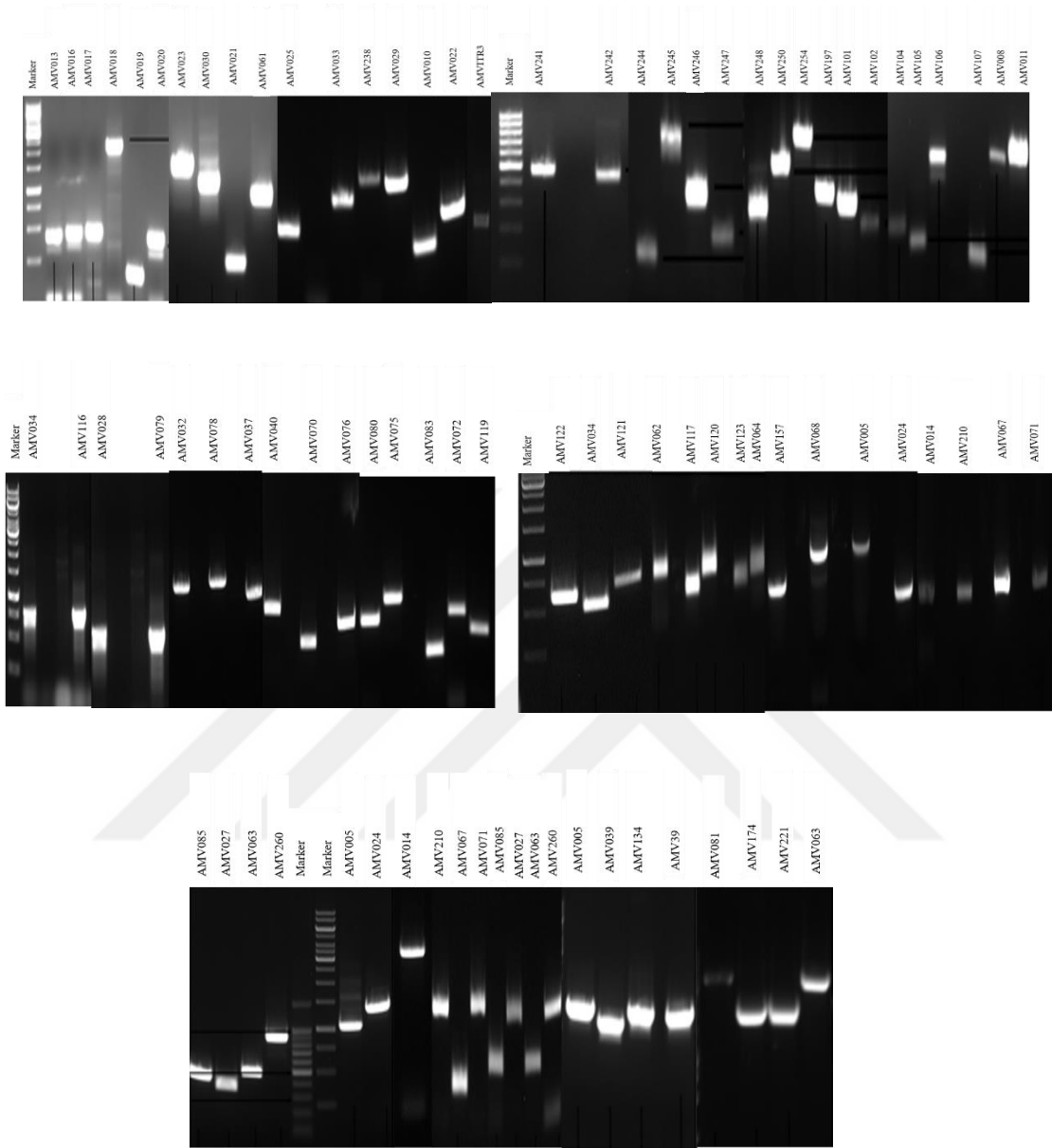
AMEV ORF'lerini PCR ile çoğaltmak için önce viral DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için Bölüm 3.1.'de anlatıldığı gibi Ld652 hücreleri yaban tip AMEV ile enfekte edildi. Böylece, Ld652 hücre kültüründe çoğaltılan AMEV'den genomik DNA izole edildi. DNA izolasyonu Bölüm 2.4. de bahsedildiği gibi yapıldı. Tablo 3'de belirtilen primerlerin temin edilmesinden sonra, bu primerler ve AMEV genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, her bir AMEV ORF'si PCR işlemiyle çoğaltıldı (şekil 6).

<u>PCR Karışımı</u>	<u>PCR Koşulları</u>	
10 ng AMEV DNA'sı	98 C'de 30''	
1,5 l Fw (10 mM)		
1,5 l Rv (10 mM)	98 C'de 10''	} 35 döngü
1 l dNTP (10 mM)	55-65 C'de 30''	
3 l MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	72 C'de 1'	
10 l Tampon (2x)		
0,5 l Taq DNA polimeraz	72 C'de 10'	
36 l ddH <sub>2</sub> O	8 C'de 	



Şekil 6. AMEV'e ait 230 ORF'nin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan zincirlerinin agaroz jel görüntüleri. Genlerin isimleri ve markır, resimlerin üstünde gösterilmektedir. İşaretsiz şekillerde kullanılan markırlar 100 bp'lik ve 1 kb'lik markırlardır (Fermentas). 100 bp'lik markır için en alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir. 1 kb'lik markır için ise en alttan sırasıyla 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.

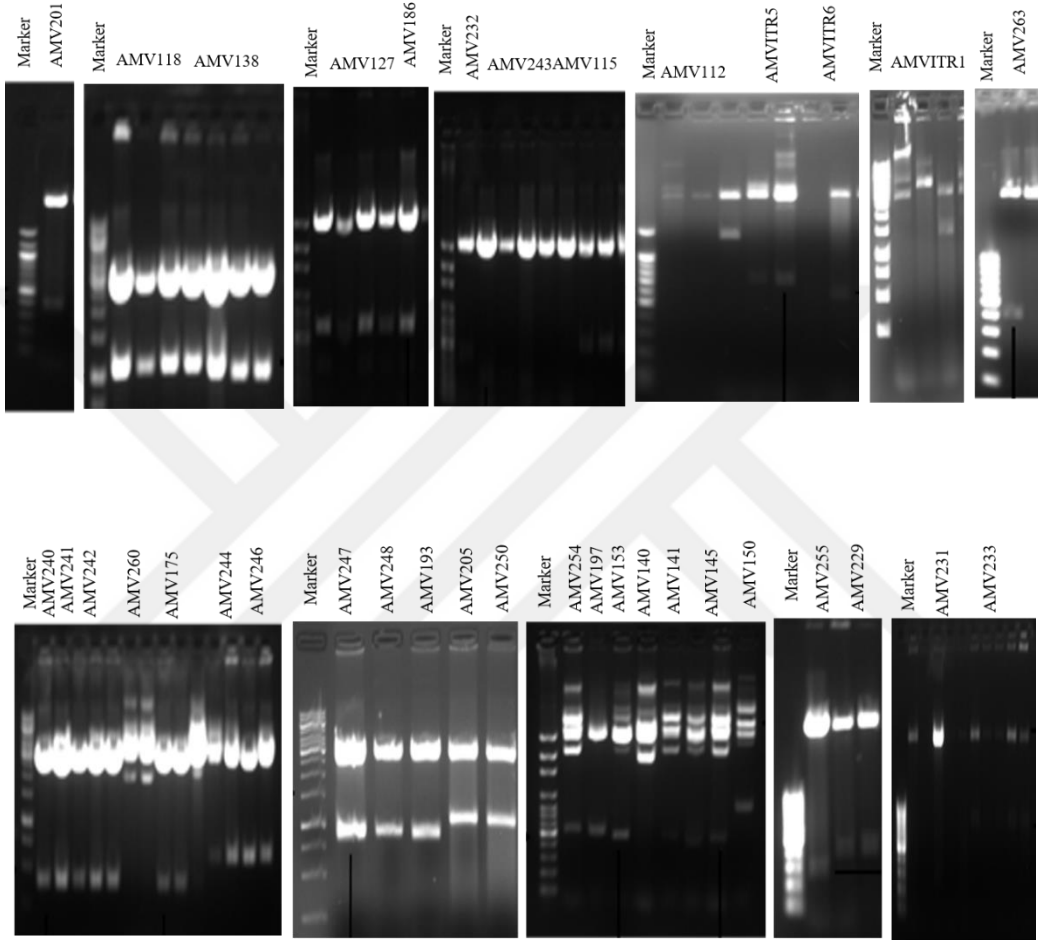
Şekil 6'nın devamı



### 3.4. Genlerin Transfer Vektörüne Klonlanmaları

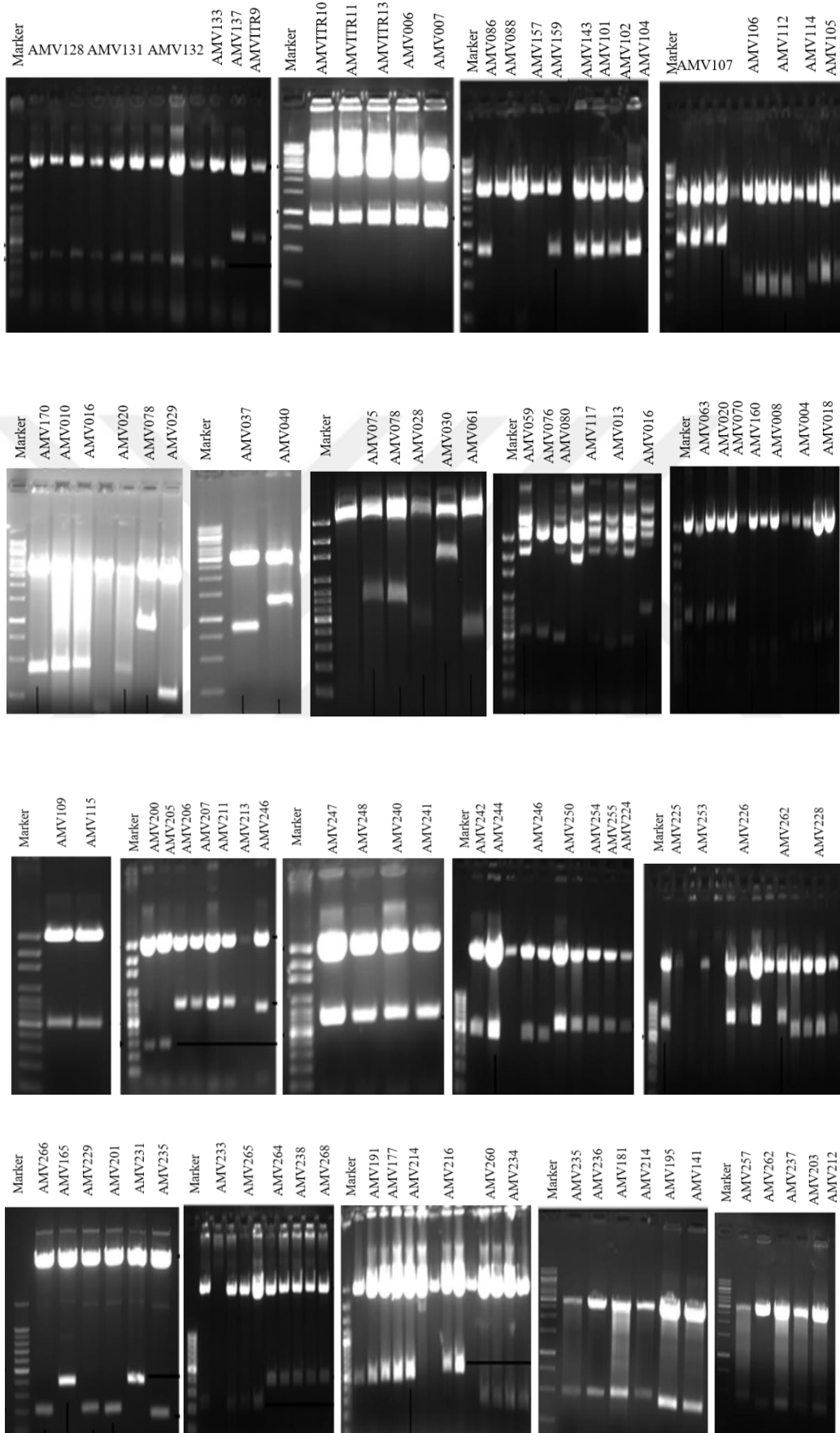
Oluşan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Elektroforez sonucunda, AMV ORF'lerine ait DNA parçaları jelde görüntülendi. Jel üzerinde sadece işaretli bant jelden kesildi (Şekil ). Kesilen parça, uygun ticari kit kullanılarak temizlendi ve temizlenen DNA'nın Clonjet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) vektörüne ligasyonu yapıldı. Ligasyon ürünü, soğuk  $\text{CaCl}_2$  yöntemiyle *E. coli* JM101 alt türüne aktarıldı ve transform hücreleri içeren petripler gece boyu 37 °C'de inkübasyondan sonra,

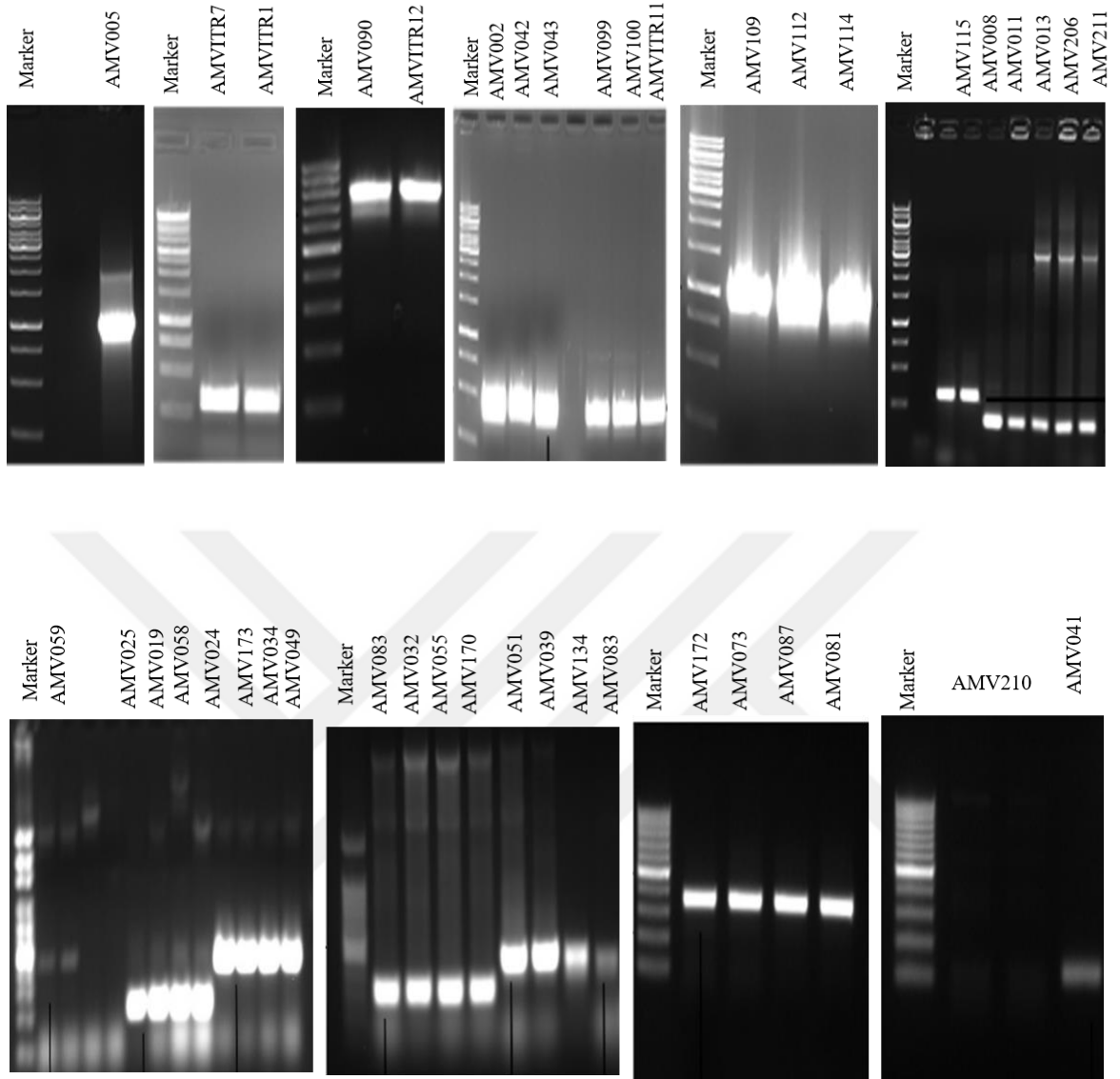
bireysel kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve istenen AMEV ORF'sine ait PCR ürününün vektörde olduğunu onaylamak için, restriksiyon enzimleriyle kesim yapılarak doğrulama çalışması yapıldı. Bazı genler ise PCR yapılarak doğrulama yapıldı (Şekil 7-8).



Şekil 7. Genlerin ara vektöre klonlanması. Restriksiyon enzimi (*Bgl* II) ile kesim yapılarak doğrulama yapıldı. Genlerin isimleri ve markır, resimlerin üstünde gösterilmektedir. İşaretsiz şekillerde kullanılan markırlar 100 bp'lik ve 1 kb'lik markırlardır (Fermentas). 100 bp'lik markır için en alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir. 1 kb'lik markır için ise en alttan sırası ile 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.

Şekil 7'nin devamı

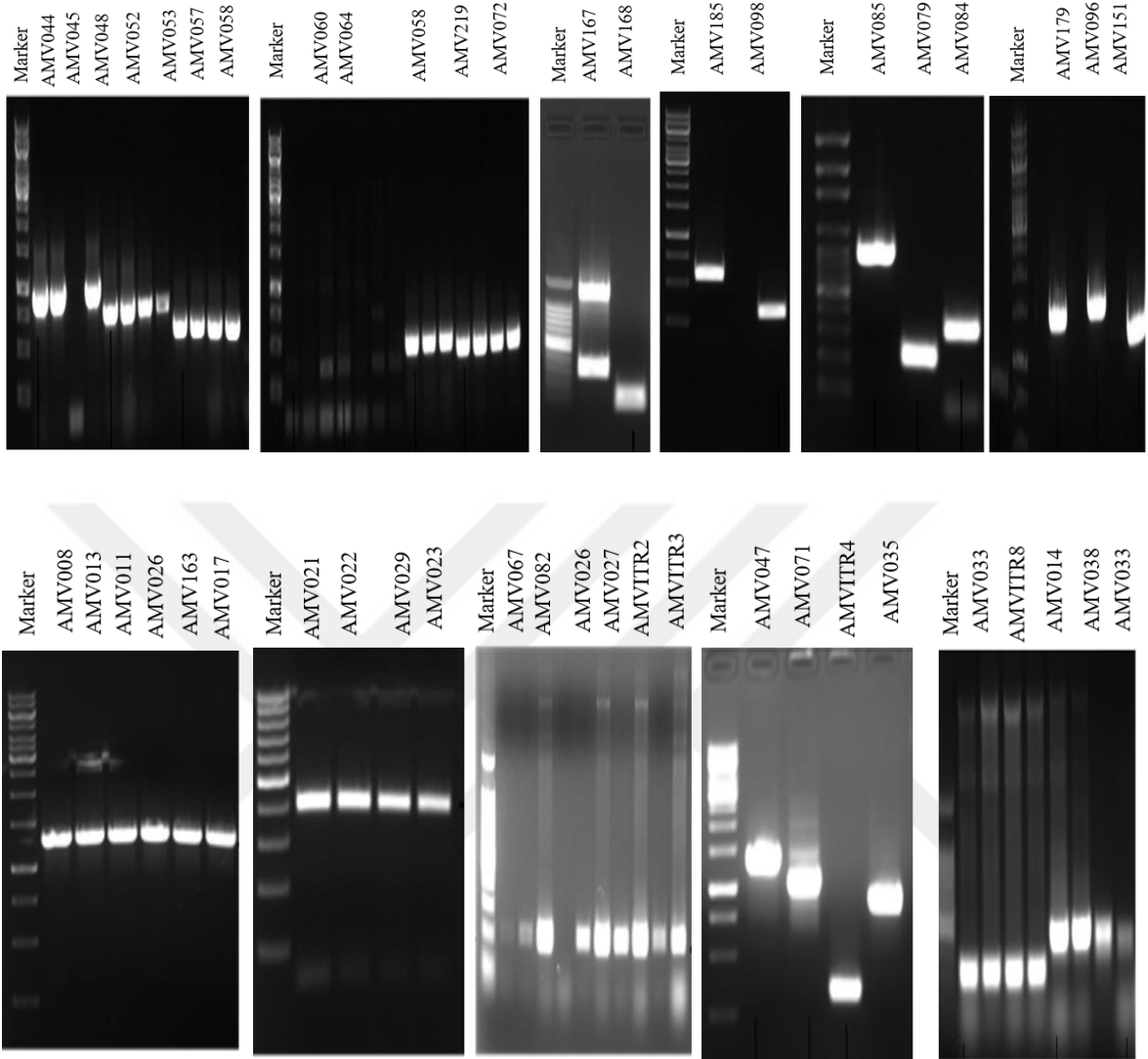




Şekil 8. Genlerin ara vektöre klonlanması. Koloni PCR yapılarak doğrulama yapıldı. Genlerin isimleri ve markır, resimlerin üstünde gösterilmektedir. İşaretsiz şekillerde kullanılan markırlar 100 bp'lik ve 1 kb'lik markırlardır (Fermentas). 100 bp'lik markır için en alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir. 1 kb'lik markır için ise en alttan sırasıyla 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

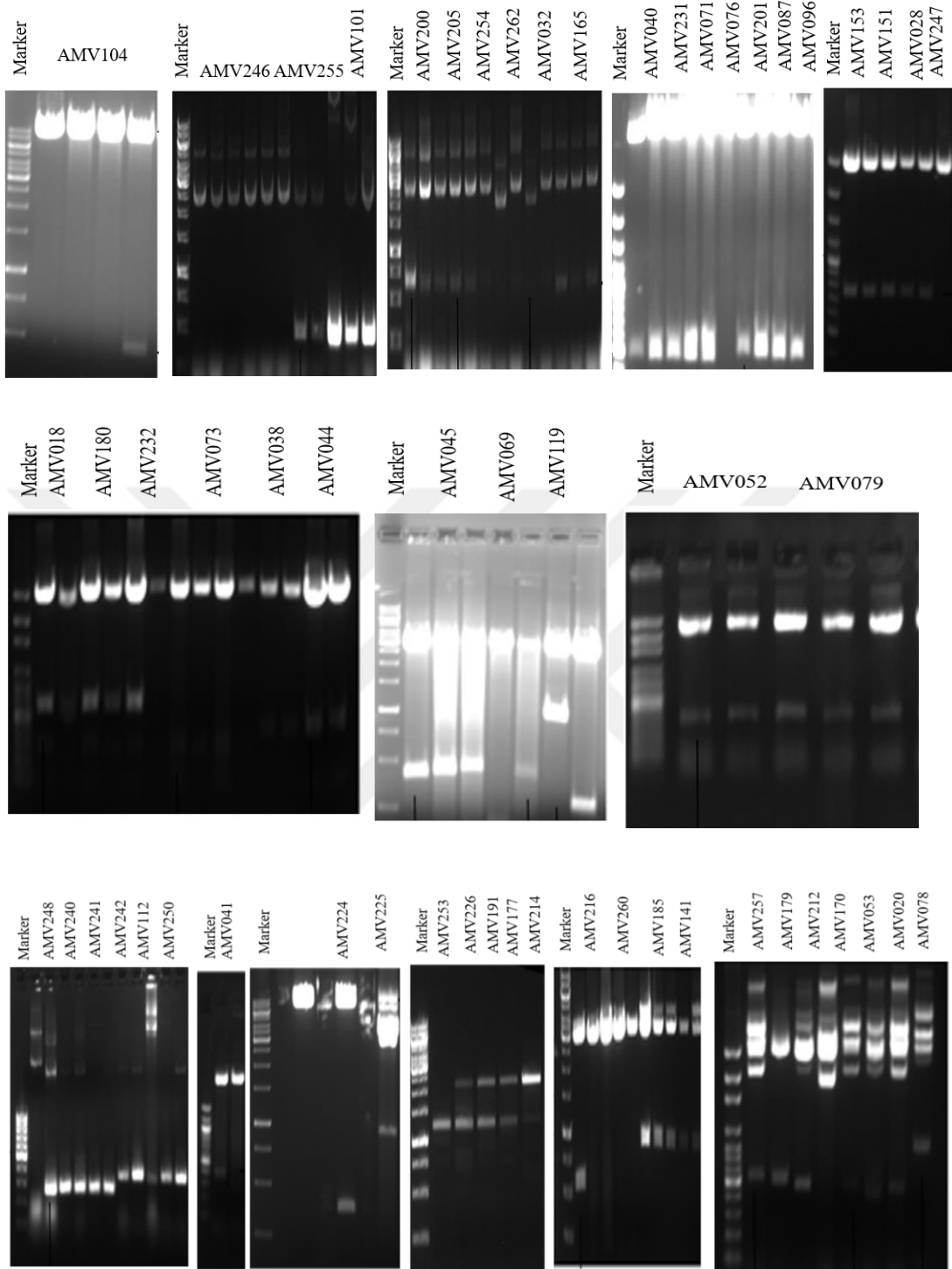


Şekil 8'in devamı

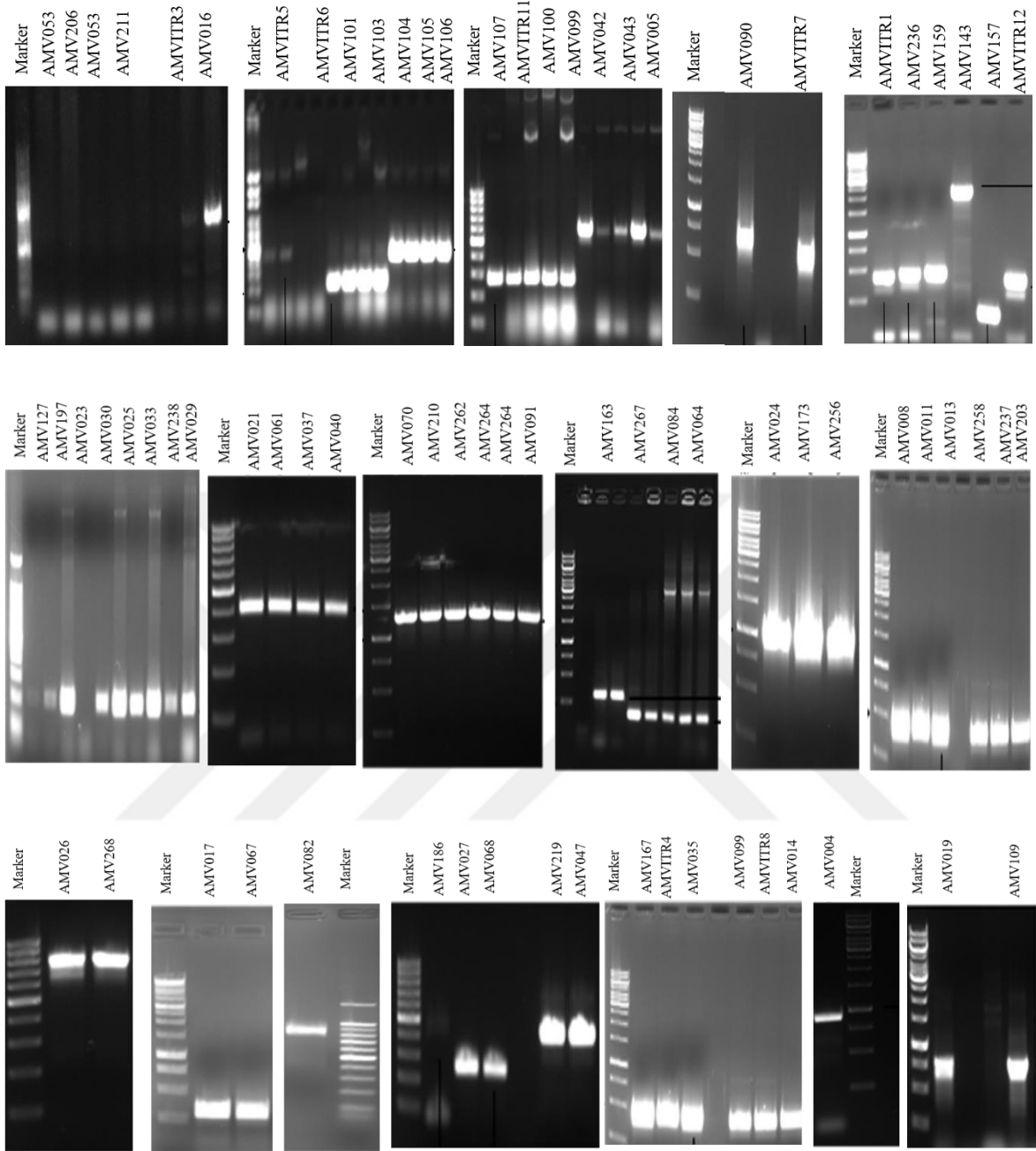


### 3.5. Genlerin *Av* Vektörlerine Klonlanmaları

pJET1.2 ara vektöründe bulunan 230 gen uygun kesim bölgeleri kullanılarak pGAD-T7 vektörüne klonlandı (Şekil 9-10).

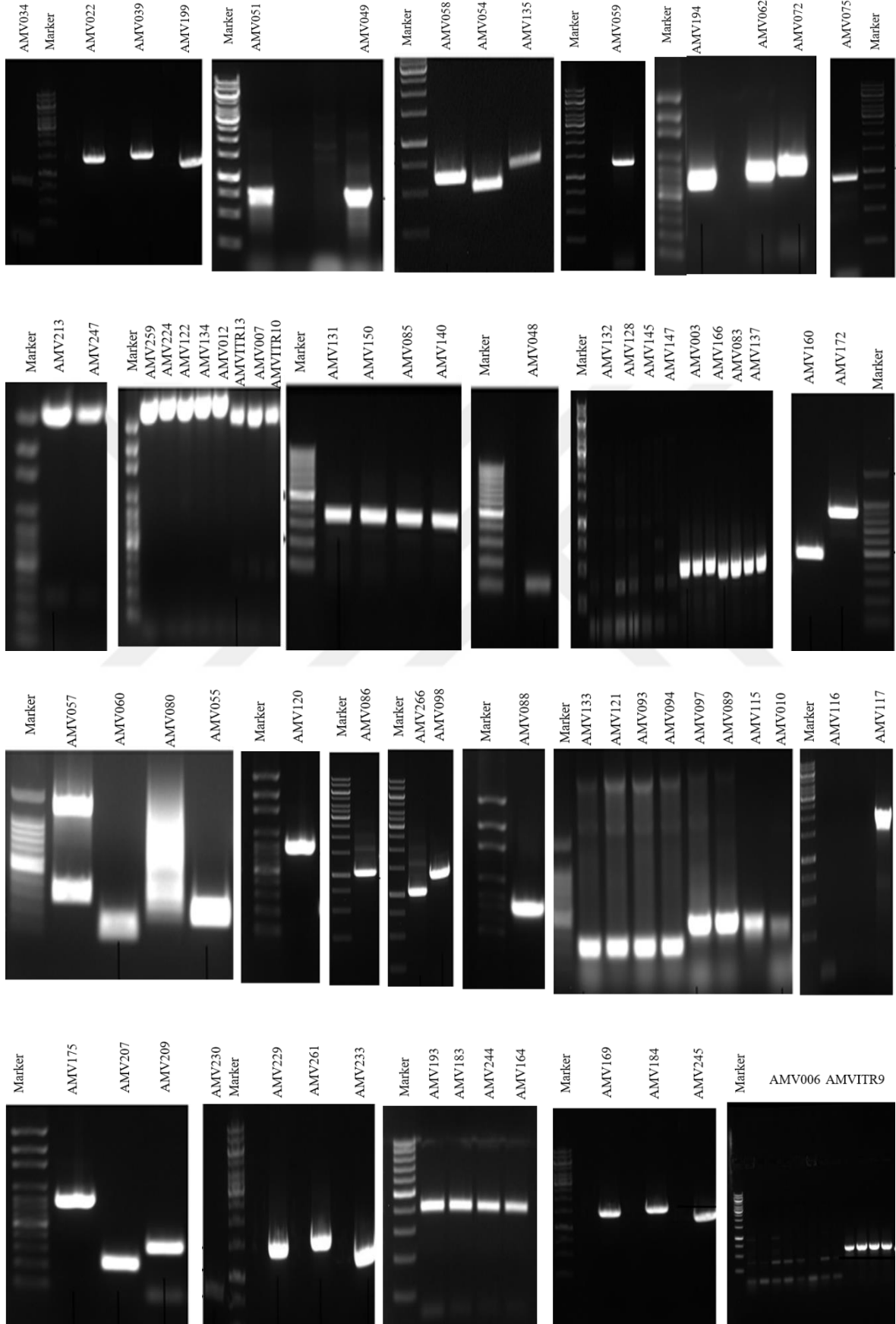


Şekil 9. Genlerin av vektöre klonlanması. Restriksiyon enzimleri (*EcoRI* ve *BamHI*) ile kesim yapılarak doğrulama yapıldı. Genlerin isimleri ve markır, resimlerin üstünde gösterilmektedir. İşaretsiz şekillerde kullanılan markırlar 100 bp'lik ve 1 kb'lik markırlardır (Fermentas). 100 bp'lik markır için en alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir. 1 kb'lik markır için ise en alttan sırasıyla 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



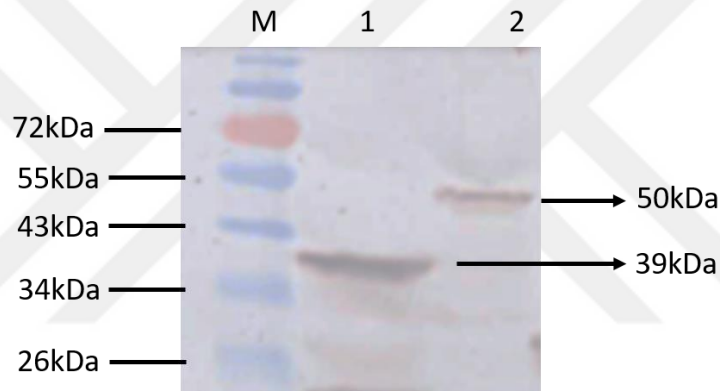
Şekil 10. Genlerin av vektöre klonlanması. Koloni PCR yapılarak doğrulama yapıldı. Genlerin isimleri ve markır, resimlerin üstünde gösterilmektedir. İşaretsiz şekillerde kullanılan markırlar 100 bp'lik ve 1 kb'lik markırlardır (Fermentas). 100 bp'lik markır için en alttan sırası ile bantların büyüklükleri 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000bp' dir. 1 kb'lik markır için ise en alttan sırasıyla 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

Şekil 10'un devamı



### 3.6. Yem Vektörlerine Klonlanan Protein Kinaz Genlerinin Maya Hücrelerinde İfade Edilmeleri

pGBK-T7 vektörü *yem* genlerin klonlandığı vektördür. *ADHI* promotörü altında ifade edilen genler, DNA bağlanma bölgesi ve c-Myc kuyruğu ile füzyon olacak şekilde ifade edilirler. AMEV'e ait 2 protein kinaz geni öncelikle *yem* vektöre ayrı ayrı klonlandı. AH109 maya suşuna transformasyonları sağlandı. Her bir geni içeren maya hücresinden protein örnekleri hazırlandı. c-Myc Antikoru ile western blot hibridizasyon analizi yapıldı. 2 genin de maya hücrelerinde ifade edildikleri tespit edildi (Şekil 11).



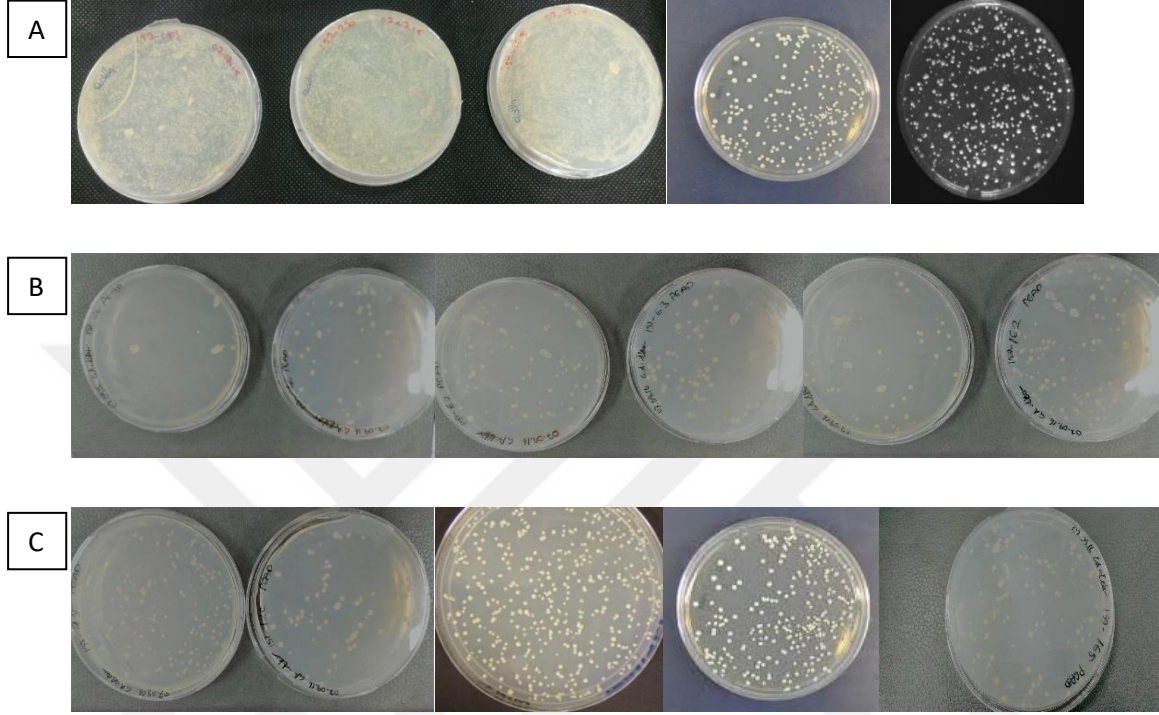
Şekil 11. Protein kinaz genlerinin maya hücrelerinde ifade edilmeleri sonucu western blot hibridizasyonu ile doğrulanması. M: Pre-stained protein marker, 1: AMV197, 2: AMV153

Genlerin maya hücrelerinde ifade edildiklerinin doğrulanmasından sonra maya-iki-hibrit sistemi ile proteinler arasındaki etkileşimler araştırılmaya çalışıldı.

### 3.7. Maya-İki-Hibrit Sistemi ile Etkileşimlerin Belirlenmesi

Protein kinazları ifade ettiği tespit edilen maya hücrelerinden kompetent hücreler hazırlandı. Her bir protein kinaz proteini içeren kompetent maya hücresine, hazırlanan 230 *av* vektör 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 12).



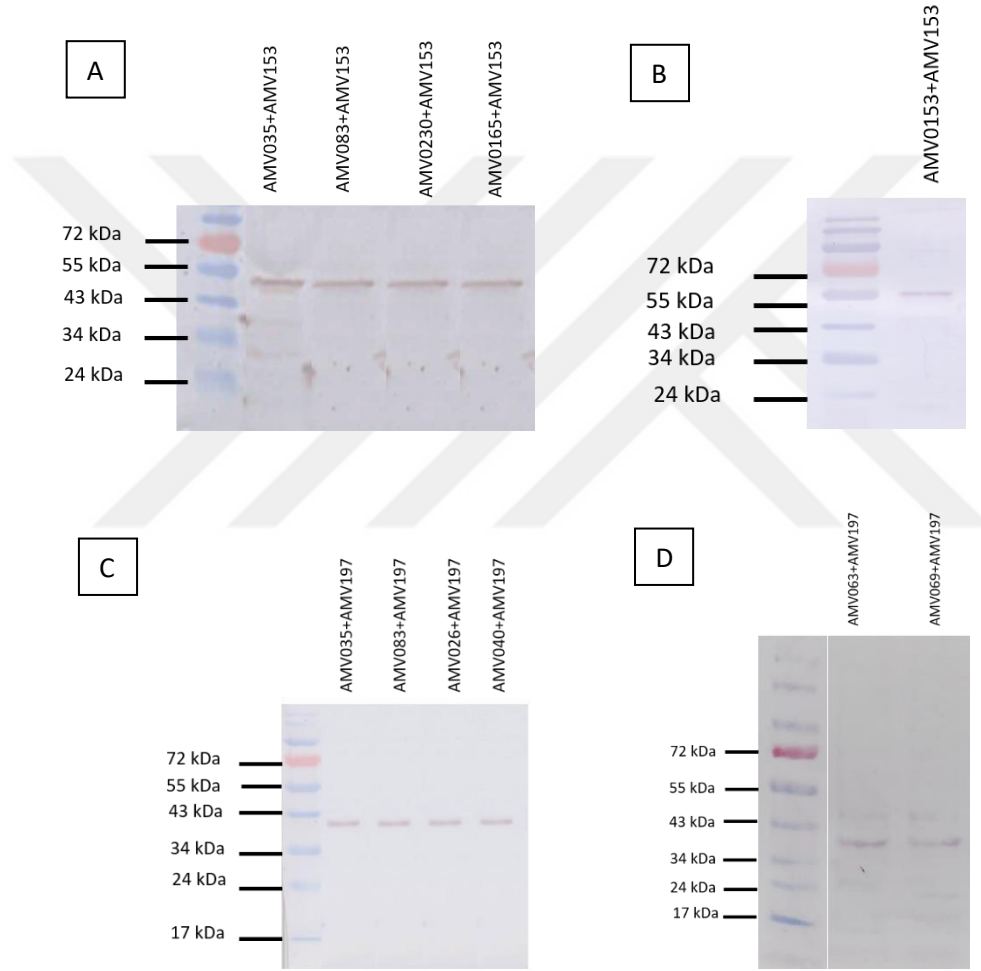
Şekil 12. Etkileşim oluşturan maya kolonileri. Pozitif etkileşim gösteren maya hücrelerinin adenin, histidin, lösin ve triptofan aminoasitlerini içermeyen seçici besiyeri üzerinde oluşturduğu koloniler, her bir etkileşim için ayrı ayrı tespit edildi. A: AMV153'ün etkileşim gösterdiği AMV153, AMV120, AMV230, AMV035 ve AMV083 maya kolonileri, B: AMV197'nin etkileşim gösterdiği AMV026, AMV040, AMV063, AMV069, AMV120 ve AMV165 maya kolonileri. C: AMV197'nin etkileşim gösterdiği AMV62, AMV230, AMV165, AMV35 ve AMV83 maya kolonileri

Pozitif etkileşim belirlenen transformasyonlar, ikişer kere daha tekrarlandı. Elde edilen bütün etkileşimler Şekil 13'de gösterildiği gibi özetlenmiştir.

### 3.8. Pull-Down Analizi ile Doğrulama

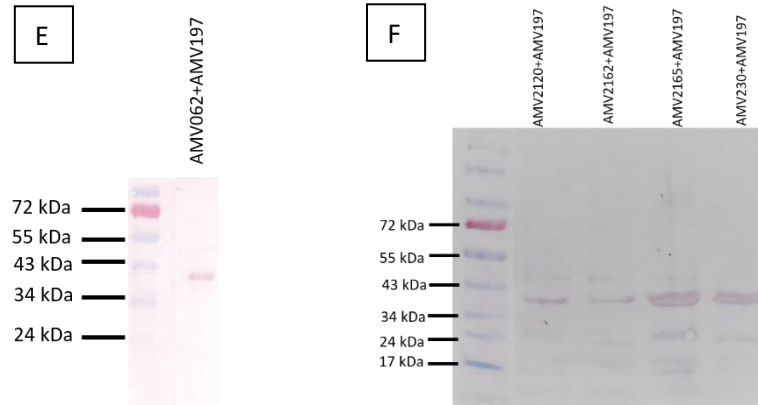
Tespit edilen bu etkileşimlerden için pull-down analizi çalışmaları yapıldı. pGEX-2T vektörüne klonlanan genler GST kuyruk ile ifade edilirken pET28a vektörüne klonlanan

protein kinazlar 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 antikorlar kullanılarak Western blot hibridizasyon analizi yapıldı. Sonuçta GST kuyruk ile saflaştırılan proteinler ile birlikte HA-kuyruk ile ifade edilen proteinlerin de saflaştırıldığı tespit edildi (Şekil 13).

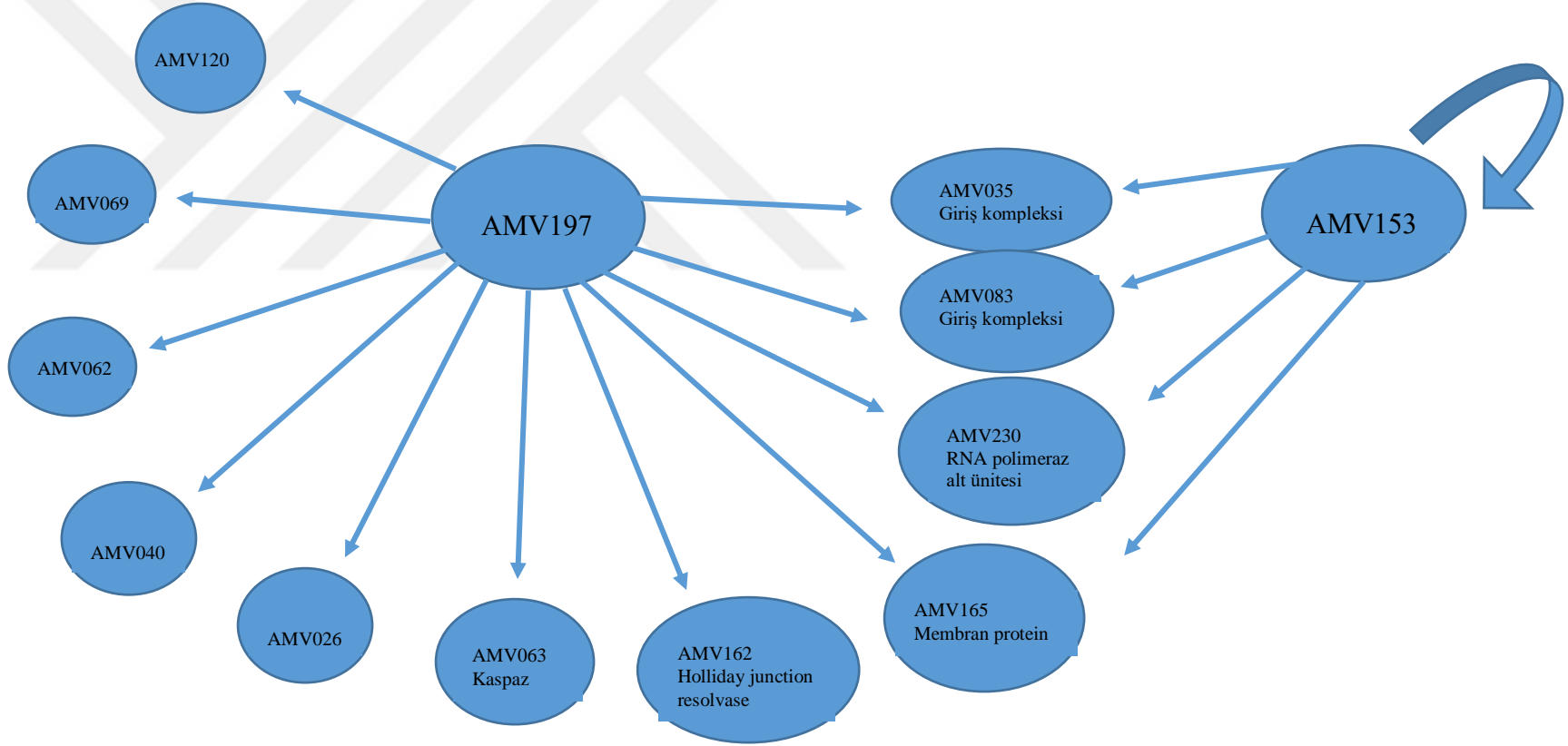


Şekil 13. Genlerin pull down analizi. A: AMV035, AMV083, AMV230 ve AMV165’in AMV153 ile pull down analizi sonucu western blot analizi. B: AMV153’ün AMV153 ile pull down analizi sonucu western blot analizi. C: AMV035, AMV083, AMV026 ve AMV040’ın AMV197 ile pull down analizi sonucu western blot analizi. D: AMV063 ve AMV069’un AMV197 ile pull down analizi sonucu western blot analizi. E: AMV062’nin AMV197 ile pull down analizi sonucu western blot analizi. F: AMV120, AMV162, AMV165 ve AMV230’un AMV197 ile pull down analizi sonucu western blot analizi

Şekil 13'ün devamı







Şekil 14. Maya-iki-hibrit sistemi ile AMEV protein kinaz proteinlerinin birbirileriyle ve virüsün diğer proteinleriyle belirlenen protein etkileşimleri.

#### 4. TARTIŞMA

Poksvirüslere ait bir çok enzime, örneğin DNA-bağımlı RNA polimeraza (Baroudy ve Moss, 1980; Shchelkunov vd., 1993), poli (A) polimeraza (Moss vd., 1975), mRNA guaniltransferaza ve mRNA metil transferaza (Martin vd., 1975; Barbosa ve Moss, 1978) dair çok çeşitli bilgiler olmasına rağmen, protein kinazlara ait bilgiler sınırlıdır. Poksvirüs protein kinazlarıyla ilgili ilk çalışmalar, vaksinya virüs B1R (Rempel ve Traktman, 1992; Lin vd., 1992) ve F10L (Lin ve Broyles, 1994) protein kinazlarına aittir. Bu çalışmaları, diğer poksvirüs protein kinazlarıyla (Fowlpox virüs (FWPV-*pk*, Poxviridae; Afonso vd., 2000), Myxoma virüs (MYXV-*pk*, Poxviridae; Cameron vd., 1999), *Molluscum contagiosum* virüs alt tip 1 (MOCV1-*pk*, Poxviridae; Senkevich vd., 1996), Variola majör virüs (VARV-*pk*, Poxviridae; Massung vd., 1993)) ilgili çalışmalar takip etmiştir. Diğer yandan, yapılan bir çalışmada, *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV)'ün AMV197 kodlu açık okuma zincirine ait genin, protein kinaz motifleri tespit edilmiştir (Muratoğlu, 2010). Ayrıca, transkripsiyon zamanı ve transkripsiyon sınıfı ile genin 5'/3' uçlarındaki proteine dönüşmeyen bölgelerinin sırası belirlenmiştir. Gen bakımından kusurlu virüs üretilmiş (*AmΔpk/gfp*) ve bu genin yaban tip virüsün replikasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Muratoğlu, 2010).

AMEV genomunda, biyoinformatik analizlere göre protein kodladığı bilinen 254 ORF'den, AMV153 ve AMV197 kodlu açık okuma sıralarının, serin/treonin protein kinaz fonksiyonuna sahip proteinleri kodlayan genlere benzer oldukları bilinmektedir (Bawden vd., 2000). Daha önce yapılan çalışmalarda, EPV protein kinazlarının etkileşim mekanizmalarıyla ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Diğer virüslere ait protein kinazlarda olduğu gibi, böcek virüslerine ait protein kinazlar da birçok çalışmaya (*Choristoneura fumiferana* granulovirus (*ChfuGV*) (Giannopoulos vd., 2005), *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (*LdNPV*) (Bischoff ve Slavicek, 1994) ve *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (*AcNPV*) (Reilly ve Gaurino, 1994)) konu olmuştur. Bu çalışmalarda, genlerin dizi analizi yapılmış, transkripsiyon zamanı belirlenmiş ve fosforilleştiği substrat yelpazesi tespit edilmiştir. Ancak, bu genlerin görevleriyle ilgili çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu çalışmada öncelikle AMEV genomunda bulunan protein kinazların birbirleriyle ve virüsün diğer proteinleriyle olan ilişkilerini tespit etmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda bu protein ilişkilerini tespit etmek için maya iki hibrit (Y2H) sistemi kullanılmıştır. Büyük

ölçekli Y2H analizleri, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum* ve *Helicobacter pylori* gibi birçok organizmanın etkileşim halindeki proteinlerini tanımlamak için uygulanmaktadır (Rain vd., 2001; Li vd., 2004; LaCount vd., 2005; Ito vd., 2001; Giot vd., 2003). Böcek patojeni ve ticari biyolojik mücadele preparatları mevcut virüs ailesi olarak bilinen bakulovirüslerden *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirüs (HearNPV) için yapılan Y2H çalışmasında, potansiyel ODV (Koruyucu proteine gömülü virüs) proteinleri arasında, 22 protein-protein etkileşimi belirlenmiştir (Peng vd., 2010). Bu çalışmayla birlikte, 45 viral protein ve beş konak proteini olmak üzere toplam 68 protein-protein etkileşimi belirlenmiştir. Bu araştırma, ODV oluşumu ve virüsün ağızdan alınması halinde böceğin enfeksiyon mekanizmalarına ışık tutacaktır.

Maya-iki-hibrid metodu, doğal olarak ortaya çıkan proteaz (PR) monomerleri bakımından farklı bazı HIV (Human Immunodeficiency Virus) mutantlarının çalışılmasında kullanılmıştır. Bu mutasyon bir AIDS hastasından elde edilmiştir ve dimer oluşturan PR monomerlerin ara yüz değişimi mevcuttur. Memeli hücre kültüründe dominant-negatif (D-N) etki gösteren hasarlı proteaz monomerlerinin etkileşim yeteneği, Y2H deneyi sayesinde test edilmiştir. HIV PR dimer ara yüz bölgesinin yakınında ve üzerinde mutasyonlar olan monomerlerin, yaban tip virüse ait monomerlerle etkileşip etkileşmediği araştırılmış ve elde edilen bulgulara göre D-N inhibitörlerinin, klinik açıdan önemli antiviraller olabileceği varsayılmıştır (Todd vd., 2000). Virüs-konak protein-protein etkileşimlerini belirlemek için yapılan bu tarz çalışmalar sayesinde, etkileşim halindeki proteinleri belirleme çalışmaları, bilinen eşlerle etkileştiğinde bilinmeyen proteinlerin görevini tahmin etmek için çok değerli başlangıç noktaları oluşturmaktadır.

Bu bağlamda AMEV protein kinazlarla yapılan etkileşim çalışmalarında AMV153 proteininin AMV035, AMV083, AMV153, AMV165 ve AMV230 proteinleriyle etkileştiği belirlenmiştir. Bu proteinlerden AMV035 ve AMV083 virüsün hücreye girişinde görev yapan komplekste yer almaktadır. AMV197 proteini ise AMV026, AMV035, AMV040, AMV062, AMV063, AMV069, AMV083, AMV120, AMV162, AMV165 ve AMV230 proteinleriyle etkileşim göstermektedir. Burada dikkat çeken husus ise her iki protein kinazın da ortak olarak virüsün hücreye girişinde görev yapan komplekste yer alan iki protein ile etkileşim gerçekleştirmiş olmasıdır. AMEV'ün hücreye girişinde görevli toplamda 10 adet gen görev yapmaktadır (AMV035, AMV083, AMV118, AMV127, AMV138, AMV186, AMV217, AMV232, AMV243 ve AMV249). Komplekste bulunan proteinlerden AMV217 ve AMV035'in miristilasyonlu membran proteini olduğu bilinmektedir. AMV118, AMV249,

AMV186, AMV243, AMV127 ve AMV083 membran proteinleridir. AMV186'in ise zarf proteini olduğu ve vaksinya virüs A28 ile homolog olduğu bilinmektedir. AMEV protein kinazlarının bu kompleksde bulunan sadece iki protein ile etkileşime girmesi, kinazların öncelikle bu proteinleri aktifleştirerek kompleksi aktif hale getirip getirmediği sorusunu akla getirmektedir. Bu konunun aydınlatılabilmesi için ise hücreye giriş kompleksinin daha detaylı çalışılması gerekmektedir.

AMV153 ve AMV197 proteinlerinin etkileştiği AMV230 proteini AMEV RNA polimerazın alt ünitelerinden birisidir. Diğer alt üniteler ise AMV054, AMV066, AMV091 ve AMV221'dir. Bunlardan AMV221 büyük alt ünite. Protein kinazın etkileştiği AMV230 ise diğer büyük alt ünite. Protein kinazın ilk olarak ikinci büyük alt üniteye bağlanması bu kompleksi oluşturmak için ilk olarak bu alt üniteyi aktifleştiriyor olabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Genel itibariyle RNA polimerazlarda iki büyük alt ünite ve en az iki ve daha fazla küçük alt ünite bulunmaktadır. RNA polimeraz bir kompleks oluşturduğu için bu kompleksin biraraya gelme mekanizması daha detaylı incelenebilir. Beş alt ünitenin hangi sırayla bu kompleksi oluşturduğu ve bunun sonucunda oluşan kompleksin üç boyutlu yapısı ortaya çıkarılabilir. Muratoğlu ve arkadaşları tarafından 2016'da yapılan çalışma sonucunda AMV197'nin genomdan silinmesi sonucunda AMV230'un transkripsiyon seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Protein kinazların RNA polimeraz enziminin transaktive edilmesinde rolü olduğu söylenebilir.

Biyoinformatik analizlere göre, AMV162 holliday junction protein, AMV165 ise membran proteini ve AMV063 ise kaspazdır. AMV026, AMV040, AMV062, AMV069 ve AMV120 proteinlerinin ise görevleri henüz bilinmemektedir. Görevleri henüz belirlenmemiş olan bu proteinler için de daha detaylı çalışma yapılması gerekmektedir. Bu sayede bu ORF'lerin görevleri tespit edilebilir.

AMV063'ün kaspaz olduğu bilinmektedir. Kaspaz enzimleri büyük bir proteaz ailesidir. Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için kaspaz ismini almışlardır. Açılımı; "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE" şeklindedir. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilirler. Daha sonra hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanır ve mevcut substratı bir karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve şekilsel değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı bir takım süreçler neticesinde gelişir. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte aktifleşirler ve aktifleşen

bu kaspazlar diğer inaktif kaspazları aspartik birimlerinden keserek aktifleştirirler. Kaspazlar apoptotik yolda “başlatıcılar” ve “bitiriciler” olmak üzere iki grupta toplanırlar. Apoptotik ölüm işlem sırasına göre kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur. Apoptotik yolun daha sonraki aşamalarında görev alan kaspazların diğer üyeleri ise efektör kaspazlar olarak adlandırılır. Efektör kaspazlar başlatıcı kaspazlar tarafından aktifleştirilirler. Her bir kaspaz enziminin optimum kesme bölgesi vardır ve bu bölge aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiftir. Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir. Ayrıca bu motif ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektedir. Kaspaz-2, -8, -9 ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, kaspaz-3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlardır (Turner; 1999). Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar ve ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar. Öncelikle AMV063’ün muhtemel kaspaz-2 olması onu başlatıcı kaspazlar sınıfına sokmaktadır (Bawden vd., 2000). Kaspazların bu önemlerinden dolayı, kaspaz proteinini üreten bu ORF’nin daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Bilindiği üzere ilk olarak kaspazlar Bakülovirüsler’de çalışılmıştır (Peri vd., 2011). Daha sonra Means ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre *Amsacta moorei entomopoxvirus*’de de Bakülovirüs’de bulunan kaspaz inhibitörünün (p35) homoloğu olan AMV063 kodlu ORF bulunmuştur. Bu yaptıkları çalışmada Bakülovirüs dışında herhangi bir virüs familyası genomunda ilk defa p35 homoloğu bulunmuştur.

Bilindiği üzere protein kinazlar viral olaylarda çok önemli görev almaktadır. Bu olaylarda biri de apoptozistir. Protein kinazın (AMV197) kaspaz proteini ile etkileşim oluşturması da bunu kanıtlar niteliktedir. Burada ilgi çeken durum ise AMEV protein kinazlarının (AMV153 ve AMV197) AMEV apoptozis inhibitör (iap) (AMV021) proteini ile hiçbir etkileşim göstermemesidir. Yapılan etkileşim deneyleri üçer tekrarlı şekilde tamamlanmıştır. Her üç tekrarda da hiçbir etkileşim gözlenmemiştir. Kaspazların ilk olarak inaktif olarak sentezlenmesi ve apoptozise katıldıkları zaman aktifleştiği bilinmektedir. Protein kinazların proteinlerin aktivasyonunu sağladığı bilinmektedir.

AMEV’de AMV197 protein kinaz geninin silinmesiyle AMV063 kaspaz geninin transkripsiyon seviyesinin azalmış olması (Muratoğlu vd., 2016), protein kinazın kaspazları transaktive ettiğini göstermektedir. Bu çalışma sonucunda AMV197 protein kinazın kaspaz (AMV063) ile olan etkileşimi de bu sonucu doğrulamaktadır.

Poksvirüsler, ekspresyon, replikasyon ve DNA paketleme gibi olaylarda birçok enzim sentezlemektedirler. Poksvirüslerin prototipi olan vaksinya virüslerde de holliday junction resolvaz enzimi Garcia ve Moss tarafından 2001 yılında çalışılmıştır. Holliday junction resolvaz enzimi ise homolog rekombinasyonda önemli bir role sahiptir (Mehta ve Haber, 2014). Homolog rekombinasyon sırasında oluşan holliday junction yapısını kesmeye yarayan yapıya duyarlı endonükleazlar tarafından katalizlenen holliday junction resolvase, bakterilerde, bakteriyofajlarda, öbakterilerde, virüslerde ve ökaryotlarda bulunmaktadır. Bilindiği üzere homolog rekombinasyon DNA tamir mekanizmasının önemli bir aşamasını oluşturmaktadır. Vaksinya virüsde ise A22R nolu ORF AMV162'nin homologudur. Yapılan aminoasit benzerliklerinde bakteriyal enzim RuvC ile benzerlik göstermektedir. Bu enzim de bakterilerdeki holliday junction resolvaz enzimidir. Vaksinya virüs ile yapılan çalışmalarda A22R'nin replikasyonda ve viral DNA'nın işlenmesinde görevi olduğu bulunmuştur (Garcia ve Moss, 2001).

AMEV genomunda bulunan iki protein kinazın (AMV153 ve AMV197) ise birbirleriyle ve AMV197 protein kinazın kendisiyle herhangi bir etkileşimi görülmemiştir. AMV153'ün kendisiyle etkileşime girmesi, bu proteinin dimer oluşturarak görev yapabildiğini gösterir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e ait protein kinaz proteinlerinin birbirleriyle ve virüsün diğer proteinleriyle aralarında gerçekleşen protein-protein etkileşimleri tespit edildi.

1) AMEV proteinlerinden 69 tanesinin transmembran bölge içerdiği TMHMM programıyla ve 12 tanesinin de sinyal peptit içerdiği SignalP programıyla tespit edildi. Tespit edilen bu domeinler çıkartılarak genler çoğaltıldı ve maya-iki-hibrit sisteminde test edildi.

2) Transmembran ve sinyal peptit bölgeleri genlerden çıkartıldığında 100 baz çiftinden daha küçük olan 13 gen bu çalışmada kullanılmadı. Toplam 230 gen ürünü protein için etkileşimler araştırıldı.

3) AMV153 protein kinaz proteinin kendisi ile etkileştiği belirlendi. Kendisinin dışında AMV035, AMV083, AMV165 ve AMV230 proteinleriyle de etkileştiği belirlendi.

4) AMV197 protein kinaz proteinin AMV026, AMV035, AMV040, AMV062, AMV063, AMV069, AMV083, AMV120, AMV162, AMV165 ve AMV230 proteinleriyle etkileştiği belirlendi.

5) İki protein kinaz proteininin birbirleriyle etkileşimi gözlenmemiştir.

6) AMV197-AMV230 ve AMV153-AMV230 etkileşimleri, ikinci bir yöntem olan pull down analizi ile teyit edilmiştir.

## 6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında AMEV'e ait protein kinaz proteinleri ve bu proteinlerin virüsün diğer proteinleriyle arasındaki etkileşimler maya- iki-hibrit yöntemi ile tespit edilmiştir. Maya-iki-hibrit yöntemi ile tespit edilen bu etkileşimlerin birer tanesinin diğer yöntemler kullanılarak kanıtlanması gereklidir. Her ne kadar *Poxviridae* familyası için rol model vaksinya virüs ele alınsa da AMEV'ün bu etkileşimlerinin belirlenmesi de bazı mekanizmaların aydınlatılmasında yol gösterici olabilir. Bu tez çalışmasından sonra yapılabileceklerden bazılarını şöyle önerebiliriz:

1) Her iki protein kinaz proteininin ortak olarak etkileştiği AMV035 ve AMV083 proteinleri AMEV'ün hücreye giriş kompleksine ait proteinlerdir. Buradan yola çıkılarak AMEV'ün hücreye giriş mekanizmasının detaylı olarak çalışılması gerekmektedir. Bu mekanizmada protein kinazların nasıl bir rolü olduğu belirlenebilir.

2) Yine her iki protein kinaz proteininin ortak olarak etkileşim gösterdiği proteinlerden biri olan AMV230 AMEV RNA polimeraz alt ünitesinin ikinci büyük alt ünitesidir. Buradan yola çıkarak RNA polimeraz yapısının aydınlatılması gerekmektedir. Bu bağlamda RNA polimeraz alt ünitelerinin hangi sırayla biraraya gelerek bu kompleksi oluşturduğu tespit edilebilir. Bu işlem için yine maya iki hibrit sistemi kullanılabilir. RNA polimerazın *in vitro* da aktif bir enzim olup olmadığını tespit etmek amaçlı bütün alt üniteleri bir arada ekspres edecek MultiBac Ekspresyon sistemi kullanılarak ifadesi belirlenebilir.

3) AMV197 protein kinazın etkileşim gösterdiği AMV063 biyoinformatik analizlere göre kaspazdır. Bu enzimin apoptozis olayındaki öneminden dolayı ve bu mekanizmayı aydınlatmada faydası olacağından ötürü bu genin fonksiyonel analizi yapılabilir.

4) AMV197 protein kinazın etkileştiği muhtemel holliday junction resolvaz enzimi olan AMV162 proteini homolog rekombinasyonda görev almaktadır. Bu sebepten ötürü bu enzimin DNA tamir mekanizmasında da önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu gen ile daha detaylı çalışma yapılabilir.

5) Görevleri belirlenmemiş olan AMV040, AMV026, AMV062, AMV069 ve AMV120 proteinlerinin görevlerinin belirlenmesi için bu proteinlerin hangi proteinlerle etkileşim gösterdiğini belirlemek gerekir. Buradan çıkacak sonuçlar ile bu proteinlerin görevleri konusunda fikir sahibi olunabilir.



## 7. KAYNAKLAR

- Afonso, C., L., Tulman, E., R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G., F. ve Rock, D., L., 2000. The genome of fowlpox virus, Journal of Virology, 74, 3815-3831.
- Afonso, C., L., Tulman, E., R., Lu, Z., Oma, E., Kutish, G., F. ve Rock, D., L., 1999. The Genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus, Journal of Virology, 73, 533-552.
- Alberts, B., 1998. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists, Cell, 92, 3, 291–294.
- Aloui-Ismaili, M., H. ve Richardson, C., D., 1996. Identification and Characterization of a Filament-Associated Protein Encoded by *Amsacta moorei* entomopoxvirus, Journal of Virology, 70, 2697.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G. ve Jessee, J., 1996. Rapid generation of recombinant baculoviruses and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac® baculovirus expression system, Focus, 17, 53-58.
- Arif, B., M. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, The entomopoxviruses, E. Kurstak, Editör, Dekker, New York, 175-195.
- Arif, B., M., 1984. The entomopoxviruses, Advances in Virus Research, 29, 195-213.
- Arif, B., M., 1995. Recent Advances in The Molecular Biology of Entomopoxviruses, Journal of General Virology, 76, 1-13.
- Banham, A., H. ve Smith, G., L., 1992. Vaccinia virus gene B1R encodes a 34-kDa serine/threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions, Virology. 191, 803–812.
- Banham, A., H., Leader, D., P. ve Smith, G., L., 1993. Phosphorylation of ribosomal proteins by the vaccinia virus B1R protein kinase, FEBS Lett., 321, 27–31.
- Barbosa, E. ve Moss, B., 1978. mRNA (nucleoside-29-)- methyltransferase from Vaccinia virus. Characteristics and substrate specificity, Journal of Biological Chemistry, 253, 7698–7702.
- Baroudy, B., M. ve Moss, B., 1980. Purification and characterization of DNA-dependent RNA polymerase from Vaccinia virions, Journal of Biological Chemistry, 225, 4372-4380.
- Bawden, A., L., Glassberg, K., J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W. ve Moyer, R., W., 2000. Complete genomic sequence of the *Amsacta moorei* entomopoxvirus: analysis ve comparison with other poxviruses, Virology, 274, 120-139.

- Beaudoin, L., Robert, P., Lal, S., N. ve Decazy, B., 1994. Adoretus Versutus Control Using Entomopoxvirus in Fiji, Plantation Recherche Dev, 1, 50.
- Becker, M., N., Greenleaf, W., B., Ostrov, D., A. ve Moyer, R., W., 2004. *Amsacta moorei entomopoxvirus* Expresses an Active Superoxide Dismutase, Journal of Virology, 78, 10265-10275.
- Becker, M., N., Todd, T., M. ve Moyer, R., W., 2008. An *Amsacta moorei entomopoxvirus* ortholog of the poly (a) polymerase small subunit exhibits methyltransferase activity is non-essential for virus growth, Virology, 375, 2, 624-36.
- Bergoin, M., Veyrunes, J., C. ve Scalla, R., 1970. Isolation ve amino acid composition of the inclusions of *Melolontha melolontha* poxvirus, Virology, 40, 760-763.
- Bilimoria, S., L. ve Arif, B., M., 1980. Structural Polypeptides of *Choristoneura biennis* Entomopoxvirus, Virology, 104, 253-257.
- Bischoff, D., S. ve Slavicek, J., M., 1994. Identification and characterization of a *protein kinase* gene in the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, J. Virol., 68, 1728–1736.
- 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.
- 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.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. ve McFadden, G., 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus, Virology, 264, 298-318.
- Cann, A. J., 2005. Principles of Molecular Virology, 4. baskı, Academic Pres, University of Leicester, UK, 43 s.
- Capra, M, Nuciforo, P., G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Boldorini, R., Pallotti, F., Viale, G., Gishizky, M., L., Draetta, G., F. ve Di Fiore, P., P., 2006. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers, Cancer Res., 66, 8147-8154.
- Carter, J., B. ve Saunders, V., A., 2007. Virology principles and applications, School of Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, UK, 76 s.
- Ciccarone, V., C., Polayes, D. ve Luckow, V., A., 1997. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector, 13, U. Reisch,ed., Totowa, NJ: Humana Press Inc.

- Clark, D., E., Errington, T., M., Smith, J., A., Frierson, Jr H., F., Weber, M., J. ve Lannigan, D., A., 2005. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation, Cancer Research., 65, 3108-3116.
- Dall, D., Sriskantha, A., Vera, A., Lai-Fook, J. ve Symonds, T., 1993. A Gene Encoding A Highly Expressed Spindle Body Protein of *Heliothis armigera* Entomopoxvirus, Journal of General Virology, 74, 1811.
- 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.
- Flexner, J., L. ve Belnavis, D., L., 2000. Microbial Insecticides, Sf: 35-62. Ed: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl, Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 392 s.
- Friedel, C., C. ve Haas, J., 2011. Virus-host interactomes and global models of virus-infected cells, Trends Microbiology, 19, 10, 501-508.
- Garcia, A., D. ve Moss, B., 2001. Repression of vaccinia virus Holliday junction resolvase inhibits processing of viral DNA into unit-length genomes, J. Virol., 75, 14, 6460-6471.
- Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J., C. ve Bergoin, M., 1995. The *Melolontha melolontha* Entomopoxvirus (MmEPV) Fusolin is Related to Fusolins of Lepidopteran Epvs and to the 37 K Baculovirus Glycoprotein, Virology, 208, 427- 436.
- Giannopoulos, P., N., Nassoury, N., Lamontagne, L., Guertin, C. ve Rashidan, K., K., 2005. *Choristoneura fumiferana* Granulovirus pk-1: a baculoviral protein kinase, J. Biochem. Mol. Biol., 38, 457-467.
- Giot, L., Bader, J., S., Brouwer, C., Chaudhuri, A ve Kuang, B. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*, Science, 302, 1727-1736.
- Goodwin, R., H., Adams, J., R. ve Shapiro, M., 1990. Replication of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in serum-free cultures of a gypsy-moth cell line, Journal of Invertebrate Pathology, 56, 190-205.
- Granados, R., R. ve Naughton, M., 1975. Development of *Amsacta moorei* entomopoxvirus in ovarian and hemocyte cultures from *Estigmene acrea* larvae, Intervirolgy, 5, 62.
- Granados, R., R. ve Roberts, D., W., 1970. Electron Microscopy of A Pox-Like Virus Infecting An Invertebrate Host, Virology, 40, 230.
- Granados, R., R., 1973. Entry of an Insect Poxvirus By Fusion of The Virus Envelope With The Host Cell Membrane, Virology, 52, 305-309.

- Grigoriev, A., 2003. On the number of protein–protein interactions in the yeast proteome, Nucleic Acids Res, 31, 14, 4157–4161.
- Gruidl, M., E., Hall, R., L. ve Moyer, R., W., 1992. Mapping and molecular characterization of a functional thymidine kinase from *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Virology 186, 507–516.
- Guarente, L., 1993. Strategies for the identification of interacting proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1639-1641.
- Guo, F., B. ve Yu, X., J., 2007. Re-prediction of protein-coding genes in the genome of *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Journal of Virological Methods, 146, 389–392.
- Hall, R., L. ve Hink, W., F., 1990. Physical mapping and field inversion gel electrophoresis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA, Archives of Virology, 110, 77-90.
- Hall, R., L. ve Moyer, R., W., 1991. Identification, cloning, and sequencing of a fragment of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA containing the spheroidin gene and three vaccinia virus-related open reading frames, Journal of Virology, 65, 6516–6527.
- Hall, R., L. ve Moyer, R., W., 1993. Identification of An *Amsacta* Spheroidin-Like Protein Within The Occlusion Bodies of *Choristoneura fumiferana entomopoxviruses*, Virology, 192, 179-187.
- Harrison, R., L. ve Bonning, B., C., 2000. Genetic engineering of biocontrol agents for insects, Ed: J. E. Rechcigl ve N. A. Rechcigl, Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 243-280.
- 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.
- Hengjun, G., Hongyin, Z., Weiqi, G., Yi, L., Weiping, R. ve Shudong, X., 2001. Construction and Identification of The Eukaryotic Expression Vector of Vaccinia Virus Expressing Human Interleukin-2, Chinese J Digestive Diseases, 2, 129– 132.
- Henry, J., E. ve Jutila, J., W., 1966. The Isolation of A Polyhedrosis Virus From A Grasshopper, Journal of Invertebrate Pathology, 8, 417-418.
- Hukuhara, T., Xu J. ve Yano K, 1990. Replication of anentomopoxvirus in two lepidopteran cell lines, Journal of Invertebrate Pathology, 56, 222-232.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M. ve Hattori, M., 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 4569–4574.
- Kaerlein, M. ve Horak, I., 1976. Phosphorylation of ribosomal proteins in HeLa cells infected with vaccinia virus, Nature, 259, 150–151.

- Kawaguchi, Y. ve Kato, K. 2003. Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. Rev. Med. Virol. 13, 331–340.
- King, L., A., Wilkinson, N., Miller, D., P. ve Marlow, S., A., 1998. Entomopoxvirus. Miller LK. Andrew Ball L. eds. *The Insect Viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, 1-25.
- Kleiman, J., H. ve Moss, B., 1975a. Purification of a protein kinase and two acceptor proteins from vaccinia virus, J. Biol. Chem., 250, 2420-2429.
- Kleiman, J., H. ve Moss, B., 1975b. Characterization of a protein kinase and two phosphate acceptor proteins from vaccinia virus, J. Biol. Chem., 250, 2430-2437.
- LaCount, D., J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A ve Bell, R., 2005. A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, Nature, 438, 103–107.
- Langridge, W., H., R., 1983. Partial characterization of DNA from five entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 42, 369-375.
- Langridge, W., R. ve Roberts, D., W., 1982. Structural Proteins of *Amsacta moorei*, *Euxoa auxillaridis* and *Melanoplus sanguinipes* Entomopoxviruses, Journal of Invertebrate Pathology, 39, 346-353.
- Levin, D., B., Adachi, D., Williams, L., L. ve Myles, T., G., 1993. Host specificity and molecular characterization of the entomopoxvirus of the lesser migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, J Invertebr Pathol., 62, 241-247.
- Li, S., Armstrong, C., M., Bertin, N., Ge, H. ve Milstein, S., 2004. A map of the interactome network of the metazoan *C. Elegans*, Science, 303, 540–543.
- Li, O., Liston, P. ve Moyer, R., W., 2005. Functional Analysis of the Inhibitor of Apoptosis (*iap*) Gene Carried by the Entomopoxvirus of *Amsacta moorei*, Journal of Virology, 79, 2335-2345.
- Lin, S., Q. ve Broyles, S., S., 1994. Vaccinia protein kinase 2: a second essential serine/threonine protein kinase encoded by vaccinia virus, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91, 7653-7657.
- Lin, S., Q., Wen, C. ve Broyles, S., S., 1992. The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase, Journal Virology, 66, 2717–2723.
- Lytvyn, V., Fortin, Y., Banville, M., Arif, B. ve Richardson, C., 1992. Comparison of the thymidine kinase genes from three entomopoxviruses, Journal of General Virology, 73, 3235-3240.
- Manning, G., Whyte, D., B., Martinez, R., Hunter, T. ve Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome, Science, 298, 1912–1934.

- Marlow, S., A., Billam, L., J., Palmer, C., P. ve King, L., A., 1993. Replication and Morphogenesis of *Amsacta Moorei* Entomopoxvirus in Cultured Cells *Estigmene acrea* (Salt Marsh Caterpillar), Journal of General Virology, 74, 1457-1461.
- Martin, S., A., Paoletti, E. ve Moss, B., 1975. Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-)-methyltransferase from *Vaccinia* virions, Journal of Biological Chemistry, 250, 9322– 9329.
- Massung, R., F., Jayarama, V. ve Moyer, R., W., 1993. DNA sequence analysis of conserved and unique regions of swinepox virus: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein receptor-coupled homologue, Virology, 197, 511–528.
- McFadden, G., 2005. Poxvirus tropism, Nat. Rev., 3, 201–213.
- McGuire, M., R., Streett, D., A. ve Shasha, B., S., 1991. Evaluation of Starch-Encapsulation For Formulation of Grasshopper (Orthoptera: Acrididae) Entomopoxviruses, J Econ Entomo., 84, 1652-1656.
- Means, J., C., Penabaz, T. ve Clem, R., J., 2007. Identification and Functional Characterization of *Ampv33*, A Novel Homolog of The Baculoviruses Caspase Inhibitor p35 Found in *Amsacta moorei* Entomopoxvirus, Virology, 436-447.
- Mehta, A. ve Haber J., E. 2014. Sources of DNA double-strand breaks and models for recombinational DNA repair, Cold Spring Harb Perspect Biol, 10, 1101.
- Merrihew, R., V., Clay, W., C., Condreay, J., P., Witherspoon, S., M., Dallas, W., S. ve Kost, T., A., 2001. Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells, Journal of Virology, 75, 2, 903–909.
- Miller, D., P., Wilson, L., E., Marlow, S., A. ve King, L., A., 1998. Characterisation of the *Amsacta Moorei* Entomopoxvirus Spheroidine Gene Promoter, Journal of General Virology, 2, 10.
- Mitchel, F., L., Smith, G., E. ve Smith, J., W., 1983. Characterization of An Entomopoxvirus of The Lesser Cornstalk Borer (*Elasmopalpus lignosellus*), Journal of Invertebrate Pathology, 42, 299-305.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K. ve Wada, S., 2007. Spindles of an Entomopoxvirus Facilitate Its Infection of the Host Insect by Disrupting the Peritrophic Membrane, Journal of Virology, 81, 4235-4243.
- 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.

- Morrison, E., E., Wang, Y., F. ve Meredith, D., M., 1998. Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument, J. Virol., 72, 7108–7114.
- Moss, B., 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development, Science, 252, 1662-1667.
- Moss, B., 1996. Genetically Engineered Poxviruses For Recombinant Gene Expression, Vaccination and Safety, Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 11341-11348.
- Moss, B., 2001. Poxviridae: The viruses and their replication, Fields Virology, David M. Knipe, Peter M. Howley Editörler, 2, 4. Baskı, Lippincott & Wilkins.
- Moss, B., Rosenblum, E., W. ve Gershowitz, A., 1975. Characterization of a polyadenylate polymerase from Vaccinia virions, Journal of Biological Chemistry, 250, 4722– 4729.
- Muratoğlu, H., 2010. *Amsacta moreii* entomopoksvirüs protein kinaz geninin karakterizasyonu ve fonksiyonel analiz, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Muratoğlu, H., Nalçacıoğlu, R., Arif, B., M. ve Demirbağ, Z., 2016. Genome-wide analysis of differential mRNA expression of *Amsacta moorei* entomopoxvirus, mediated by the gene encoding a vira protein kinase (AMV197), Virus Res., 215, 25-36.
- Murphy, F., A., Fauquet, C., M., Bishop, D., H., L., Ghabrial, S., A., Jarvis, A., W., Martelli, G., P., Mayo, M., A. ve Summers, M., D., 1995. Editörler, Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Vienna & New York: Springer-Verlag.
- Nalcacioglu, R., Akturk Dizman, Y., Vlak, J., M., Demirbag, Z. ve van Oers, M., M., 2010. *Amsacta moorei entomopoxvirus* encodes a functional DNA photolyase (AMV025), Journal of Invertebrate Pathology, 105, 363-365.
- 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.
- Oma, E., A. ve Henry, J., E., 1986. Host Relationships of Entomopoxviruses Isolated From Grasshoppers, Grasshopper Symposium Proceedings, March, North Dakota Extension Service, North Dakota State University, 48-49.
- Paul, F., E., Hosp, F. ve Selbach, M., 2011. Analyzing protein–protein interactions by quantitative mass spectrometry, Methods, 54, 4, 387–395.
- Pearson, A., Richardson, C. ve Yuen, L., 1991. The 5' Noncoding Region Sequence of the *Choristoneura biennis* Entomopoxvirus Spheroidin Gene Functions as an Efficient Late Promoter in The Mammalian Vaccinia Expression System. Virology, 180, 2, 561-6.

- Peng, K., Wu, M., Deng, F., Song, J., Dong, C., Wang, H. ve Hu, Z., 2010. Identification of protein–protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, Journal of General Virology, 91, 659–670.
- Peri, P., Nuutila, K., Vuorinen, T., Saukko, P. ve Hukkanen, V., 2011. Cathepsins are involved in virus-induced cell death in ICP4 and Us3 deletion mutant herpes simplex virus type 1- infected monocytic cells, J Gen Virol, 92, 173–180.
- Peterson, B., Hall, R., L., Moyer, R., W. ve Shuman, S., 1997. Characterization of a DNA Topoisomerase Encoded by *Amsacta moorei* entomopoxvirus, Virology, 230, 197-206.
- Rain, J., C., Selig, L., DeReuse, H., Battaglia, V ve Reverdy, C., 2001. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*, Nature, 409, 211–215.
- Reed, L., J. ve Muench, H., 1938. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints, The American Journal of Hygiene, 27, 493–497.
- Reilly, L., M. ve Gaurino, L., A., 1994. The pk-1 gene of *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus encodes a protein kinase, J. Gen. Virol., 75, 2999–3006.
- Rempel, R., E. ve Traktman, P., 1992. Vaccinia virus B1 kinase: phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants and enzymatic characterization of recombinant proteins, Journal of Virology, 66, 4413–4426.
- Roberts, D., W. ve Granados, R., R., 1968. A Poxlike Virus from *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arcxitiidae), Journal of Invertebrate Pathology, 12, 141.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2005. Entomopoksvirüsler ve biyolojik kontrol, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29, 4, 280-286.
- Senkevich, T., G., Bugert, J., J., Sisler, J., R., Koonin, E., V., Darai, G. ve Moss, B., 1996. Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes, Science 273, 813–816.
- Shchelkunov, S., N., Marennikova, S., S., Blinov, V., M., Resenchuk, S., M., Totmenin, A., V., Chizhikov, V., E., Guturov, V., V., Safronov, P., F., Kurmanov, R., K. ve Sandaknchiev, L., S., 1993. Entire coding sequence of the variola virus, Doklady Akademi Nauk, 328, 629–632.
- Smith, C., C., 2005. The herpes simplex virus type 2 protein ICP10PK: a master of versatility, Front. Biosci., 10, 2820-31.
- Sriskanda, V., Moyer, R., W. ve Shuman, S., 2001. NAD-dependent DNA ligase encoded by a eukaryotic virus, J. Biol. Chem., 276, 36100–36109.
- Stanbridge, L., J., Dussupt, V. ve Maitland, N., J., 2003. Journal of Biomedical Biotechnology, 2, 79–91.



- Todd, S., Laboissière, M., C., A. ve Craik, C., S., 2000. Yeast Two-Hybrid Assay for Examining Human Immunodeficiency Virus Protease Heterodimer Formation with Dominant-Negative Inhibitors and Multidrug-Resistant Variants, Analytical biochemistry, 277, 247-253.
- Turner, P., C., Sancho, M., C., Thoennes, S., R., Caputo, A., Bleackley, R., C. ve Moyer, R., W., 1999. Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukin-1beta-converting enzyme in vitro and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells, J. Virol, 73, 8, 6394 – 6404.
- URL-1, <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>, 01.11.2016.
- Vago, C., 1963. A new type of insect virus, Journal of Insect Pathology, 5, 275-276.
- VanSlyke, J., K. ve Hruby, D., E., 1990. Posttranslational modification of vaccinia virus proteins, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 163, 185-206.
- Watanabi, Y., Sakuma, S. ve Tanaka, S., 1974. A possible biological function of the protein kinase associated with vaccinia and vesicular stomatitis virions, FEBS Lett., 41, 331-334.
- Wegensteiner, R. ve Weiser, J., 1995. A New entomopoxvirus in the Bark Beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae), Journal of Invertebrate Pathology, 65, 203- 205.
- Winter, J., Hall, R., L. ve Moyer, R., W., 1995. The effect of inhibitors on the growth of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in *Lymantria dispar* (gypsy moth) cells, Virology, 211, 462–473.

## ÖZGEÇMİŞ

28.02.1984 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlkokulu 1990–1995 yılları arasında Trabzon Yüzüncü Yıl İlköğretim Okulu'nda, Ortaokulu 1995–1999 yılları arasında Trabzon Yunus Emre Anadolu Lisesi'nde ve liseyi 1999–2002 Trabzon Tefik Serdar Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2003–2004 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Temmuz 2009'da Yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl 2009 Eylül'de Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora eğitimine başladı. 2015 Ekim-2016 Nisan'da 6 aylığına Hollanda'nın Wageningen Üniversitesinde TÜBİTAK-2214 Yurt Dışı Araştırma Burs programından yararlanarak doktora çalışması için bulundu. İyi derecede İngilizce bilmektedir.