

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***INVERTEBRATE IRIDESCENT VIRUS 6 (IIV6) GENLERİNİN
TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ VE TRANSAKTİVATÖR PROTEİN(LER)İNİN
ARAŞTIRILMASI***

DOKTORA TEZİ

Aydın YEŞİLYURT

**ŞUBAT 2020
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**

Biyoloji Anabilim Dalında

Aydın YEŞİLYURT Tarafından Hazırlanan

***INVERTEBRATE IRIDESCENT VIRUS 6 (IIV6) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONEL
ANALİZİ VE TRANSKİTİVATÖR PROTEİN(LER)İNİN ARAŞTIRILMASI***

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 28 /01 /2020 gün ve 1839 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Üye : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

Üye : Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ

Üye : Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)* Genlerinin Transkripsiyonel Analizi ve Transaktivatör Protein(ler)inin Araştırılması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Bu tezde *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)*’ya ait genlerin transkripsiyon sınıflarının belirlenmesi, her bir gen grubuna ait promotör dizilerinin tespit edilmesi ve virüsün hücrede replikasyona başlayabilmesi için gerekli transaktivatör proteinlerin araştırılması çalışmaları yapılmıştır.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan tez izleme jürisi üyelerim sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve sayın Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji grubu hocalarım Prof. Dr. İsmail DEMİR’e, Prof. Dr. Kazım SEZEN’e ve Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’a, mikrobiyoloji laboratuvar çalışma grubu arkadaşlarımdan Öğr. Gör. Dr. Aşkın TEKİN’e, Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YAKUPOĞLU’na ve Dr. Dönüş GENÇER’e, tezimin bir bölümünü tamamlamam için laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Wageningen Üniversitesi (Hollanda) Viroloji Laboratuvarı Başkanı Prof. Dr. Monique M. van Oers’e ve tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı KTÜ-Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (FDK-2017-5839) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na (214Z172 kodlu proje ve 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı) teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan, emsalsiz emek ve gayretleriyle beni yetiştirerek bugünlere getiren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aydın YEŞİLYURT

Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) Genlerinin Transkripsiyonel Analizi ve Transaktivatör Protein(ler)inin Araştırılması*” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her trl yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 14/02/2020

Aydın YEŞİLYURT

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Iridoviridae</i> Familyası	2
1.3. Iridoviridlerin Morfolojisi.....	8
1.4. Iridoviridlerin Genom Özellikleri ve DNA Replikasyonu.....	14
1.5. <i>Iridovirus</i> Cinsi	17
1.6. <i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (IIV6).....	18
1.7. Transkripsiyonel Regülasyon.....	22
1.8. Çalışmanın Amacı.....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	28
2.1. Virüs, Konak ve Plazmitler	28
2.1.1. Virüs Çoğaltılması ve Saflaştırılması	28
2.1.2. Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi	29
2.2. Viral DNA ve RNA İzolasyonu	31
2.2.1. DNA İzolasyonu	31
2.2.2. RNA İzolasyonu.....	31
2.3. Primerlerin Tasarlanması	32
2.4. <i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (IIV6) Genlerinin Transkripsiyonel Analizi	33
2.4.1. Genlerin Transkripsiyonel Sınıflarının Belirlenmesi.....	33
2.4.1.1. cDNA'ların Oluşturulması.....	34
2.4.1.2. Ters Transkripsiyon PCR (RT-PCR)	34
2.4.2. Gen Sınıflarının Promotorlarında Korunmuş Motiflerin <i>In Silico</i> Analizi	34

2.4.3.	Korunmuş Motiflerin Promotor Aktivitesine Etkisinin Araştırılması	35
2.4.3.1.	Genlerin 5' Yukarı Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması	35
2.4.3.2.	<i>Escherichia coli</i> DH10 β Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	36
2.4.3.3.	<i>E. coli</i> DH10 β Kompetent Hücrelerine Transformasyon	36
2.4.3.4.	Plazmit İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Kesim.....	37
2.4.3.5.	Genlerin 5' Yukarı Bölgelerinin pSP-Luc+NF Vektörüne Klonlanması	37
2.4.3.6.	Korunmuş Motiflerin Promotor Aktivitesinin Araştırılması	38
2.4.3.6.1.	Plazmitlerin Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu	38
2.4.3.6.2.	Lusiferaz Aktivitesinin Belirlenmesi	39
2.4.3.7.	Geç Gen Korunmuş Motiflerinde Yönlendirilmiş Mutasyonların Oluşturulması.....	39
2.5.	En Erken Genlere Ait Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması.....	39
2.5.1.	Hibridizasyon ile Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması	40
2.5.1.1.	Promotor DNA'sının Elde Edilmesi ve DIG (digoksinin) ile İşaretlenmesi... 40	
2.5.1.2.	Viral Proteinlerin Hazırlanması	40
2.5.1.3.	IIV6 ile Enfekte Hücrelerden Nüklear ve Sitoplazmik Proteinlerin Elde Edilmesi	41
2.5.1.4.	Proteinlerin Membrana Aktarılması.....	42
2.5.1.5.	Proteinlerin Membran Üzerinde Renatürasyonu.....	42
2.5.1.6.	Southwestern Hibridizasyonu	42
2.5.2.	Ko-transfeksiyon ile Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması	43
2.5.2.1.	Viral Genlerin pIZ/V5-His Vektörüne Klonlanması	43
2.5.2.2.	Rekombinant pIZ/V5-His ve pSP-Luc+NF Plazmitlerinin Böcek Hücrelerine Ko-Transfeksiyonu	44
2.5.3.	DNA-Afinite Kromatografisi ile Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması	45
2.5.3.1.	Oligonükleotitlerin Hazırlanması.....	45
2.5.3.2.	Kromatografi Dolgu Maddesinin Hazırlanması.....	46
2.5.3.3.	Proteinlerin Kromatografiden Geçirilmesi ve Southwestern Analizleri.....	47
2.5.3.4.	Protein Rf Değerinin Hesaplanması.....	47

2.5.4.	Transaktivatör Kompleksinin Muhtemel Başlangıç Proteinlerinin Biyoinformatik Analizi	48
3.	BULGULAR.....	49
3.1.	Primerlerin Tasarımı	49
3.2.	Viral Genlerin Transkripsiyon Sınıflarının Belirlenmesi.....	58
3.3.	Korunmuş Bölge Analizleri	60
3.4.	Genlerin 5' Yukarı Bölgelerinin pSP-Luc+NF Plazmidine Klonlanması	63
3.5.	Promotor Bölgelerinin Lusiferaz Aktiviteleri	64
3.6.	IIV6 En Erken Genlerinin Transaktivatör Proteinlerinin Belirlenmesi	68
3.6.1.	Southwestern Hibridizasyonu ile Potansiyel Transaktivatör Proteinlerin Büyüklüklerinin Tespit Edilmesi	68
3.6.2.	Potansiyel Transaktivatör Proteinleri Kodlayan Genlerin pIZ/V5-His Vektörüne Klonlanması	69
3.6.2.1.	Potansiyel Transaktivatör Protein Genlerinin PCR ile Çoğaltılması.....	69
3.6.2.2.	Gen Bölgelerinin Klonlama Vektöründe Gösterilmesi.....	71
3.6.2.3.	Gen Bölgelerinin Ekspresyon Vektöründe Gösterilmesi	72
3.7.	Yeşil Floresan Proteinin (GFP) pIZ/V5-His'te Ekspresyonu	74
3.8.	Potansiyel Transaktivatör Proteinlerden Elde Edilen Lusiferaz Aktiviteleri.....	75
3.9.	Kromatografi Yöntemiyle <i>exo</i> Promotoruna Bağlanan Proteinlerin Tespiti	76
3.10.	Protein Rf Değerinin Hesaplanması.....	77
3.11.	Muhtemel Transaktivatör Proteinlerin Biyoinformatik Analizi.....	78
4.	TARTIŞMA	82
5.	SONUÇLAR	91
6.	ÖNERİLER.....	92
7.	KAYNAKLAR	93

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

INVERTEBRATE IRIDESCENT VIRUS 6 (IIV6) GENLERİNİN TRANSKRİPSİYONEL ANALİZİ VE TRANSAKTİVATÖR PROTEİN(LER)İNİN ARAŞTIRILMASI

Aydın YEŞİLYURT

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

2020, 104 sayfa

Bu çalışmada, *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)*'ya ait genlerin transkripsiyonel sınıflarının belirlenmesi, genlerin yukarı bölgelerinde muhtemel promotor görevi yapabilecek korunmuş bölgelerin tespit edilmesi ve en erken genlerin transkripsiyonunu başlatan protein(ler)in araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada ilk olarak, IIV6'nın şu ana kadar transkripsiyonel olarak sınıflandırılmamış 159 genin transkripsiyon sınıfları RT-PCR tekniği ile belirlendi. Bu genlerin 114 tanesinin en erken (IE), 23 tanesinin gecikmiş erken (DE) ve 22 tanesinin de geç (L) gen sınıfına ait oldukları belirlendi. İkinci olarak, IIV6'nın tüm genlerinin translasyon başlangıç noktalarından itibaren 200 nükleotit yukarı bölgeleri, promotor görevi yapabilecek korunmuş bölge bakımından MEME Suite veritabanı kullanılarak analiz edildiler. IE genler için TAAAATTGAA, DE genler için TTTTATGG, L genler için de TCAATTTT ve NNTTGT motifleri belirlendi. IE ve DE genler için bu motifler silindiğinde promotor aktivitelerinde önemli ölçüde azalma görülürken, L genlerde ise promotor aktivitesinde önemli derecede artış meydana geldi. Yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları L genlerdeki NNTTGT motifinin genin transkripsiyonu üzerinde baskılayıcı görev yaptığını ve L gen promotörü olarak belirli bir motifin değil belirli uzunlukta bir bölgenin görev yapabileceğini gösterdi. Çalışmada son olarak, virüsün konak hücrede enfeksiyonu başlatabilmesi için gerekli olan yapısal protein(ler) araştırıldı. Araştırma southwestern, kotransfeksiyon, DNA afinite kromatografisi ve biyoinformatik analizler yapılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar IIV6 IE gen transkripsiyonunun başlatılmasında tek bir proteinin değil muhtemel bir protein kompleksinin görev yaptığını gösterdi. Bu komplekste görevli muhtemel proteinlerden birinin, yaklaşık 13,5 kDa büyüklüğündeki güçlü DNA bağlanma domainine sahip olan 366R olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: İridovirus, RT-PCR, Transkripsiyon, Promotor, Transaktivatör

PhD. Thesis

SUMMARY

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF *INVERTEBRATE IRIDESCENT VIRUS 6*
(IIV6) GENES AND INVESTIGATION OF TRANSACTIVATOR PROTEIN(S)

Aydın YEŞİLYURT

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
2020, 104 pages

In this study, it was aimed to identify the transcriptional classes of *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6) genes, detect the conserved regions that could act as promoters in the upstream regions of the genes and investigate the protein(s) that initiate the transcription of the immediate early genes. In the study firstly, the transcription classes of 159 genes of IIV6 genes that have not been classified at transcriptional level to date were determined by RT-PCR technique. It was determined that 114 of these genes belong to immediate early (IE), 23 of them belong to delayed early (DE) and 22 of them belong to late (L) gene classes. Secondly, 200 nucleotide upstream regions, starting from translation initiation site, of all IIV6 genes were analyzed using the MEME Suite database in terms of the conserved region that could act as promoter. TAAAATTGAA motif was determined for IE genes, TTTTATGG for DE genes, TCAATTTT and NNTTGT motifs were determined for L genes. The deletion of these motifs for the IE and DE genes showed a significant decrease in promoter activity, whereas a significant increase in L genes. Site-directed mutagenesis studies showed that the NNTTGT motif in L genes acts as a suppressor on the transcription of the gene, and that a region of a certain length rather than a specific motif can act as a promoter for L gene. Finally, the structural protein(s) required for the virus to initiate infection in the host cell were investigated. The investigation was performed using southwestern, co-transfection, DNA affinity chromatography and bioinformatic analysis. Results showed that a possible protein complex, not a single protein, was involved in the initiation of IIV6 IE gene transcription. One of the possible proteins involved in this complex was found to be 366R with a strong DNA binding domain of about 13,5 kDa.

Keywords: Iridovirus, RT-PCR, Transcription, Promoter, Transactivator

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Iridovirid enfeksiyonu içeren konak görüntüleri	2
Şekil 2.	Iridoviridlerin diğer nükleositooplazmik DNA virüsleri ile filogenetik ilişkisi .	4
Şekil 3.	<i>Iridoviridae</i> familyası üyelerinin filogenetik analizi	8
Şekil 4.	Iridoviridlerde virion iç ve dış yapısının şematik görünümü.....	10
Şekil 5.	<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (IIV6)'da kapsit simetrisi ve minör kapsit proteinlerinin organizasyonu	11
Şekil 6.	Iridoviridlerde hacim bağımlı (headful) DNA paketlenme mekanizması, halkasal permütasyon ve dizi tekrarları	15
Şekil 7.	<i>Frog virus 3</i> (FV3)'ün replikasyon stratejisi	16
Şekil 8.	EPDA'nın şematik gösterimi	30
Şekil 9.	Transmembran ve/veya sinyal peptidi içeren ORF'ler	49
Şekil 10.	İnhibitörler varlığında enfekte hücrelerden izole edilen RNA'lardan yapılan en erken, gecikmiş erken ve geç genlere ait RT-PCR görüntüleri.....	59
Şekil 11.	IIV6 ORF'lerinin 5' yukarı bölgelerinde belirlenen korunmuş motifler	61
Şekil 12.	Muhtemel promotor bölgeleri	62
Şekil 13.	193R, 126R ve 259R muhtemel promotor plazmitlerinin kesim analizi	63
Şekil 14.	Muhtemel promotor bölgelerinin lusiferaz aktiviteleri.....	64
Şekil 15.	084L ve 061R muhtemel promotor plazmitlerinin kesim analizi	65
Şekil 16.	Geç genlere ait muhtemel promotor bölgelerinin lusiferaz aktiviteleri	65
Şekil 17.	ORF061R'nin yukarı bölgesinde yapılan mutasyonlar.....	66
Şekil 18.	061R yukarı kısımlarında yapılan mutasyon bölgelerini içeren vektörlerin kesim analizi	67
Şekil 19.	061R'nin yukarı bölgelerinde yapılan mutasyonların lusiferaz aktiviteleri....	67
Şekil 20.	IIV6 ile enfekte konak hücrenin (Sf9) nüklear ve sitoplazmik proteinleriyle southwestern analizi	68
Şekil 21.	Viral yapısal proteinlerle elde edilen tekrarlı southwestern analizleri.....	69
Şekil 22.	Potansiyel transaktivatör gen bölgelerinin PCR görüntüleri	70
Şekil 23.	IIV6 potansiyel en erken transaktivatör gen bölgelerinin ara vektörde doğrulanması	71

Şekil 24. IIV6 potansiyel en erken transaktivatör gen bölgelerinin ekspresyon vektöründe doğrulanması.....	73
Şekil 25. Yeşil floresan geninin ekspresyon vektörüne klonlanması.....	75
Şekil 26. pIZ/V5-His vektörüne klonlanmış yeşil floresan (<i>gfp</i>) geninin böcek hücrelerinde ifadesi	75
Şekil 27. Kromatografi ile elde edilen protein örneklerinin southwestern analizi.....	77
Şekil 28. Protein büyüklüklerinin tespit edilmesi için çizilen Rf grafiği.....	78
Şekil 29. 012L promotor dizisi ile 366R proteini arasındaki etkileşimin <i>in silico</i> gösterimi	80
Şekil 30. Muhtemel transaktivatör kompleksinin modeli	81
Şekil 31. IIV6'ya ait en erken genlerin genom üzerindeki durumları.....	85
Şekil 32. IIV6'ya ait gecikmiş erken (DE) genlerin genom üzerindeki durumları	86
Şekil 33. IIV6'ya ait geç (L) genlerin genom üzerindeki durumları.....	86

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Gen bankasında genom dizisi veya DNA dizisi bulunan iridoviridler	5
Tablo 2. Iridoviridlerin sınıflandırılmasında kullanılan özellikler	7
Tablo 3. <i>Iridoviridae</i> familyasına ait korunmuş genler	13
Tablo 4. İnhibitör varlığında genlerin transkripsiyon durumları	20
Tablo 5. Transkripsiyon sınıfının belirlenmesinde kullanılan primerler	50
Tablo 6. Promotor plazmitlerini oluşturmak için kullanılan primerler	55
Tablo 7. Muhtemel transaktivatör proteinlerin araştırılmasında kullanılan primerler ..	56
Tablo 8. Lusiferaz aktivite sonuçları	76
Tablo 9. Muhtemel transaktivatör başlangıç proteinlerinin DNA-bağlanma analizi	79

SEMBOLLER DİZİNİ

aa	: Aminoasit
APH	: Afidikolin
Ara-C	: Arabinosylcytosine (sitozin-1- β -D-arabinofuranozid)
bp	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
CHAPS	: 3 - [(3- kolamidopropil) dimetilamonya] -1 propansülfonat
CHX	: Siklohekzimid
CIV	: Chilo iridescent virus
CVPE	: CIV viral protein ekstraktı
dH ₂ O	: Damıtılmış su
DIG	: Digoxigenin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksi nükleozit trifosfat
DTT	: Dithiothreitol
EPDA	: Son nokta seyreltme deneyi
GPI	: Glukofosfatidilinositol
GFP	: Yeşil floresan proteini
gr	: Gram
ICTV	: Uluslararası virüs taksonomisi komitesi
IIV	: Invertebrate iridesent virüs
IFN	: İnterferon
kbp	: Kilobaz çifti
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilodalton
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
M	: Molar
MCP	: Majör kapsit proteini
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar

MOI	: Hücre başına düşen virüs sayısı
mRNA	: Mesajcı RNA
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
μ M	: Mikromolar
NBT/BCIP	: Nitro mavi tetrazolyum/5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat
NCLDV	: Nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
ORF	: Açık okuma zinciri
PBS	: Fosfat tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pfu	: Plak oluşturan ünite
pH	: H iyon konsantrasyonu
Pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferens
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon PCR
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
TF	: Transkripsiyon faktörü
Tm	: Erime sıcaklığı
TNF	: Tümör nekrozis faktör
VAS	: Viral birleşme bölgesi
vd.	: ve diğerleri

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Virüsler, bir organizmanın hücreleri içerisinde faaliyet gösterebilen, küçük ve enfeksiyon oluşturabilen ajanlardır. Hayvan ve bitkilerden mikroorganizmalara kadar tüm hücrenel yaşam formlarını enfekte edebilmektedirler. Omurgasız hayvanları enfekte eden virüsler altında bulunan böcek virüsleri oldukça geniş bir gruba oluşturmaktadırlar. Yararlı böcekler (örneğin bal arıları ve ipek böcekleri) için patojenik olan virüsler her yıl ipekböcekçiliği ve arıcılık endüstrilerine milyarlarca lira zarar vermektedir. Diğer taraftan, zararlı böcekler için patojenik olan virüsler ise biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılabilirler. Bu virüslerin bir diğer önemli özelliği de özellikle bakülovirüslerde olmak üzere hem böcek hem de memeli hücrelerinde gen ekspresyon ve gen transfer vektörleri olarak kullanılmak üzere ticari olarak geliştirilmiş veya geliştirilebilir olmalarıdır. Tüm bu faktörler, son yıllarda böcek virüsleri üzerine yapılan araştırmaların sayısında bir patlamaya yol açmış ve bu virüslerin moleküler ve hücrenel biyolojileri hakkında ciddi düzeyde bilgi üretilmektedir. Böcek virüslerinin büyük bir çeşitliliği olmasına rağmen, bunlardan askovirüs, iridovirüs, polidnavirüs, bakülovirüs, sipovirüs ve entomopoksvirüsler böcek popülasyonlarında sıklıkla görülen virüs gruplarını oluşturmaktadırlar (Demirbağ vd., 2008).

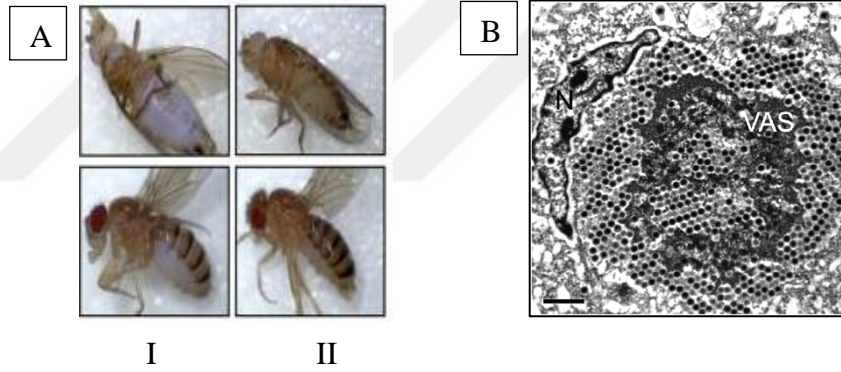
Bu virüslerden biri olan iridovirüsler *Iridoviridae* familyasına mensupturlar. *Iridoviridae* familyasının üyeleri iridoviridler olarak da adlandırılmaktadırlar. Iridoviridlerin omurgalı ve omurgasızları enfekte eden türleri bulunmaktadır. *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6) omurgasızlarda enfeksiyonlara sebep olan *Iridovirüs* cinsinin ve *Frog virüs 3* (FV3) ise omurgalılarda enfeksiyon yapan *Ranavirüs* cinsinin tip türleri olarak kabul edilmişlerdir (Chinchar vd., 2017). Bu iki virüs üzerinde yapılan çalışmalar, familyanın genel özelliklerinin anlaşılmasına yardımcı olmakta ve aynı zamanda diğer bütün DNA virüsleri için de model oluşturmaktadır.

Viral bir ajanın biyokontrol materyali, gen ekspresyon veya gen tedavi vektörü amacıyla kullanılabilmesi için moleküler mekanizmalarının çok iyi anlaşılması gerekir. Bu tez çalışmasının sonuçları bu açılarından da faydalı olacaktır. Omurgasız iridovirüsleri için model tür olarak kabul edilen IIV6 üzerine kurgulanarak gerçekleştirilen

bu tezde, virüse ait bütün genlerin transkripsiyon sınıflarının belirlenmesi, her bir gen grubuna ait promotor dizilerinin tespit edilmesi, virüs hücreye girdikten sonra replikasyona başlayabilmesi için gerekli transaktivatör proteinlerin araştırılması çalışmaları yapılmıştır.

1.2. Iridoviridae Familyası

Iridoviridae familyasının ilk üyesi 1954 yılında Claude Rivers ve Nick Xeros'un çalışmaları sonucu keşfedilmiştir (Williams, 1996). *Tipula paludosa* (çayır sineği)'dan izole edilerek 1971'de *Tipula iridescent virus* adı verilen bu virüs 1999'dan bu yana *Invertebrate iridescent virus 1* (IIV1) olarak bilinmektedir. Virüs enfeksiyonu böceklerde yanardöner, mavi-yeşil renkler oluşturduğu için virüsün adlandırılmasında gökkuşağı anlamındaki İngilizce "iridescent" kelimesi kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Iridovirid enfeksiyonu içeren konak görüntüleri. A-I: *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6) ile enfekte olmuş *Drosophila melanogaster*. A-II: Virüs ile enfekte olmamış *D. melanogaster* (Bronkhorst vd., 2012). B: *Singapore grouper iridovirus* (SGIV) ile enfekte olmuş embriyonik hücrelerde virüsün oluşturduğu parakristal dizilim (Liu vd., 2016). N: nükleus; VAS: viral birleşme bölgesi (viral assembly site). Ölçü bar: 1 µm.

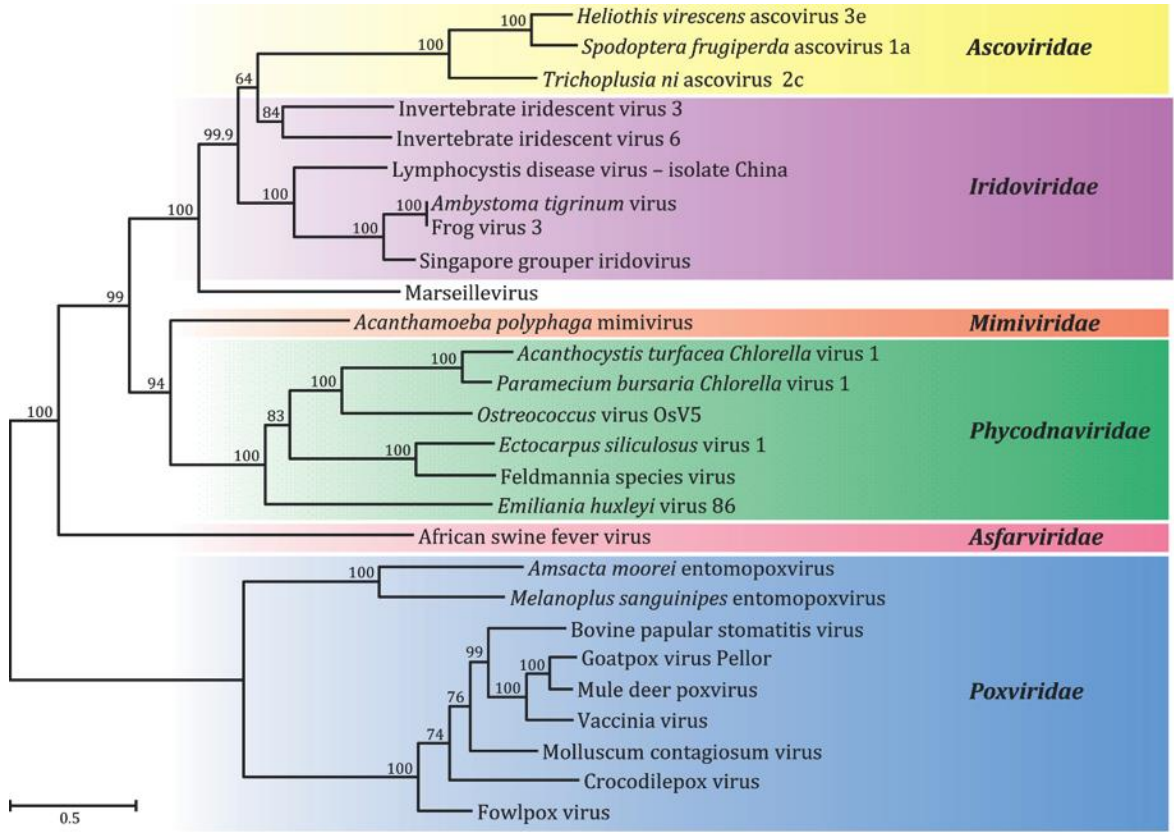
Iridoviridae familyası *Alphairidovirinae* ve *Betairidovirinae* olmak üzere iki alt familyaya ayrılır. Bu gruplandırma, her bir alt familyadaki virüslerin enfekte ettiği konak yelpazesi, virion partikül büyüklüğü, genomlarının GC içeriği, DNA'larının metillenme durumu ve majör kapsit proteinlerinin amino asit dizi benzerliği göz önünde bulundurularak yapılmıştır (Chinchar vd., 2017). *Alphairidovirinae* alt familyası *Ranavirus*, *Megalocytivirus* ve *Lymphocystivirus* olmak üzere üç cinsten oluşur ve bu grubun üyeleri

kemikli balıklar, amfibiler ve sürüngenler gibi özellikle soğukkanlı omurgalıları enfekte ederler. Dolayısı ile bunlar omurgalı iridovirüsleri olarak bilinirler. *Iridovirus* ve *Chloriridovirus* cinslerinin bulunduğu *Betairidovirinae* alt familyasının üyeleri ise böcekler ve kabuklular başta olmak üzere omurgasızları enfekte ederler ve dolayısı ile bunlar da omurgasız iridovirüsleri (IIVler) olarak bilinirler. *Iridovirus* cinsine ait üyelerle familya üyeleri arasında karışıklıktan kaçınmak için familyaya ait üyelerden iridovirus yerine iridoviridler olarak bahsedilmesine karar verilmiştir (Chinchar vd., 2017).

Bu familyaya ait bütün virüsler ikozahedral simetrik, 150-200 nm çapında olup 103-220 kbp arasında değişen çift zincirli, doğrusal ve büyük DNA genomuna sahiplerdir. Dönen çember replikasyonu ile oluşan konkatamerler yeni oluşacak virüslere aktarılırken hacim bağımlı mekanizma ile paketlenmiş, genom uçlarında dizi tekrarlarına (terminal tekrarlar) ve halkasal permütasyona sahiplerdir. Tekrarlanan bu diziler genoma %5-50 arasında değişen fazlalık kazandırır (Chinchar vd., 2017). Viral replikasyon döngüsü hem nükleus hem de sitoplazmada gerçekleştiği için bu virüsler nükleositoloplazmik büyük DNA virüsleri (NCLDV) grubuna dahil edilmişlerdir. Viral replikasyon çekirdekte başlar ve virion oluşumu ise sitoplazmada, virüse ait DNA parçalarının ve viral proteinlerin çokça bulunduğu viral olgunlaşma bölgesinde (virojenik stroma) meydana gelir. Virionlar sitoplazmada kalarak familyaya özgü parakristal dizi denilen yapılar oluşturabilirler ya da hücreyi parçalayarak dışarıya dağılırlar. Virionların bir kısmı da hücre zarından tomurcuklanarak ayrılır ve bu esnada zarf kazanırlar (Liu vd., 2016).

Virüslere ait filogenetik benzerlikler çalışılırken çoğunlukla virüslerin korunmuş gen dizileri arasındaki benzerlikler dikkate alınır. Iridoviridlerde kor proteinlerden olan D5 ATPaz, A32 ATPaz, A1L/VLTF2 transkripsiyon faktörü, majör kapsit proteini (MCP) ve viral DNA polimeraz, özellikle *Asfarviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* ve *Poxviridae* gibi diğer NCLDV'deki karşılık gelen proteinlerle amino asit dizisi benzerlikleri paylaşırlar (Şekil 2) (Boyer vd., 2009). Bu benzerlikler, söz konusu virüslerin ortak bir atadan geldiğini ve *Megavirales* adında yeni bir virüs takımının üyeleri oldukları önerisini desteklemektedir (Colson vd., 2013). Benzer şekilde iridoviridler, askovirüsler ve marseillevirüsler arasında ortak olan 9 gen dizisinin karşılaştırılması, askovirüslerle IIV'ler arasında yakın bir ilişki olduğunu, askovirüslerin IIV6 ve IIV3 ile ortak bir atadan geldiklerini doğrulamaktadır (Piegu vd., 2015). Ancak son zamanlarda yapılan genom dizileme çalışmaları sayesinde virüsleri birbirinden ayırmak ve sınıflandırmak için komple genom dizilerine dayalı olarak çizilen filogenetik ağaçlar daha

kuvvetli bir sınıflandırma yöntemi olarak görülmektedir. Bugüne kadar tüm genom analizi yapılmış, 42 tanesi omurgalıları ve 9 tanesi omurgasızları enfekte eden toplam 53 tane iridovirid bulunmaktadır (Tablo 1). Bunlardan iki tanesi (AMIV, *Anopheles minimus* iridovirus ve SHIV, *Shrimp hemocyte iridescent virus*) henüz herhangi bir sınıfa dahil edilmemiştir ve yapılan son filogenetik analizlere göre “*Xiairidovirus*” adında yeni bir cins olarak gruplandırılması planlanmaktadır (Huang vd., 2015; Qiu vd., 2018).



Şekil 2. Iridoviridlerin diğer nükleositoplazmik DNA virüsleri ile filogenetik ilişkisi. D5 tip ATPaz, DNA polimeraz B, A32 ATPaz, majör kapsit protein ve A1L/VLTF2 transkripsiyon faktörü gen dizileri açısından familyaların filogenetik analizi (Boyer vd., 2009; Jancovich vd., 2012).

Tablo 1. Gen bankasında genom dizisi veya DNA dizisi bulunan iridoviridler

Cins (Alt Familya)	Tür, Suş ve İzolat	Genom Büyüküğü (bp)	ORF Sayısı	GC İçeriği	GenBank Erişim Numarası	Referans
<i>Iridovirus</i>	<u>IIV1</u>	ND	ND	ND	M33542 ^a	(Tajbakhsh, 1990)
	<u>IIV6</u> [#]	212,482	215	28.63	AF303741	(Jakob vd., 2001)
	<u>IIV31</u>	220,222	203	35.09	HF920637	(Piegu vd., 2014)
<i>Chloriridovirus</i>	<u>IIV3</u> [#]	191,132	126	48	DQ643392	(Delhon vd., 2006)
	<u>IIV9</u>	205,791	191	31	GQ918152	(Wong vd., 2011)
	<u>IIV22</u>	197,693	167	28.05	HF920633	(Piegu vd., 2013)
	<u>IIV22A</u>	196,456	174	28	HF920634	(Piegu vd., 2014)
	<u>IIV25</u>	204,815	177	30.32	HF920635	(Piegu vd., 2014)
	<u>IIV30</u>	198,533	177	28.1	HF920636	(Piegu vd., 2014)
<i>Ranavirus</i>	<u>ADRV</u>	106,734	101	55	KC865735	(Chen vd., 2013)
	<u>ATV</u>	106,332	96	54	AY150217	(Jancovich vd., 2003)
	<u>BIV-ME</u>	103,531	100	55.2	KX185156	(Hick vd., 2016)
	CGSI-HN1104	105,375	111	55.2	KF512820	Yayımlanmamış
	CH8/96	105,811	75	55	KP266741	(Stohr vd., 2015)
	<u>CMTV/2008/E</u>	106,878	104	55.3	JQ231222	(Mavian vd., 2012)
	<u>CMTV/2013/NL</u>	107,772	104	55.3	KP056312	(van Beurden vd., 2014)
	CodV	114,865	98	54.9	KX574342	(Ariel vd., 2016)
	DFV	ND	ND	ND	AF157665 ^a	(Ohlemeyer, 2011)
	<u>ECV-13051/2012</u>	127,751	135	54.2	KT989884	Yayımlanmamış
	<u>ECV-14612/12</u>	127,549	136	54	KT989885	Yayımlanmamış
	<u>EHN</u>	127,011	100	54.05	NC028461	(Jancovich vd., 2010)
	ESV	127,732	136	54.23	JQ724856	(Mavian vd., 2012)
	<u>FV3</u> [#]	105,903	98	55	AY548484	(Tan vd., 2004)
	GGRV	103,681	73	55	KP266742	(Stohr vd., 2015)
	GIV	139,793	120	49	AY666015	(Tsai vd., 2005)
	<u>ATV-GUFFY</u>	106,437	99	54	KR075882	(Jancovich vd., 2005)
	GV6	ND	ND	ND	AF157671 ^a	(Ohlemeyer, 2011)
	LMBV	ND	ND	ND	FR682503 ^a	(Ohlemeyer, 2011)
	PPIV	108,041	109	55.3	KX574341	(Holopainen vd., 2016)
	RCV-Z	106,890	98	55	MF187210	(Claytor vd., 2017)
	REV 282/102	107,444	101	55.2	MF538628	(Ariel vd., 2017)
	RGV	105,791	106	55	JQ654586	(Lei vd., 2012)
	Rmax	115,510	100	54.9	KX574343	(Ariel vd., 2016)
	<u>ATV-RRV</u>	106,971	102	54.1	KR075879	(Epstein ve Storfer, 2015)
	SERV	126,965	111	54.7	KX353311	(Subramaniam vd., 2016)
	<u>SGIV</u>	140,131	162	48.64	AY521625	(Song vd., 2004)
SSME	105,070	95	55	KJ175144	(Morrison vd., 2014)	
STIV	105,890	105	55.1	EU627010	(Huang vd., 2009)	
TFV	105,057	105	55.01	AF389451	(He vd., 2002)	
ToRV-1	103,876	76	55	KP266743	(Stohr vd., 2015)	

[#] İlgili cinse ait tip türünü göstermektedir.

Altı çizili olanlar ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından tür olarak kabul edilen virüs isimlerini belirtmektedir.

^a Genom dizisi henüz belirlenmemiştir. Erişim numarası sadece MCP'ye aittir.

ORF: Açık okuma zinciri, ND: Belirlenmemiş (not determined).

Tablo 1'in devamı

Cins (Alt Familya)	Tür, Suş ve İzolat	Genom Büyüküğü (bp)	ORF Sayısı	GC İçeriği	GenBank Erişim Numarası	Referans
<i>Lymphocystivirus</i>	LCDV-1 [#]	102,653	108	29.1	NC_00182	(Tidona ve Darai, 1997)
	LCDV-C	186,250	239	27.2	AY380826	(Zhang vd., 2004)
	LCDV-Sa	208,501	183	33	KX643370	(Lopez-Bueno vd., 2016)
<i>Megalocytivirus</i>	GSIV-K1	112,565	135	53.02	KT804738	(X. Y. Chen vd., 2016)
	ISKNV [#]	111,362	125	54.8	AF371960	(He vd., 2001)
	LYCIV	111,760	ND	53.92	AY779031	(Kurita ve Nakajima, 2012)
	OSGIV	112,636	126	54	AY894343	(Lu vd., 2005)
	RBIV- KOR-TY1	112,080	116	53	AY532606	(Do vd., 2004)
	RSIV	112,415	93	54	AB104413	(Nakajima ve Kunita, 2005)
	SDDV	124,244	129	37	KR139659	(de Groof vd., 2015)
TRBIV	110,104	115	55	GQ273492	(Shi vd., 2010)	
Sınıflandırılmamış	AMIV	163,023	148	39	KF938901	(Huang vd., 2015)
	SHIV	165,809	170	34.6	MF599468	(Qiu vd., 2018)

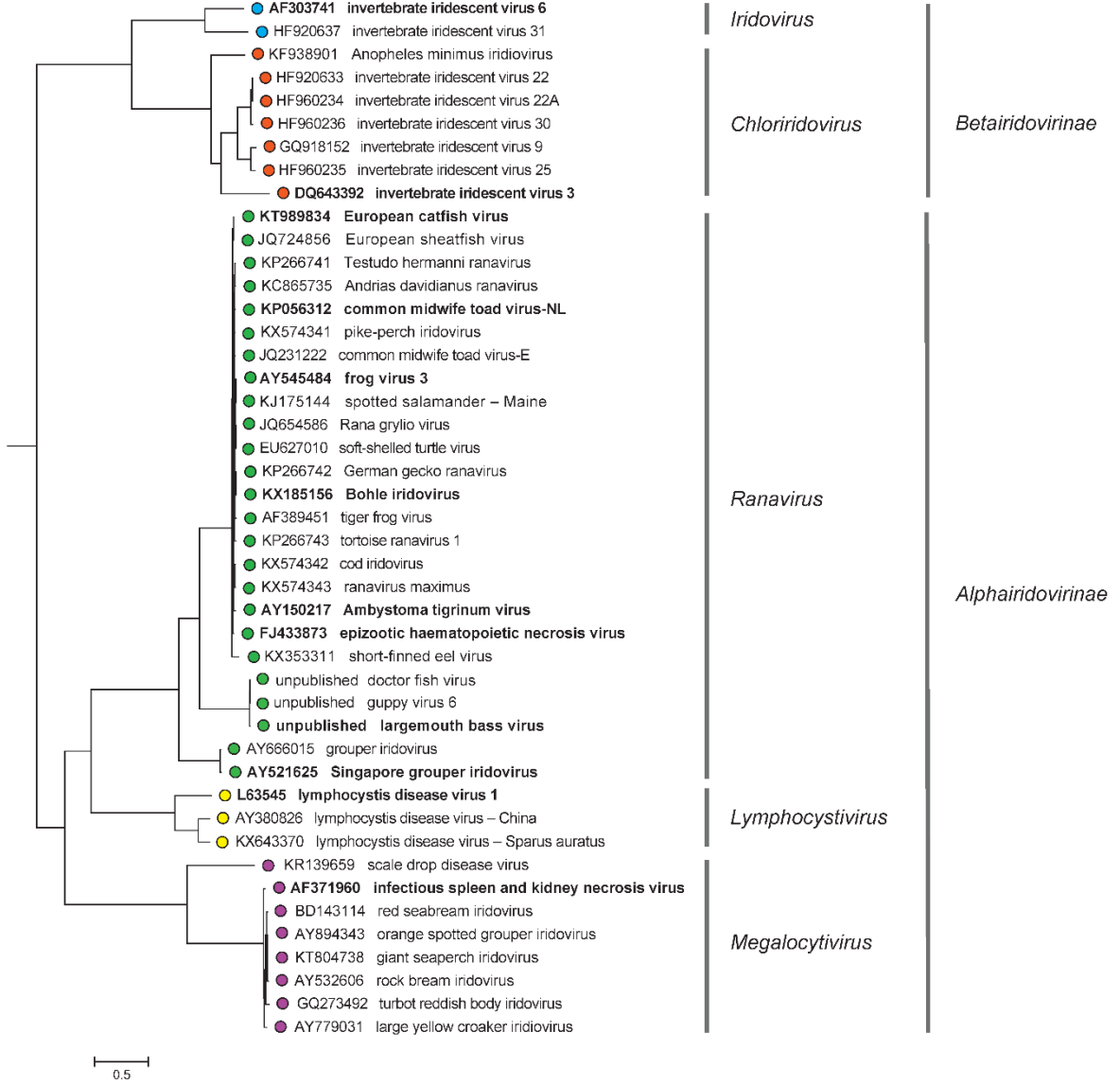
Iridoviridae familyasına mensup 5 cinsin üyelerinin genel özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir. *Alphairidovirinae* alt familyası üyeleri virüs tarafından kodlanan DNA metiltransferaz sayesinde genomlarındaki sitozinlerin yaklaşık %25'ini metillemektedirler (Chinchar vd., 2009). Ancak, *Ranavirus* cinsi üyelerinden olan *Singapore grouper iridovirus* (SGIV) ve *Grouper iridovirus* (GIV) DNA metiltransferaz kodlamadıkları için metilasyondan yoksundurlar. DNA metilasyonunun görevi tam olarak bilinmiyor olsa da metilasyona ihtiyaç duyan virüslerin bu özelliği engellendiğinde virüs artışında gerileme ve viral DNA sentezinde bozulmalar olduğu görülmüştür (Goorha ve Dixit, 1984). *Betairidovirinae* alt familyası üyelerinde DNA metilleme özelliği bulunmamaktadır. Virüsleri sınıflandırırken en önemli kriterlerden biri de korunmuş protein dizi benzerlikleridir. MCP tüm iridoviridlerde korunmuş olarak bulunan ve virion yapısının büyük bir kısmını oluşturan önemli bir proteindir. Bu proteinin amino asit dizisi aynı cins içinde bulunan iridoviridler arasında %70'ten fazla benzerlik gösterirken, farklı cinslerde bulunan iridoviridler arasında %50'den azdır.

Tablo 2. Iridoviridlerin sınıflandırılmasında kullanılan özellikler

Alt Familya	Cins	Virion Büyüklüğü	Konak	GC İçeriği	DNA Metilasyonu
<i>Betairidovirinae</i>	<i>Iridovirus</i>	120–130 nm	Eklembacaklılar, özellikle böcekler	%29–32	Yok
	<i>Chloriridovirus</i>	180 nm	Çift kanatlılar, özellikle sivrisinekler	%48	Yok
<i>Alphairidovirinae</i>	<i>Ranavirus</i>	150 nm	Sürüngenler, Amfibiler ve Kemikli balıklar	%54	Var
	<i>Lymphocystivirus</i>	198–227 nm	Deniz ve tatlı su balıkları Yassı Balıklar	%29,1–33	Var
	<i>Megalocytivirus</i>	140–200 nm	Deniz balıkları	%54,8	Var

Aynı cins bünyesinde bulunan virüsler, genomik seviyede genellikle %50'den fazla nükleotit veya amino asit dizi benzerliği gösterirler. Bu benzerlik %90'dan daha fazla olursa bu virüsler aynı tür veya aynı türe ait izolat/suş olarak kabul edilir. Ancak, ranavirüslerden FV3, ATV ve EHNV %90'dan fazla dizi benzerliği göstermesine rağmen, konak yelpazelerinin ve genomik organizasyonlarının farklı olmasından dolayı farklı türler olarak değerlendirilmişlerdir. Familyanın tüm üyelerinde korunmuş 26 gen dizisinin benzerliğine göre oluşturulan filogenetik analizde ranavirüsler üç, megalositivirüsler iki ve lenfosistivirüsler iki/üç gruba ayrılmıştır. Daha önce herhangi bir sınıfa yerleştirilmeyen ve ICTV'nin 9. raporunda *Iridovirus* cinsine dahil edilen bazı iridoviridler (IIV9, IIV22, IIV22a, IIV25, IIV30 ve AMIV) IIV3'e daha yakın çıkmış ve *Chloriridovirus* cinsine dahil edilmişlerdir (Şekil 3).

Iridoviridae familyasına ait virüsler, biyolojik kontrol materyali olarak kullanılabilme potansiyelleri (D'Costa vd., 2012) ve kültürü yapılan balık gibi özellikle sucul hayvanlarda ölümcül enfeksiyonlara sebep olmalarından dolayı önem kazanmıştır (Williams vd., 2005).



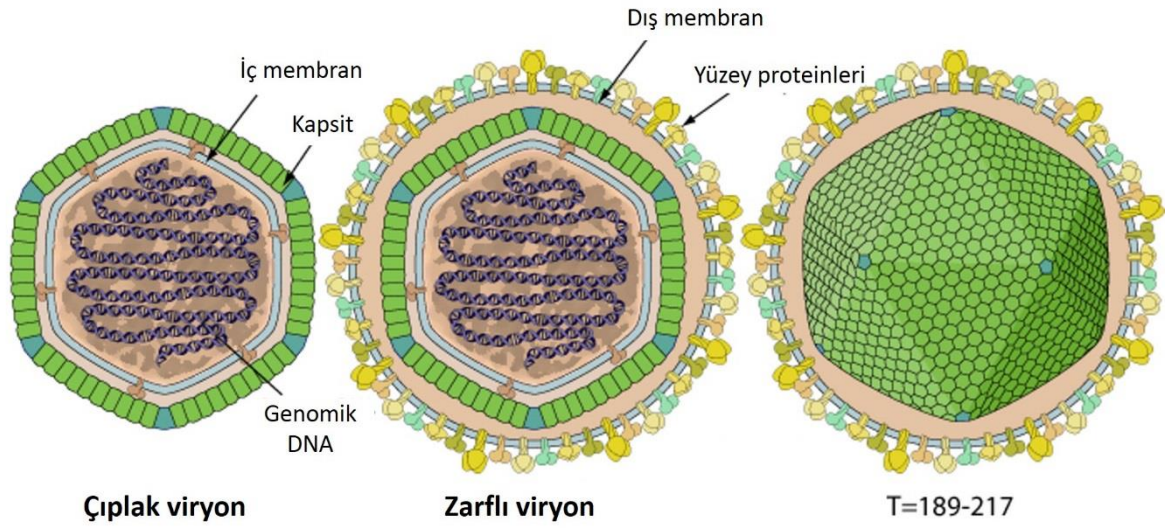
Şekil 3. *Iridoviridae* familyası üyelerinin filogenetik analizi. Virüs isimleri baş kısımlarında erişim numaraları ile verilmiştir. Koyu yazılanlar ait oldukları grubun model organizmasını temsil etmektedir. Filogenetik ağaç, tüm genom analizi yapılan 45 farklı iridovirid arasında 26 kor gene ait amino asit dizisinin birleştirilmesiyle IQTREE programı kullanılarak çizilmiştir (Chinchar vd., 2017).

1.3. Iridoviridlerin Morfolojisi

Her bir virüs partikülü, en dışta protein yapıda kapsit tabakası, ortada lipit bir membran ve en içte de DNA ve proteinlerin etkileşim halinde bulunduğu öz (kor) bölge olmak üzere toplam üç tabakadan oluşur (Şekil 4) (Williams, 1998; Yan vd., 2000; Yan vd., 2009). Bazı

virionlar ise kapsit tabakasının üzerinde ilave bir zarf bulundurabilirler. Bu zarf tabakasını virüsler konak hücre içerisindeki yaşam döngülerini tamamladıktan sonra hücre membranından tomurcuklanarak ayrılmaları esnasında kazanırlar. Tomurcuklanma yapmadıkları zaman ise çok sayıda çıplak virion bir araya gelerek parakristal dizi adı verilen yapılar oluştururlar. İçerisi virüs ile dolan hücre parçalanır ve virüsler zarfsız şekilde dış ortama salınırlar. Zarflı veya zarfsız oluşan her virionun enfeksiyon yapma yeteneği vardır (Williams ve Ward, 2010). Ancak zarflı virionlar konağa özgü enfektivite bakımından daha etkili (150 kata kadar) olduklarından dolayı, zarf yapısında bulunan bazı proteinlerin virüs konak etkileşimlerinde önemli görevleri olduğu düşünülmektedir (Braunwald vd., 1979; Gendrault vd., 1981). Zarf yapısına sahip olan iridoviridler konak hücreye reseptör bağımlı endositozla girerken, zarfsız iridoviridler hücre zarından pinositoz veya kaveola bağımlı endositozla girerler (Wang vd., 2014).

Virion yapısının en iç kısmında bulunan öz, 12.5 kDa ana bileşenle birlikte büyüklüğü en fazla 81 kDa olan en az 5 polipeptitten oluşur (Cerutti ve Devauchelle, 1985). Diğer DNA virüslerinden farklı olarak öz kısmın üzerini 4 nm kalınlıkta bir lipit tabaka kaplar. Bu tabaka kuru virion ağırlığının %5-9'unu oluşturur ve büyük kısmı (%44-75) fosfolipittir. Viral lipit membranın ana bileşenlerinden olan glukofosfatidilinositol (GPI), posttranslasyonel modifikasyonlar esnasında proteinlerin C-ucuna bağlanırlar. GPI bağlı bu proteinler, hücre dışı reseptörler, hücre yüzey antijenleri ve hücre tutunma molekülleri gibi kilit rollerde görev alarak hücre dışı proteazlara ve lipazlara bağlanma yüzeyi sağlarlar (Low, 1989). Ancak bu lipit membranla kaplı öz, enfeksiyon yapma özelliğinden yoksundur (Wagner vd., 1975). Virionlarda bulunan bu lipit tabakanın içeriği konak hücrenin lipit membranından farklı olduğu için, virüslerin bu membranı muhtemelen konak hücreden almadığı, enfeksiyon sürecinde *de novo* olarak ürettiği düşünülmektedir (Balange-Orange ve Devauchelle, 1982). Tüm iridoviridlerde ortak olarak bulunan MCP, 48-55 kDa moleküler ağırlığına sahiptir ve virionların kuru ağırlığının yaklaşık %45'ini oluşturur.



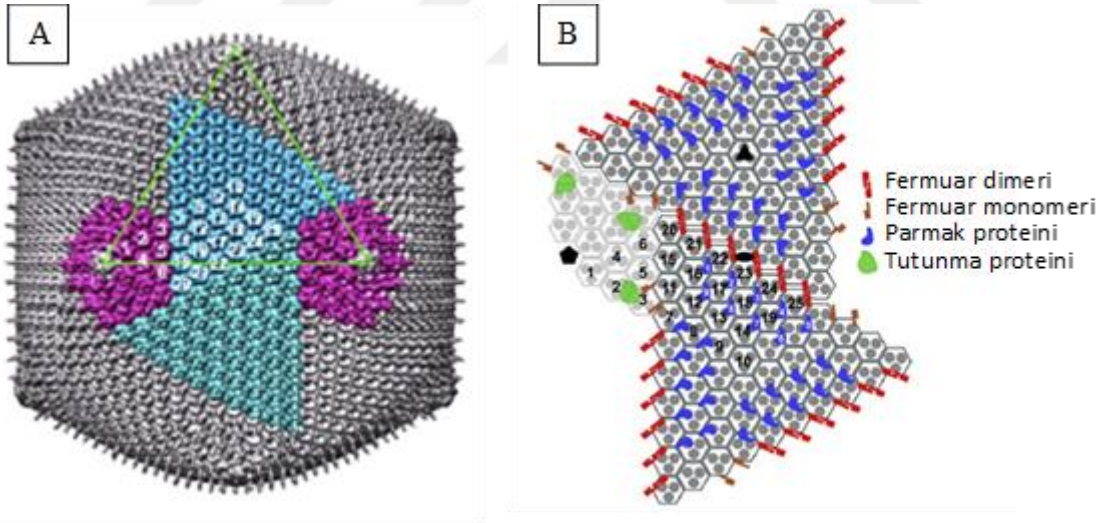
Şekil 4. Iridoviridlerde virion iç ve dış yapısının şematik görünümü. (ViralZone: www.expasy.org/viralzone sitesinden Türkçeleştirildi)

Iridoviridlerin morfolojik yapılarını belirlemek için yapılan çalışmalar çoğunlukla IIV6 üzerinde gerçekleştirilmiştir. IIV6 virionları iki (kenarlara göre), üç (eşkenar yüzlere göre) ve beş (köşelere göre) farklı eksen açısından bakıldığında, sırasıyla 162, 165 ve 185 nm çaplarında olduğu tespit edilmiştir (Jankovich vd., 2012). Elektron mikroskop (EM) ve kriyo-EM çalışmalarına göre her bir partikül 12 pentasimetron (beşgen) ve 20 trisimetrondan (eşkenar üçgen) oluşan ikozahedral bir yapıdadır (üçgenleşme sayısı, $T=147$) (Yan vd., 2009). Bu yapıların her ikisi de her bir virionda toplam 1460 tane bulunan altıgen şekilli (heksavalent) kapsomerlerden oluşur. Bu kapsomerler türler arasında oldukça yüksek oranda korunmuş olan MCP'den oluşmuşlardır (Tidona vd., 1998). Her bir kapsomer dış yüzeyde kovalent olarak bağlı olmayan üçlü (trimer) MCP ve iç yüzeye disülfid bağlarla bağlı ikinci bir üçlü MCP içerir (Cerutti ve Devauchelle, 1985; 1990). Bunlara ek olarak kapsit yapısında bulunan ve lipid membranla etkileşim halinde olan fermuar (zip, 11,9 kDa) monomerleri, fermuar dimerleri, parmak proteinleri (finger, 19,7 kDa) ve tutunma proteinleri (anchor, 32,4 kDa) adı verilen minör kapsit proteinleri bulunmaktadır. Bazı iridoviridlerde kapsidin dış yüzeyi yaklaşık 2,5 nm uzunlukta esnek fibrillerle kaplanmış olabilir.

Iridoviridae familyasının farklı üyeleri arasında nükleotit dizi analizi belirlenmiş 100'den fazla açık okuma zincirinden (open reading frame, ORF) 26 tanesinin tüm iridoviridlerde ortak olduğu belirlenmiştir (Tablo 3) (Eaton vd., 2007; Eaton vd., 2010). Viral proteinleri katalitik, yapısal ve virülansla ilgili olanlar olmak üzere üç kategoriye

ayırmak mümkündür. Bu 26 korunmuş ORF'nin büyük kısmını katalitik proteinler oluşturur ve bunların içerisinde virüs tarafından kodlanan DNA polimeraz, RNA polimeraz II viral homologunun (vPOL-II) iki büyük alt ünitesi ve ribonükleotit redüktaz küçük alt ünitesi bulunmaktadır. Proteinlerin gruplandırılması çoğunlukla veri tabanındaki diğer proteinlerle benzerliklerine dayanılarak yapılır ve fonksiyonları “muhtemel” adı altında tahminen belirtilir. Ancak sonradan her birinin görevinin deneylere dayalı olarak doğrulanması gerekir. Örneğin; antisens morfolino oligonükleotit kullanarak vPOL-II α 'nın susturulması sonucu geç viral gen ifadelerinde ciddi oranda azalma görüldüğü için bu proteinin viral transkriptaz görevi gördüğü desteklenmiştir (Sample vd., 2007).

İridovirid partikülleri yapısal ve virionla ilişkili proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan bir komplekstir. MCP, fermuar, parmak ve tutunma proteinleri gibi yapısal elementlerin yanı sıra, virionlar büyüklükleri 5-250 kDa arasında değişen 30'dan fazla ilave protein içerirler (Şekil 5). MCP, tüm iridoviridler arasında yüksek oranda korunduğu için amino asit dizisi virüs tanımlama ve filogenetik analizlerde kullanılır.



Şekil 5. *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6)'da kapsit simetrisi ve minör kapsit proteinlerinin organizasyonu. A: IIV6, 20 trisimetron (biri açık ve diğeri koyu mavi renkli) ve 12 pentasimetron (pembe renkli) yapıdan oluşur. İkozahedronun bir üçgen yüzeyi yeşil çizgi ile gösterilmiştir. B: IIV6'nın minor kapsit proteinlerinin dizilimi (Yan vd., 2009).

Virion yapısına şekil ve bütünlük bakımından destek sağlayan standart yapısal proteinlere ek olarak viral replikasyonda önemli rol oynayan virion-ilişkili çok sayıda protein mevcuttur. Bunlara örnek olarak virion tarafından kodlanan ve en erken viral genlerin ifade edilmesini sağlayan muhtemel bir transkripsiyonel transaktivatör protein ve HIV6'nın yapısında bulunan en az 6 tane DNA-ilişkili protein verilebilir. Ayrıca protein kinaz, nükleotit fosfohidrolaz, ss/dsRNA özgül ribonükleaz, deoksiribonükleazlar, protein fosfataz ve konağın makromolekül sentezini inhibe etmesini tetikleyen protein gibi virion-ilişkili enzimatik aktivitesi olan çok sayıda protein tanımlanmıştır. Tüm bu polipeptitlerin yanı sıra bazıları tüm iridoviridler tarafından kodlanan ve katalitik protein olduğu düşünülen ve BLAST analiziyle belirlenmiş çeşitli proteinler tanımlanmıştır (Tablo 3).

Son olarak sınırlayıcı çevre koşullarında viral replikasyonu artıran veya konağın immün cevabını engelleyen birkaç muhtemel virülans ve immün kaçış proteinleri tespit edilmiştir (Grayfer vd., 2015). Virülansla ilgili olan grupta timidin kinaz, dUTPaz ve viral enfeksiyon boyunca deoksiribonükleotit havuzlarının devamlılığını sağlayan ribonükleotit redüktazın viral homologları bulunurken, immün cevapla ilgili olan ikinci grupta bağışıklığı durdurma görevi yapan vCARD, vIF-2 α , vRNaz III ve β -steroid dehidrojenaz bulunmaktadır. Örneğin, ökaryotlarda translasyon başlama faktörü eIF-2 α 'nın viral homoloğu olan vIF-2 α , protein kinaz R'nin aracılık ettiği translasyonel durmayı engeller ve enfeksiyon boyunca viral protein sentezini sürdürür (Rothenburg vd., 2011).

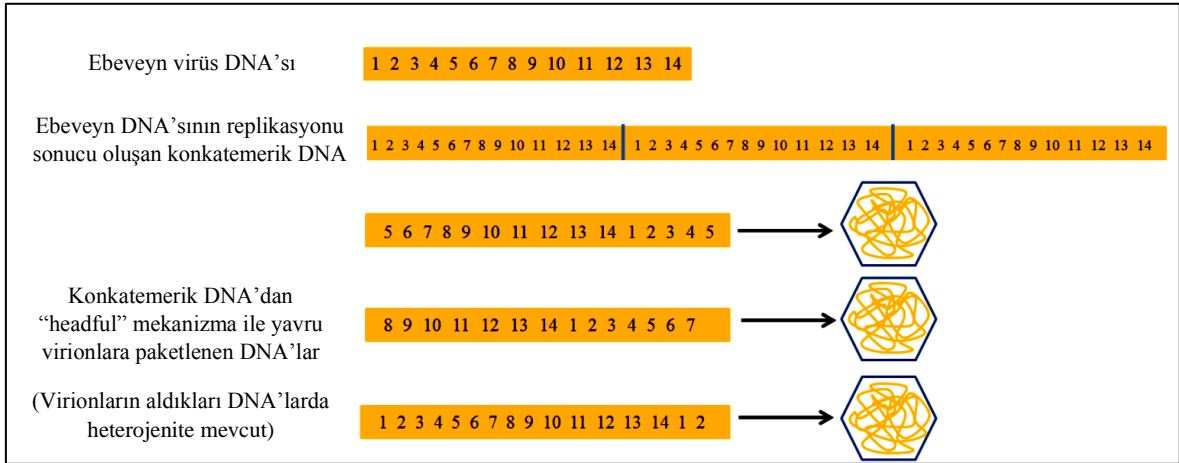
Tablo 3. *Iridoviridae* familyasına ait korunmuş genler *

Kategori	Gen Adı	Ranavirus							Lymphocystivirus		Megalocytivirus			Iridovirus	Chloriridovirus
		FV3	STIV	TFV	EHN	ATV	SGIV	GIV	LCDV-1	LCDV-C	ISKNV	RBIV	OSGIV	IIV6	IIV3
Katalitik	Muhtemel replikasyon faktörü ve/veya DNA bağlanma/paketleme proteini	1R	1R	105R	100R	91R	116R	79R	162L	181R	61L	57L	60L	282R	79L
Yapısal	Miristilli membran proteini	2L	2L	2L	1L	1L	19R	4R	160L	38R	90.5L	85L	88.5L	337L	47R
Katalitik	DNA bağımlı RNA Pol II α alt ünitesi	8R	10R	8R	7R	6R	104L	71L	16L	191R	28L	29L	31L	176R,343L	90L
Katalitik	NTPaz/Helikaz	9L	11L	9L	8L	7L	60R	36R	132L	75L	63L	59L	63L	022L	87L
Bilinmiyor	Bilinmiyor	12L	14L	12L	95R	87R	118R	80R	108L	100L	96L	89.5L	93L	287R	56L
Katalitik	DNA paketlemesi için gerekli, poksivirüs A32'ye benzer AAA-ATPaz	15R	16R	16R	92L	83R	134L	90L	54R	114L	122R	116R	119R	075L	88R
Katalitik	Serin/treonin protein kinaz	19R	21R	19R	89L	80L	39L	21L	10L	45R	55L	53L	56L	380R	10L
Katalitik	Helikaz ailesine ait protein	21L	24L	21L	86R	78R	54R	32R	6L	7L	56L	54L	57L	067R	4R
Katalitik	DNA replikasyonuna katılan D5 ailesi NTPaz	22R	25R	22R	85L	77L	52L	31L	128L	80L	109L	101L	106L	184R	121R
Katalitik, Virulans	Muhtemel tirozin kinaz/LPS modifiye eden enzim	27R	31R	29R	62R	58R	78L,81L	52L	195R	173R	114L	106L	111L	179R,439L	35R
Virulans	NIF-NLI etkileşim faktörü	37R	41R	40R	72R	64R	61R	37R	82L	148L	5L	6L	6L	355R	104L
Katalitik	Vaksinya virüs erken transkripsiyon faktörü	41R	45R	45R	77R	69R	57L	35L	163R	235R	76L	72L	75L	295L	16R
Yapısal	Miristilli membran proteini	53R	55R	55R	53L	51L	88L	59L	67L	158R	7L	8L	8L	118L,458R	6R
Katalitik	Serin/treonin protein kinaz	57R	60R	59R	58L	47L	150L	100L	143L	178L	13R	13R	15R	098R	98L
Katalitik	DNA polimeraz ailesi B eksonükleazı	60R	63R	63R	44L	44L	128R	87R	135R	203L	19R	20R	22R	037L	120L
Katalitik	DNA bağımlı RNA Pol II β alt ünitesi	62L	64R	65L	43R	43R	73L	46L	25L	25R	34R	33R	36R	428L	9R
Katalitik, Virulans	Ribonükleotid redüktaz, küçük alt birim (RR α)	67L	71L	71L	38R	38R	47L	26L	27R	41L	24R	26R	27R	376L	48L
Katalitik, Virulans	RNaz III	80L	87L	85L	24R	25R	84L	55L	137R	187R	87R	83R	85R	142R	101R
Katalitik	Transkripsiyon uzama faktörü TFIIS	81R	88R	86R	23L	24L	85R	56R	171R	115R	29L	29.5L	32L	349L	55R
Katalitik	Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA)	84R	91R	90R	19L	20L	68L	41L	3L	197L	112R	103R	109R	436R	60L
Katalitik	Deoksintikleozit kinaz	85R	92R	91.5R	18L	19L	67L	40L	136R	27R	32R	31R	34R	143R	29R
Katalitik, Virulans	Tiyol oksidoredüktazların Erv / Alr ailesi	88R	94R	94R	16L	16L	70R	43R	106L	142L	43L	43.5L	45L	347L	96R
Yapısal	Majör kapsit protein (MCP)	90R	96R	96R	14L	14L	72R	45R	147L	43L	6L	7L	7L	274L	14L
Bilinmiyor	En erken protein ICP-46	91R	97R	97R	13L	13L	162L	108L	47L	162R	115R	108.5R	112R	393L	39R
Katalitik	Uvr/REP Helikaz	94L	99L	100R	11L	11L	98R	67R	19R	153L	86R	82.5R	84.5L	307L	33L
Katalitik	Muhtemel RAD2 tipi nükleaz	95R	100R	101R	10L	10L	97L	66L	191R	169R	27L	28L	30L	369L	76L

*R ve L harfleri gen bölgelerinin ilgili virüs genomundaki yönünü temsil etmektedir R (Right), düz; L (Left), ters.

1.4. Iridoviridlerin Genom Özellikleri ve DNA Replikasyonu

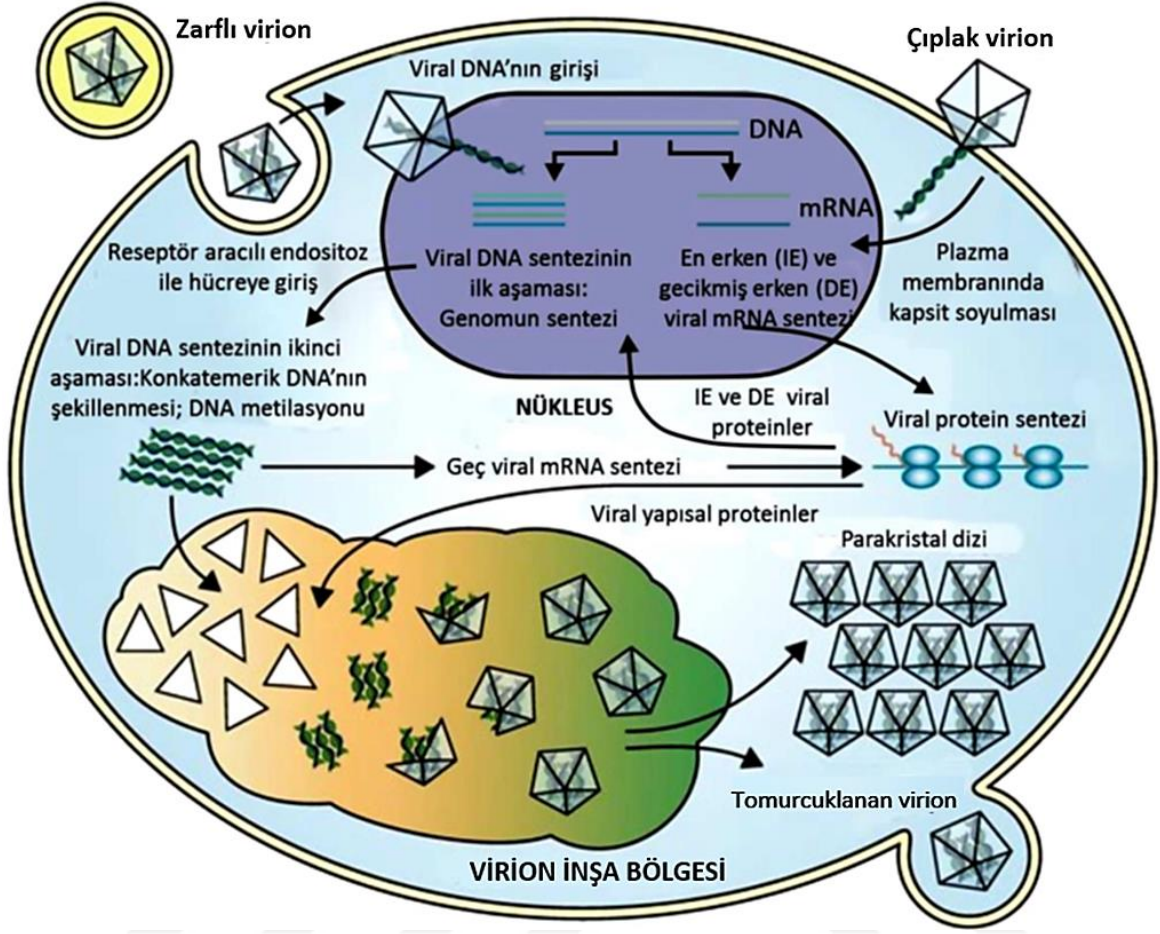
Iridoviridae familyasının üyeleri büyük DNA genomuna sahip virüslerdendir. Genom büyüklüğü 103-220 kbp arasında değişen bir DNA molekülü olabildiği gibi, genomlarındaki terminal tekrarlardan dolayı genom içeriği %5-50 daha fazla olabilir (140-303 kbp). Virion partikül ağırlığının %12-16'sını DNA oluşturur ve G+C içeriği %27-55 arasında değişiklik gösterir. Familya içerisinde bulunan bütün virüslerin genomunda halkasal permütasyon ve terminal tekrarlar görülür (Şekil 6). *Alphairidovirinae* alt familyasına dahil edilen virüs genomlarında (GIV ve SGIV hariç) yüksek oranda metilasyon görülürken, *Betairidovirinae* familyasının üyelerinde metilasyon olmaz (Ince vd., 2018). LCDV1 (103 kbp) hariç *Lymphocystivirus*, *Iridovirus* ve *Chloriridovirus* (163-220 kbp) cinslerine ait tüm üyelerin genomları, *Megalocytivirus* ve *Ranavirus* (103-140 kbp) cinslerine ait üyelerin genomlarından daha büyüktür. SGIV dışında *Ranavirus* cinsinin bütün üyeleri belirgin eş-doğrusal gen dizilimi gösterme eğilimindedir. Ancak yine de bütün iridoviridlerde inversiyon ve delesyonlar tespit edilmiştir. DNA molekülünün her iki zinciri üzerinde muhtemel ORF'ler vardır, ancak üst üste çakışan ve kodlama yapan genler nadir görülür. Genom üzerinde genlerin olduğu bölgeler çoğunlukta ve genler arası bölgeler genellikle kısadır. Genom, tekrar dizileri içermektedir. Ökaryotların aksine iridoviridler intron bölgeler içermez ve viral mRNA'ların poliA kuyrukları yoktur. Fakat biyokimyasal ve *in silico* analizler ökaryotlara benzer olarak viral gen ifadesini değiştiren viral mikroRNA (miRNA)'ların varlığını desteklemektedir. Çıplak viral DNA tek başına enfeksiyon yapma yeteneğinden yoksundur, ancak virion yapısında bulunan proteinlerin (yapısal proteinler) varlığında viral DNA tekrar enfeksiyon yapma özelliğini geri kazanmakta ve yeni virionlar oluşmaktadır (Cerutti vd., 1989; Nalcacioglu vd., 2003; Willis ve Granoff, 1985).



Şekil 6. İridoviridlerde hacim bağımlı DNA paketlenme mekanizması, halkasal permütasyon ve dizi tekrarları.

Viral DNA replikasyonu, konak hücrenin nükleusunda başlar ve sitoplazmasında devam eder. İki aşamalı DNA replikasyonuna sahip oldukları için bu virüsler "nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri (NCLDV)" olarak adlandırılır. İridoviridler diğer NCLDV'lerden (nükleopolihedrovirüsler, NPV'ler; granulovirüsler, GV'ler; sitoplazmik polihedrovirüsler, CPV'ler ve entomopoksvirüsler, EPV'ler) farklı olarak koruyucu bir protein matriks içine gömülü değildirler (Williams, 1998).

İridoviridlerde genom replikasyon modeli *Ranavirus* cinsinin tip türü olan *Frog virüs 3* (FV3) üzerinde yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır (Chinchar vd., 2009; Jancovich vd., 2015; Williams vd., 2005). Tam mekanizması açıklığa kavuşmamış olsa da zarflı partiküller reseptör aracılı endositozla hücre içine girerken, zarfsız olanlar ise plazma membranında kapsit yapısı çözüldükten sonra pinositoz veya kaveola bağımlı endositoz gibi farklı yollarla hücre içine girebilirler (Wang vd., 2014). Kapsit yapısı çözüldükten sonra açığa çıkan viral DNA özü doğruca nükleusa girer (Şekil 7).



Şekil 7. *Frog virus 3* (FV3)'ün replikasyon stratejisi. Replikasyon nükleusta başlar. Erken viral transkriptlerin sentezi ve genomun iki katına çıkması burada gerçekleşir. DNA genomları daha sonra replikasyonun ikinci aşamasının gerçekleşeceği sitoplazmaya transfer edilir. Geç viral mRNA'lar virüs tarafından kodlanan çoklu alt üniteye sahip transkriptaz tarafından sentezlenir. Virion birleşme bölgesinde oluşan yeni virüs partikülleri hücre içinde kalarak parakristal diziler oluşturur veya tomurcuklanarak hücre dışına çıkarlar (Chinchar vd., 2017).

Viral DNA sentezinin ilk aşaması nükleusta meydana gelir. DNA replikasyonundan önce nükleusta en erken genlerin transkripsiyonu gerçekleşir. Iridovirüslerde genler üç farklı aşamada transkripsiyona uğramaktadırlar. Bu aşamalar; en erken (IE), gecikmiş erken (DE) ve geç (L) şeklinde sınıflandırılır. Bu aşamalardan IE ve DE grubuna dahil olan genlerin transkripsiyonu nükleusta gerçekleşir. Nükleusta, mekanizması tam bilinmemekle birlikte, virion ilişkili bir veya daha fazla protein transkripsiyonel transaktivatör olarak görev yapar ve konağa ait RNA polimeraz II viral DNA'yı kalıp olarak kullanarak viral IE mRNA'ları sentezlemek üzere yönlendirilir. IE ve DE viral transkriptler tarafından kodlanan gen ürünleri düzenleyici ve katalitik proteinlerdir. Bu gen ürünlerinden biri, ilk viral genomu

kalıp olarak kullanarak viral DNA sentezinin ilk aşamasını katalizleyen viral DNA polimerazdır. Yeni oluşan bu viral DNA'lar daha fazla DNA replikasyon döngüsü, erken transkripsiyon veya viral DNA sentezinin ikinci aşaması için viral DNA'nın sitoplazmaya aktarılmasında kullanılır. Sonuç olarak sitoplazmada uzun konkatemerler oluşmuş olur. Viral DNA metilasyonu da sitoplazmada gerçekleşir. Bunun tam olarak ne için gerekli olduğu henüz bilinmese de viral DNA'yı virüsle ilişkili endonükleolitik saldırıdan koruduğu düşünülmektedir. L viral transkriptlerin sentezi de sitoplazmada gerçekleşir ve RNA polimeraz II'nin virüs tarafından kodlanan homoloğu tarafından katalizlenir (Sample vd., 2007). Diğer büyük DNA virüslerinde olduğu gibi bütün geç genlerin ifade edilebilmesi için öncelikle DNA sentezine ihtiyaç duyulur. İridoviridler replikasyon bakımından sıcaklığa duyarlı olduğundan sıcaklık uygun olmadığında DNA'larını çoğaltamazlar. Ayrıca virüsle enfekte hücreler DNA sentez inhibitörü (Arabinosilsitozin, Ara-C) varlığında inkübe edildiklerinde geç viral transkriptler oluşmaz ve proteinler ifade edilmezler. Virion oluşumu, sitoplazmada "virüs birleşme bölgesi" adı verilen ve morfolojik olarak diğer bölgelerden rahatlıkla ayırt edilebilen bölgede gerçekleşir. Virüs birleşme bölgesinin oluşması için geç viral gen ürünlerinin sentezine ihtiyaç duyulmaz (Sample vd., 2007). DNA replikasyonu esnasında oluşan konkatemerik viral DNA parçalarının "hacim bağımlı" mekanizma aracılığıyla yavru virionlara paketlenildiği düşünülmektedir. Bu mekanizmadan dolayı iridovirid genomlarında halkasal permütasyon ve terminal tekrar dizileri ortaya çıkar. Birleşme olayı gerçekleştikten sonra oluşan virionlar sitoplazmada kalarak parakristal dizi oluşturabilirler veya plazma membranından tomurcuklanarak zarf kazanabilirler (Liu vd., 2016). Omurgalıları enfekte eden iridoviridlerin çoğunda oluşan virionların büyük kısmı hücre içerisinde kalır.

1.5. *Iridovirus* Cinsi

Iridovirus cinsinin altında ikisi tür olarak ICTV tarafından onaylanmış toplam üç virüs bulunmaktadır (IIV1, IIV6 ve IIV31). Daha önceden yapılmış gruplandırmaya göre *Iridovirus* içerisine yerleştirilmiş çok sayıda virüs daha kapsamlı yapılan benzerlik çalışmaları neticesinde *Chloriridovirus* cinsine daha yakın oldukları için bu gruba dahil edilmişlerdir. *Iridovirus* cinsinin tip türü olarak belirlenen *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6), familyada bulunan tüm virüslerin biyolojisini anlamak için üzerinde en çok çalışılan

iridoviridlerden birisidir. Model organizma olarak seçilen türler üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilecek veriler, benzerlik gösterdiği diğer virüs grupları için de geçerli olacağı için bu organizmaların biyolojisini çok iyi anlamak gerekir.

1.6. *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)*

Iridovirus cinsinin tip türü olan *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)* ilk defa 1966 yılında lepidoptera grubu bir böcek olan *Chilo suppressalis* (pirinç sap kurdu)'ten izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu, 1966). Bu yüzden diğer adı Chilo iridescent virüs (CIV) olarak da bilinir. IIV6, tarımsal açıdan zararlı olan çok sayıda böcek üzerinde enfeksiyon geliştirme özelliğine sahip olduğundan dolayı biyolojik kontrol materyali olma potansiyeline sahiptir (Henderson vd., 2001). Bu virüsün avantajlarından biri de, *Anthomondus grandis* (BRL-AG-3A) (D'Costa vd., 2012), *Choristoneura fumiferana* (IPRI-CF-124T) (D'Costa vd., 2001; D'Costa vd., 2004), *Drosophila melanogaster* (*Drosophila S2*) (Bronkhorst vd., 2012; Bronkhorst vd., 2014; Ince vd., 2015) ve *Bombyx mori* (SPC-BM-36) (Nalcacioglu vd., 2003; Nalcacioglu vd., 2007) böcek hücre kültürlerinde çoğalabilmesi ve çalışılabilmesidir. Bunların dışında *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Aedes aegypti*, *Pierris rapae*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella* ve *Aedes albopictus* hücre kültürlerinde de replike olabildiği tespit edilmiştir (Constantino vd., 2001).

IIV6, NCLDV için model olarak kullanılır. Genom büyüklüğü 212,482 baz çifti uzunluğundadır. Bu büyüklük virion kütesinin %12'sine tekabül etmektedir. Genomda en az 6 tane replikasyon başlangıç bölgesi olduğu belirtilmiştir (Sonntag vd., 1994). Genom boyunca terminal tekrarlar vardır ve halkasal permütasyon özelliği bu virüste de görülmektedir (Schnitzler vd., 1987). En son yapılan belirlemelere göre IIV6'nın 215 ORF'ye sahip olduğu ve bunlardan LC-MS/MS analiziyle iki veya daha fazla peptit varlığına göre 46, tek peptit varlığına göre ise 54 tanesinin yapısal protein kodladığı belirlenmiştir (Ince vd., 2010). Bu yapısal proteinlerden 36 tanesi diğer iridovirid ve askovirüslerle homoloji göstermektedir. Majör kapsit proteini (274L) bunlardan biridir ve virion yapısındaki organizasyonu hakkında çalışmalar yapılmıştır. Ancak diğer yapısal proteinlerle ilgili bu konuda henüz bilgi mevcut değildir. IIV6 DNA'sı tek başına enfeksiyonu geliştirmek için yeterli değildir. Virüs yapısında bulunan bir veya daha fazla protein, virüse ait en erken genlerin transaktivasyonunu sağlar (Ince vd., 2013; Nalcacioglu vd., 2003) ve

konağın makromolekül sentezini durdurur (Cerutti ve Devauchelle, 1980). Böylece virüs enfeksiyonunu başlatmış olur.

Genel olarak RNA virüslerinin konakta RNAi mekanizmasını çalıştırdığı bilinmektedir. Ancak bir DNA virüsü olan IIV6 ile *Drosophila melanogaster* hücrelerinde yapılan araştırmalar sonucunda, virüsün bu hücrelerde RNAi mekanizmasını çalıştırdığı (Bronkhorst vd., 2012) ve konak hücrelerin oluşturduğu bu antiviral cevaba karşı IIV6'da bulunan 340R geninin konakta üretilen çift zincir RNA'lara bağlanarak siRNA üretimini engellediği belirlenmiştir (Bronkhorst vd., 2014).

Bütün bu çalışmaların yanında IIV6'nın memeli hücrelerindeki enfeksiyon oluşturma durumu da araştırılmıştır. Fare embriyolarına ait fibroblast hücreleri (MEF), IIV6 ile enfekte edildiğinde konak hücre içerisinde interferon (IFN- β) ve tümör nekrozis faktörüne (TNF- α) ait mRNA'larda yaklaşık 20 kat artış görülmüştür (Ahlers vd., 2016). Bu artışa ve oluşan immün cevaba bağlı olarak IIV6 ile enfekte hücreler diğer virüslere karşı bağışıklık kazanarak hücre içerisindeki replikasyonlarını azaltmaktadır. Tüm bu etkilerine rağmen hücre içerisinde IIV6 genomunda artış olmaması bu virüsün aşı ve terapötik uygulamalarda kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Tüm *iridoviridae* familyasının üyelerine model teşkil eden IIV6'yu moleküler olarak aydınlatmaya yönelik olarak da çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla ilk rekombinant iridovirüs oluşturulmuş (Ozgen vd., 2014) ve daha sonra genomuna bir toksin geni ilave edilerek böcekler üzerinde biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliği test edilmiştir (Nalcacioglu vd., 2016). IIV6'ya ait protein kinaz aktivitesine sahip "iridoptin" adı verilen yapısal bir proteinin konak hücrelerde apoptozise sebep olduğu (Chitnis vd., 2011; Paul vd., 2007) ve bu iridoptin proteininin konak makromoleküler sentezini inhibe ederek böceklerde toksisite oluşturduğu tespit edilmiştir. Böylece ilk kez iridovirüslere ait viral toksin bir gen aydınlatılmış ve bunun patenti de alınmıştır (Bilimoria, 2009). Virion yapısının aydınlatılması ve yapısal proteinlerin muhtemel görevleri hakkında bilgi sahibi olmak için IIV6'a ait tüm yapısal proteinlerin kendi içinde etkileşimleri belirlenmiş (Ozsahin vd., 2018) ve böylece ortaya çıkarılan protein etkileşim haritalarıyla protein dizi benzerliğine dayanarak diğer iridoviridlerin yapıları hakkında fikir sahibi olunmuştur.

IIV6'daki transkripsiyon mekanizması birçok açıdan FV3'tekine benzer şekildedir. Genom replikasyonunun ilk aşamasında viral gen transkripsiyonu konak hücrenin nükleusunda en erken transkriptlerin üretilmesiyle başlar. Ardından bütün genler en erken (IE, α), gecikmiş erken (DE, β) ve geç (L, γ) olmak üzere aşamalı olarak üç basamakta ifade

edilirler (D'Costa vd., 2001; D'Costa vd., 2004). En erken gruba dahil olan genler DNA replikasyonuna ve protein sentezine ihtiyaç duymazken, gecikmiş erken grubuna dahil olanlar protein sentezine, geç gruba dahil olanlar ise hem protein sentezine hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duyarlar. Gen sınıfı belirleme çalışmalarında DNA sentez inhibitörü olarak sitozin-1- β -D-arabinofuranozit (Ara-C) veya afidikolin (APH) ve protein sentez inhibitörü olarak da sikloheksimit (CHX) kullanılır (Tablo 4). Böylece inhibitör varlığında transkripsiyonları araştırılan genlerin, DNA replikasyonuna veya protein sentezine ihtiyaç duyup duymadığı tespit edilmiş olur. DE transkriptler IE genler tarafından kodlanan bir veya daha fazla protein faktöre ihtiyaç duyar. Aynı şekilde geç genler de gecikmiş erken transkriptlerin oluşturacağı proteinlere ihtiyaç duyarlar (Barray ve Devauchelle, 1985; Elliott ve Kelly, 1980; Nalcacioglu vd., 2003).

Tablo 4. İnhibitör varlığında genlerin transkripsiyon durumları

Gen Sınıfı	Ara-C / APH*	CHX#
En erken	+	+
Gecikmiş erken	+	-
Geç	-	-

*Ara-C: sitozin-1- β -D-arabinofuranozit (Arabinosilsitozin);

APH: afidikolin (DNA sentez inhibitörü)

CHX: sikloheksimit (protein sentez inhibitörü)

Erken gen transkripsiyonu konağın RNA pol II'sine ihtiyaç duyarken, geç genlerin transkripsiyonu için RNA pol II alt ünitelerinin homoloğu olan viral polimerazların (vPol-II α , vPol-II β) kullanıldığı düşünülmektedir. FV3'e ait vPol-II α 'yı hedef alan antisens oligonükleotitler kullanıldığında geç gen transkriptlerinin inhibe olduğu görülmüştür (Chinchar vd., 2009; Sample vd., 2007). HIV'lerde transkripsiyon için gerek duyulan transkripsiyon kompleksinin elemanları henüz tam olarak bilinmemektedir. Viral RNA pol'un büyük alt ünitesi, çoğu RNA polimerazda bulunan ve karboksi-terminal domain olarak adlandırılan bölgeyi içermemektedir. Bu domain, transkripsiyon sonlanması ve poliadenilasyonun yanı sıra şapka sentezleme kompleksi ile de ilişkilidir. Bu durum iridovirüs transkriptlerinde poliA kuyruk olmadığı anlamına gelir. IE gen ifadesi için gerekli

olan transkripsiyonel transaktivatörün/lerin yapısal olduğu bilgisinin dışında konağın RNA pol II'siyle hangi viral faktörlerin etkileştiği bilinmemektedir (Chinchar vd., 2009).

IIV6 transkriptlerinin sınıflandırılmasına yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan ilki northern blot hibridizasyonu yöntemi ile virüs genomunun çeşitli restriksiyon endonükleazlarla kesilerek işaretlenmesiyle elde edilen DNA parçaları kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada 137 transkript belirlenmiş olup bunlardan 37 tanesi IE, 34 tanesi DE ve 65 tanesi de L gen sınıfına konulmuştur (D'Costa vd., 2004). Bir diğer çalışma ise virüs yapısal proteinlerinin kütle spektrometrisine dayalı olarak yapılmış olup virion proteinlerinin 23 tanesinin IE, 8 tanesinin DE ve 7 tanesinin de L gen olduğu belirlenmiştir (Ince vd., 2015). Bu çalışmaların yanında özellikle katalitik görevi olan bazı genlerin de transkripsiyonel ve promotor analizleri yapılmıştır. Bunlar; ekzonükleaz kodlayan *012L* (IE) (Dizman vd., 2012), apoptozis inhibitör geni kodlayan *193R* (IE) (Ince vd., 2008), DNA polimeraz enzimini kodlayan *037L* (DE) ve majör kapsit proteinini kodlayan *274L* (L) (Nalcacioglu vd., 2007; Nalcacioglu vd., 2003)'dir. Bunlardan *012L*, *037L* ve *274L*'nin promotor analizleri yapılmış, özellikle DNA polimeraz promotorunda bulunan AAAAT motifinin promotor aktivitesi için önemli bir dizi olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bölgenin diğer bazı promotorlarda da bulunmasından dolayı bu ve bunun gibi motiflerin aynı gen sınıfı içerisine dahil edilen promotorlarda korunmuş olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan lusiferaz aktivite çalışmalarında promotor bölgesi olarak belirlenen bölgelerin aktif olabilmesi için virüs enfeksiyonunun gerekli olduğu belirlendi (Nalcacioglu vd., 2007). Ancak sadece viral genomik DNA'nın konak hücreye aktarılması virüsün çoğalması için yeterli olmamaktadır. Elde edilen sonuçlar virion yapısında bulunan bir veya daha fazla proteinin virüse ait en erken genlerin transkriptlenebilmesi için gerekli olduğunu ortaya koymuştur.

Birkaç istisna (IIV1 ve LCDV-1) dışında hiçbir iridoviridin mRNA'sında poliA kuyruk yoktur. Bu nedenle IIV6'ya ait mRNA'lar oligo d(T) primerler kullanılarak cDNA'ya çevrilememiştir (Nalcacioglu vd., 2003). Ancak mRNA kütüphanesi oluşturulduktan sonra LACE (Ligation-based amplification of cDNA ends) yöntemiyle mRNA'ların sonlarına istenen diziyeye sahip parçalar eklenerek bu diziler yardımıyla cDNA sentezlenebilmiştir (Ince vd., 2013).

1.7. Transkripsiyonel Regülasyon

Transkripsiyon, DNA tarafından kodlanan bilginin RNA'ya aktarılma sürecidir. DNA'daki bilgiyi taşıyan bu RNA'lara mesajcı RNA (mRNA) adı verilir. Transkripsiyon süreci, "RNA polimeraz" adı verilen enzimin katalitik aktivitesi ile gerçekleştirilir. Oluşan RNA'lar daha sonra düzenlenerek protein ifadesi için kullanılırlar. Prokaryot ve ökaryot organizmalarda transkripsiyon çok farklı stratejiler kullanılarak gerçekleştirilmesine rağmen, bazı önemli kısımlar ikisinde de aynıdır.

Literatüre bakıldığında, viral genlerin özellikle böcek virüslerinde konak enfeksiyonundan sonra kademeli bir şekilde ifade edildiği ve çoğunlukla en erken, erken ve geç genler şeklinde isimlendirildikleri görülmektedir. Erken sınıfta ifade edilen genlerin bir kısmı viral DNA replikasyonundan, kesilmesinden, paketlenmesinden ve virüs partiküllerinin birleşmesinden sorumlu iken diğer bir kısmı da hücresel veya hücre dışı ortamın viral replikasyon, gen ifadesi için iyileştirilmesinden sorumludurlar. Geç sınıfta ifade edilen genlerin önemli bir kısmı ise virion yapısal proteinlerini oluştururlar.

Transkripsiyon mekanizmasının çalışabilmesi için DNA'nın erişilebilir olmasının yanı sıra cis- / trans- düzenleyici faktörler ve diğer transkripsiyon faktörleri (TF) de önemlidir. Transkripsiyon faktörleri kendilerine özgü olan DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyon seviyesini kontrol ederler (Karin, 1990; Latchman, 1993). Genlerin doğru yerde, doğru zamanda ve doğru miktarda ifade edilmesi için transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyulur. Transkripsiyon faktörleri hücre bölünmesi, hücre büyümesi, hücre ölümü, dışardan gelen sinyallere cevap oluşturulması, embriyonik dönemde hücre göçü ve organizasyonu gibi süreçlerde koordineli bir şekilde görev alırlar. Transkripsiyon faktörlerinin oluşturduğu komplekste en az bir tane protein, DNA bağlanma domaini içerir. RNA polimeraz ve bazı transkripsiyon faktörleri DNA üzerinde, gene ait promotor adı verilen özel sıralara bağlanarak genin transkripsiyonunun başlamasını sağlarlar. Promotor ökaryotlarda her gen için bulunması gereken özel bir sıra olup "cis-düzenleyici DNA elementi" olarak adlandırılır. Promotordan başka gen yapısında bulunabilen enhansır ve silensır adı verilen cis-düzenleyici elementler de vardır.

Promotor, RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere DNA'ya bağlanan cis-düzenleyici elementlerin en önemlisidir. Promotorlarda, türler arasında korunmuş diziler vardır. Çoğunlukla genin transkripsiyon başlangıç noktasının yakınında bir yerlerde bulunurlar. Bu promotor dizileri, üç gen sınıfı arasında farklıdır, ancak aynı grup içinde

korunmuş bir düzen vardır. Bu, evrimsel olarak gen promotorlarının zamana bağlı gen ekspresyonunu sağlamak için seçildiğini ve dolayısıyla replikasyon sırasında konakçı hücrede gen ekspresyonunu sağladığını gösterir (Broyles ve Knutson, 2010; Suhre vd., 2005; Whelan, 2013). Promotorların belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında *in vivo* işaret gen füzyon deneyleri ve *in vitro* transkripsiyon deneyleri en çok kullanılanlarıdır (Andersson ve Sandelin, 2019; Geertz ve Maerkl, 2010; Odom, 2011). Bunun yanı sıra promotor bölgesini araştıran çok sayıda *in silico* programlar da mevcuttur (Bailey vd., 2009; Kurjogi vd., 2012; Marks vd., 2006; Somvanshi vd., 2008). Bu programlar sayesinde, veri tabanlarındaki DNA sıraları kullanılarak, muhtemel promotor bölgeleri, bu bölgelerdeki korunmuş motifler, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma potansiyeli olduğu bölgeler biyoinformatik olarak analiz edilebilir. Böylece bir organizmanın muhtemel bütün promotor bölgelerini deneysel olarak çalışmak yerine sadece belirlenen bölgeler üzerine yoğunlaşarak daha spesifik çalışmalar yapmak mümkün olmaktadır.

Promotorlar dışında enhansır ve silensırlar da diğer cis-acting elementleri oluştururlar. Enhansırlar, transkripsiyon seviyesini artıran ve silensırlar ise enhansırların fonksiyonunu baskılayarak transkripsiyonel aktiviteyi düşüren düzenleyici DNA sıralarıdır. Bu sıralar protein kodlamazlar ve transkripsiyon faktörlerinin etkileşimlerini kontrol ederek gen regülasyonunda görev alırlar (Bernard, 2013; Kolovos vd., 2012).

RNA polimerazın DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatabilmesi için cis-düzenleyici transkripsiyon faktörleri yeterli değildir. Transkripsiyon kompleksinin oluşabilmesi için "koaktivatör" adı verilen başka proteinlere de ihtiyaç vardır. Bu proteinler direkt olarak DNA'ya değil DNA'ya önceden bağlanan faktörlere bağlanarak RNA polimerazın bölgede oluşan komplekse katılmasında görev alırlar. Gen ifadesini kontrol etmek için cis-düzenleyici elementlere bağlanan proteinlere "trans-düzenleyici faktörler (transaktivatör proteinler)" denir. Bu trans-düzenleyici faktörler promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonun başlatılmasında rol oynarlar (Watson vd., 2007). Trans-düzenleyici faktörlerin en önemlisi RNA polimerazdır. Ancak RNA pol'ün DNA'ya bağlanmasından önce başka trans-düzenleyici faktörler promotora bağlanarak promotoru RNA pol'ün bağlanabilmesi için uygun duruma getirir. Dolayısı ile bu aşamada DNA-protein bağlanması olayı gerçekleşir.

DNA'ya bağlanan proteinler, replikasyon, rekombinasyon, viral entegrasyon ve transkripsiyon gibi hücresel süreçlere katıldıkları için uzun yıllar boyunca çalışılmıştır. Son yıllarda bu proteinlerle çalışanların sayısı, rekombinant DNA teknolojisinin de ortaya

çıkmasıyla biyolojik olarak önemli olan genlerin izolasyonuna imkan verdiği için, önemli ölçüde artmıştır. Pek çok araştırmacı çevresel ve gelişimsel sinyallere yanıt verilmesinde bu genlerin transkripsiyonlarının nasıl kontrol edildiğiyle ilgilenmeye ve bu düzenlemeden sorumlu DNA dizilerini karakterize etmeye başlamışlardır. DNA-protein etkileşim teknikleri, bu düzenleyici dizi elementlerine bağlanan proteinlerin tespiti, izolasyonu ve karakterizasyonuna imkan verir.

DNA ile proteinler arasındaki etkileşimler özel olmayan DNA-protein etkileşimleri, tek zincirli DNA'ya özgü etkileşimler ve çift zincirli DNA'ya özgü etkileşimler olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşir. Özel olmayan etkileşimlerde proteinler (histon vb.) genelde DNA moleküllerinin yoğun bir yapı (kromatin gibi) oluşturmasında görev alırlar (Dame, 2005). Tek zincir DNA'ya özgü proteinler ise DNA replikasyonu, rekombinasyonu veya DNA tamiri esnasında işlev görürler (Iftode vd., 1999). Diğer proteinlerin aksine, çift zincirli DNA'ya özgü proteinler, aralarında transkripsiyon faktörlerinin de bulunduğu gruptur. Transkripsiyon faktörleri, genlerin promotor bölgelerine bağlanarak genlerin aktifleşmesini veya inhibe edilmesini sağlarlar. Bu mekanizma iki şekilde gerçekleşir; (a) transkripsiyon faktörleri ya direkt olarak ya da başka aracı proteinler yardımıyla RNA polimeraza bağlanır ve onu promotora taşır, böylece transkripsiyonu başlatır (Myers ve Kornberg, 2000), (b) transkripsiyon faktörleri doğrudan DNA'ya bağlanarak RNA polimerazın kalıp DNA'ya bağlanacağı bölgeyi uygun şekilde değiştirir (Spiegelman ve Heinrich, 2004).

Son 20 yılda DNA bağlanma proteinlerini tespit etmek ve saflaştırmak amacıyla kullanılan teknolojilerde pek çok ilerleme kaydedilmiştir. Bu yöntemlerden en çok kullanılanı "mobility shift assay" yöntemidir. Bu yöntemde proteinler işaretli bir DNA fragmanına bağlandıktan sonra denatüre edici olmayan jelde yürütülerek hareketine göre tespit edilir. Bu teknik ilk başlarda prokaryotik proteinlerin saflaştırılması amacıyla kullanılmasına rağmen daha sonra çeşitli hücrelerden DNA bağlanma proteinlerinin tespitine olanak verecek şekilde geliştirilmiştir. Bu basit ve hızlı yöntem, DNA bağlanma proteinlerinin saflaştırılmasında tercih edilir (Carthew vd., 1985; Fried ve Crothers, 1981; Fried ve Crothers, 1984; Garner ve Revzin, 1981; Hendrickson ve Schleif, 1984).

DNA bağlanma proteinlerinin tespit ve temel karakterizasyonlarının yanı sıra, bu proteinler saflaştırılarak da çalışılır. Bunun için standart kromatografi teknikleri veya jel geciktirme (gel retardation) yöntemleri tercih edilir. Yöntemlerden en güçlüsü proteine özgü bağlanma bölgesi içeren yoğun miktarda DNA'nın bulunduğu "afinite kolon kromatografi" tekniğidir. Bu yöntemin avantajlarından biri de farklı dizilere sahip DNA molekülleriyle özel

olmayan bağlanma yapan proteinlerin uzaklaştırılmasına imkan vermesidir. Buna alternatif olarak ise tuz solüsyonlarıyla özel olmayan bağlanmaları bozarak uzaklaştırdıktan sonra istenen etkileşime sahip proteinler DNA'dan koparılarak elde edilebilir (Alberts ve Herrick, 1971; Arndt-Jovin vd., 1975). Bu yöntemle benzer bir başka yöntem ise “Biyotin-Streptavidin afinite sistemi” dir. Diğerinden farklı olarak burada biyotin bağlı DNA fragmentleri kullanılır. Proteine özgü sırayı içeren DNA'lara bağlanan proteinler biyotin-streptavidin etkileşimi sayesinde saflaştırılarak elde edilir (Chodosh vd., 1986; Kasher vd., 1986; Leblond-Francillard vd., 1987).

Doğru proteinin saflaştırılıp saflaştırılmadığından emin olmak için DNA ile etkileşen proteinin büyüklüğünü bilmek gerekir. DNA bağlanma proteinlerinin büyüklüğü “UV çapraz bağlanma” yöntemiyle belirlenir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş özel sıra içeren DNA molekülleri ile proteinler etkileştirilir. Ardından UV aracılığıyla DNA-protein arasında kovalent bağlar sayesinde bir kompleks oluşturulur. SDS-PAGE ile proteinler ayrıldıktan sonra otoradyografi ile büyüklükleri belirlenir (Chodosh vd., 1986; Hillel ve Wu, 1978; Markovitz, 1972; Wu vd., 1987).

Çoğu durumda DNA bağlanma proteinlerini daha detaylı karakterize etmek için protein kodlayan gen bölgesinin klonlanması gerekir. Ancak bu yaklaşım oldukça zaman alıcı ve zahmetlidir. Son zamanlarda gelişen teknikler sayesinde cDNA'lar tespit çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu yöntemde cDNA kütüphanesinden oluşturulan klonların her birini içeren bakteriden protein izolasyonu yapılır ve jelde yürütülerek nitroselüloz membrana aktarılır. Ardından işaretli bir prob (bağlanma bölgesi) yardımıyla membran ile hibridizasyon yapılarak doğru klon tespit edilir. Bu yöntem Southwestern yöntemi olarak bilinmektedir. Fakat protein heterodimer yapıdaysa veya DNA'ya bağlanabilmesi için özel modifikasyonlara ihtiyaç duyuyorsa bu yöntem sonuç vermeyecektir (Singh vd., 1988; Staudt vd., 1988). Bu sebeple mayalarda kullanılmak üzere ikinci bir yaklaşım geliştirilmiştir. “Maya tek hibrit” adı verilen bu yöntemde cDNA kütüphanesinden oluşturulan rekombinant plazmitler maya hücrelerine aktarılır. Maya hücrelerinde bulunan işaret genin ifadesi, araştırılan proteinin özel olarak bağlandığı bölge tarafından düzenlenir. DNA bağlanma proteini bu bölgeye bağlandığında işaret gen ifade edilir ve bu şekilde doğru etkileşim tespit edilmiş olur. Bu yöntem sayesinde proteinler *in vivo* ifade edildiği için proteinlerin optimizasyonuna, denatüre ve renatüre edilmesine gerek yoktur (Li ve Herskowitz, 1993; Wang ve Reed, 1993; Wilson vd., 1991).

1.8. Çalışmanın Amacı

Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6), çok sayıda zararlı böcekte ölümcül veya hayatın kalitesini düşüren enfeksiyonlar oluşturması nedeni ile biyopestisit olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Diğer yandan IIV6'nın memeli hücrelerinde replike olmamakla birlikte immün cevabı tetiklediği ve harekete geçen immün cevabın da bu hücreleri Arbovirüs enfeksiyonlarından koruduğu gösterilmiştir (Ahlers vd., 2016). Ayrıca IIV6 bazı çalışmalarda çift zincir DNA virüsleri için model olarak kullanılmaktadır (Bronkhorst vd., 2012; Bronkhorst vd., 2014). Dolayısı ile IIV6'nın biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilme potansiyelinin yanında, temel araştırmalarda ve tıp alanında da kullanılabilme imkânı bulunmaktadır. Ne var ki şu an literatürde bu virüs hakkında mevcut olan bilgiler yeterli değildir. Oysa IIV6'dan bilinçli ve etkili olarak faydalanabilmemiz için virüsün moleküler biyolojisinin ve yapısının ayrıntılı olarak bilinmesi önem arz etmektedir.

Viral genlerin transkripsiyon özelliğinin ve transkripsiyonel regülasyonunun anlaşılması, gen ekspresyonunun kontrol edilmesinde önemli bir bilgidir. Iridoviridlerin de içinde bulunduğu böcek virüslerinde genler erken, ara ve geç olmak üzere kademeli bir şekilde ifade edildiği için hangi genlerin hangi aşamada transkriptlendiğinin anlaşılması iridoviridler üzerinde ileride yapılacak çalışmalar için önemli ip uçları sağlar. Böylece viral enfeksiyon döngüsü sırasında hangi aşamada hangi genlerin ifadesine ihtiyaç duyulduğu, gen ürünlerini hangi amaçla kullanıyor olabileceği konusunda bilgiler verir.

IIV6 virion yapısında bulunan (yapısal) proteinler üzerine önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarla virüsün 54 yapısal proteine sahip olduğu (Ince vd., 2010) ve bu proteinler arasında 163 adet etkileşim olduğu gösterilmiştir (Ozsahin vd., 2018). Yapılan promotor analizi ve transkripsiyonel çalışmalarda bazı genlerin sınıfları belirlenmiş (Nalcacioglu, 2003; Dizman, 2012; Ince, 2013), ancak bu çalışmalar virüsün çoğalması için ihtiyaç duyduğu stratejiler hakkında yorum yapmak için yeterli bilgi sağlamamaktadır.

IIV6'ya ait viral genomik DNA, konak hücreye aktarıldığında virion oluşumu gerçekleşmezken, virüsün yapısında bulunan proteinlerle birlikte konak hücreye verildiğinde yeni virionların oluştuğu tespit edilmiştir (Cerutti vd., 1989; Nalcacioglu vd., 2007). Dolayısıyla virionla ilişkili bir veya daha fazla proteinin viral enfeksiyonu başlatmak üzere en erken sınıfa ait genlerin transkripsiyonunu sağladığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında IIV6'nın transkripsiyonel regülasyonuna ışık tutması için virüse ait şimdiye kadar transkripsiyonel sınıflandırması yapılmamış tüm genlerinin

transkripsiyonel sınıflarının belirlenmesi, bu genlere ait promotor görevi yapabilecek korunmuş motiflerin araştırılması ve virüsün konak hücrede enfeksiyonunun başlaması için gerekli ve aynı zamanda virüsün en erken genlerinin transaktivatörü olan yapısal protein(ler)in aydınlatılması amaçlandı.

Iridoviridlerde transkripsiyon ve enfeksiyon mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacak bu çalışma sayesinde, virüsün ilgili çalışma alanlarında daha etkin kullanılması için önemli bilgiler sağlandı.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Virüs, Konak ve Plazmitler

Çalışmada *Iridovirüs* cinsine ait olan *Invertebrate iridescent virüs 6* (IIV6) Yeni Zellanda izolatı (Otago Üniversitesi, Dunedin, Yeni Zelanda) kullanıldı ve Dr. C. Joel Funk (USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona)'dan temin edilmiştir.

Virüs çoğaltmak için kullanılan *Galleria mellonella* (büyük balmumu güvesi) larvalarının laboratuvar ortamında kültüvasyonları sağlandı. Larvalar yapay besiyeri (750 gr buğday kepeği, 100 ml bal, 100 ml saf su, 100 gr yapay bal mumu, 250 ml gliserin) ile beslenerek ortam sıcaklığı 27 °C'ye ayarlanmış bir odada inkübe edildiler. Virüsü *in vitro* ortamda çalışmak için kullanılan, Sf9 hücre suşu, ekspresyon amacıyla kullanılan pIZ/V5-His (Thermo Fisher, V801001) plazmidi ve promotor analizi için kullanılan pSP-*luc*+NF vektörü (Promega, E4471) Wageningen Üniversitesi, Viroloji Laboratuvarı (Hollanda)'ndan temin edildi.

2.1.1. Virüs Çoğaltılması ve Saflaştırılması

IIV6'nın çoğaltılmasında konak olarak hem böcekten hem de böcek hücre kültüründen faydalanıldı. Konak böcek olarak *G. mellonella* larvaları kullanıldı. Enjeksiyon ile enfekte edilen larvalar 3 hafta boyunca 27 °C'de inkübasyona bırakıldı. Larvalar, süt beyazı veya açık mavimsi renge dönüştükten ve hareketlerinde yavaşlama gibi enfeksiyon belirtileri gösterdikten sonra toplanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

Enfekte böcek larvalarından virüs izolasyonu gerçekleştirilirken Marina ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntem kullanıldı (Marina vd., 1999). Bunun için öncelikle 4-5 tane larva yaklaşık 5 ml steril saf su içerisinde homojenizatör yardımıyla iyice parçalandı. Elde edilen homojenat sırasıyla 490xg, 960xg ve 1250xg şeklinde artan hızlarda 10'ar dakika santrifüjlenerek virüsler kaba partiküllerden arındırıldı. Daha sonra süpernatant 15300xg'de santrifüjlenerek virüs çökelti haline (pellet) getirildi. Oluşan mavi-yeşil renk karışımındaki pellet 500 µl steril ddH₂O'da çözüldü ve %30'luk sükröz çözeltisinin üzerine bırakılarak 15300xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet bir kez daha steril su ile yıkanarak

santrifüj edildi ve santrifüj sonunda bulanıklık gidene kadar steril ddH₂O içerisinde çözüldü. Saflaştırılan virüs solüsyonu 0,22 µm filtreden geçirildi ve 4 °C’de muhafaza edildi.

Virüs çoğaltılmasında hücre kültüründen de faydalanıldı. Bunun için *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) hücreleri kullanıldı. Hücreler 28 °C’lik inkübatörde T25 flaskler (Greiner, C6356) kullanılarak %5 FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, 10082147) içeren Sf-900 II SFM (Gibco, 10902096) besiyerinde büyütüldü. Enfeksiyonlar gerçekleştirilirken hücrelerden 2,5x10⁶ hücre/ml olacak şekilde 6 gözlü kapların her bir kuyusuna 1 ml, T25 kaplara ise 3 ml bırakıldı ve hücrelerin tabana tutunması için 2 saat 28 °C’de bekletildi. Hücreler iyice tutunduktan sonra üzerlerindeki besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve hücre başına düşen virüs yoğunluğu (multiplicity of infection, MOI) 2 olacak şekilde enfeksiyon başlatıldı. Enfeksiyon hacmi T25 kaplarda 1 ml, 6 gözlü kaplarda ise 600 µl olacak şekilde ayarlandı. Enfeksiyon 2 saat boyunca 2 rpm hızında sallanan platform üzerinde gerçekleştirildi. Ardından son hacim T25 kaplarda 5 ml, 6 gözlü kaplarda ise 2 ml’ye tamamlanarak 28 °C’ye bırakıldı. Konak hücrelerin bölünmesinde yavaşlama, çaplarında büyüme ve nükleuslarında belirginleşme gibi enfeksiyon belirtileri görüldükten sonra (yaklaşık 5 gün sonra), hücreler toplandı, 600xg’de 5 dakika santrifüjlendi ve virüsleri ihtiva eden üst sıvı 4 °C’de muhafaza edildi.

2.1.2. Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Virüs konsantrasyonunu belirlemek için son nokta seyreltme yöntemi (End-point Dilution Assay, EPDA) kullanıldı (Reed ve Muench, 1938). Bu işlem için stok virüs solüsyonunun besiyeri ile 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ ve 10⁻⁹ olacak şekilde seyreltikleri hazırlandı. Deneye paralel olarak bir tüpe kontrol amaçlı sadece besiyeri bırakıldı. Her bir tüpten 90 µl alındı, 90 µl Sf9 hücre (2,5x10⁶ hücre/ml) solüsyonuyla karıştırıldı ve 60 gözlü terasaki kabının her bir satırındaki 6 kuyucuğa aynı seyreltikten olacak şekilde 10’ar µl hücre ve virüs karışımı bırakıldı. Terasaki kapları 28 °C’de inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyondan 5 gün sonra, mikroskop altında gözlem yapıldı. Enfeksiyon belirtisi gösteren kuyucuklar artı (+), enfeksiyon belirtisi olmayanlar eksi (-) olarak işaretlendi ve bu verilere kullanılarak aşağıdaki formül ile virüs konsantrasyon hesaplaması yapıldı (Şekil 8).

Virüs konsantrasyonu (pfu/ml) = $10^{(a+x)}$ X 100/ml

n = enfeksiyon değerinin %50 veya daha yüksek olduğu seyreltme

a = log n

b = n. seyreltiğin % değeri

c = n. seyreltiğin altındaki % değeri

x = (b-50) / (b-c)

Örnek hesaplama;

		%100	%100	%100	%100	%66,6	%16,6	%0	%0	%0	%0
F	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Kontrol	

Şekil 8. EPDA'nın şematik gösterimi.

$$n = 10^{-5} \quad a = 5 \quad b = 66,6 \quad c = 16,6$$

$$x = (66,6-50) / (66,6-16,6) = 0,332$$

$$\begin{aligned} \text{Örnek virüs yoğunluğu} &= 10^{(5+0,332)} \times 100 \\ &= 10^5 \times 10^{0,332} \times 10^2 \\ &= 2,15 \times 10^7 \text{ pfu/ml} \end{aligned}$$

2.2. Viral DNA ve RNA İzolasyonu

2.2.1. DNA İzolasyonu

Saflaştırılan virüslerden DNA izole etmek için Schnitzler ve arkadaşlarının açıkladığı metot değiştirilerek kullanıldı (Schnitzler vd., 1987). Yukarıda anlatıldığı şekilde tek tabaka süzkroz ile saflaştırılmış 9 ml virüs üzerine 100 µl proteinaz K, 30 µl β-merkaptotanol, 1 ml %10'luk SDS ve 400 µl 5M NaCl eklendi. Karışım 37 °C'de 5 saat bekletildikten sonra gece boyu +4 °C'ye bırakıldı. Üzerine 15 ml fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklendi, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca alt üst edilerek hafifçe karıştırıldı ve 10 dakika 300xg'de santrifüj edildi. Üst faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Fenol:kloroform:izoamilalkol aşaması 2 kez daha tekrar edildi. Bundan sonraki aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Son hacmin 1/10'u kadar 3 M sodyum-asetat (pH 5,2) ve 2,5 katı kadar saf etanol (EtOH) ilave edildi, karıştırıldı ve -20 °C'de bir gece bekletildi ve ardından 16000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve çökelti 5 dakika kurumaya bırakıldı. Elde edilen pellet 200 µl ddH₂O içinde çözüldü.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu nanodrop cihazında (Thermo Scientific) ölçüldü. Çalışmada kullanmak için 10 ng/µl olacak şekilde seyreltilen DNA, 4 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.2.2. RNA İzolasyonu

IIV6 genlerinin transkripsiyon sınıflarını belirlemek için DNA ve protein sentezi inhibitörleri varlığında virüs ile enfekte Sf9 hücrelerinden RNA izolasyonları yapıldı. Bunun için 6 gözlü hücre kültür kabı kullanıldı ve kabın her bir gözüne $2,5 \times 10^6$ hücre bırakıldı. Hücreler tabana tutunduktan sonra 6 gözlü kabın iki gözündeki besiyeri DNA sentez inhibitörü sitozin arabinozit (Ara-C, 200 µg/ml), diğer ikisi protein sentez inhibitörü sikloheksimit (CHX, 250 µg/ml) ve kalan ikisi de inhibitör içermeyen besiyeri ile değiştirilerek 1 saat inkübe edildiler. Daha sonra MOI 2 olacak şekilde her bir gözdeki hücrelerin virüs ile enfeksiyonu yapıldı. Enfeksiyondan 2 saat sonra hücrelerin üzerindeki sıvı atıldı ve tutunmayan virüsleri uzaklaştırmak için hücreler katkısız besiyeri ile yıkandı. En son hücrelerin üzerine son hacmi 2 ml olacak şekilde, uygun inhibitörleri ihtiva eden taze

besiyeri bırakıldı. Etüve bırakıldıktan 12 saat sonra hücreler toplanarak ependorf tüplere aktarıldı ve RNA izolasyonu için kullanıldı.

RNA izolasyonu için Trizol (Sigma, T9424) kullanıldı. Besiyeri ile birlikte toplanan hücreler 5000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücrelerin üzerindeki besiyeriler tamamen uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 1 ml Trizol ilave edilerek hücreler yavaşça parçalandı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tüplere 200 µl kloroform ilave edildi ve alt üst yaparak karıştırıldılar. Tüpler, 12000xg'de 15 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilerek tabaka oluşumu sağlandı. En üstte bulunan ve RNA'ları içeren tabaka başka bir tüpe aktarıldı. Üzerlerine 500 µl izopropanol ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar 12000xg'de 10 dakika santrifüj edilip RNA'lar çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1 ml %75'lik EtOH ile 7500xg'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkandı. Üst sıvı atıldı ve pellet 15 dakika kurumaya bırakıldı. Bu süre sonunda RNA pelleti 30 µl RNaz içermeyen steril su ile çözüldü ve 15 dakika 60 °C'de bekletildi. İzolasyon esnasında oluşan DNA kontaminasyonuna karşı, elde edilen örneklerden 8 µl alındı, üzerine 1 µl DNaz I (Sigma) ve 1 µl 10X reaksiyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyondan sonra enzim inaktivasyonunu sağlamak için 1 µl durdurma solüsyonu (stop solution) ilave edildi ve 70 °C'de 10 dakika bekletildi. Buz üzerinde soğutulduktan sonra RNA'ların konsantrasyonları nanodrop (Thermo) ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Elde edilen RNA'lar küçük hacimlere bölünerek daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.3. Primerlerin Tasarlanması

Tez kapsamında üç farklı amaçla primer tasarımı gerçekleştirildi. Bunlardan biri IIV6'ya ait daha önce transkripsiyonel sınıflandırılmaları yapılmamış olan genlerin sınıfını tespit etmek amacıyla yapıldı. Böylece virüsün bütün genlerinin transkripsiyonel sınıfları belirlenmiş oldu. Genlerin başlangıç kısmından itibaren en fazla 700 baz çifti olacak şekilde bölgeler seçildi. Zaten 700 baz çiftinden daha küçük olan gen bölgeleri için, genin tamamını kapsayacak şekilde primerler tasarlandı.

İkinci olarak, delesyonlu veya mutasyonlu promotor plazmidlerinin oluşturulması aşamasında gereken primerler tasarlandı. Bu işlem için hazırlanan primerler, belirlenen genlerin 5' yukarı bölgelerini, pSPLuc plazmidindeki *lusiferaz* geninin baş kısmına yerleştirmek üzere tasarlandı.

Üçüncü olarak da, transaktivatör proteinlerin tespiti aşamasında belirlenen genlerin açık okuma zincirlerinin (ORF) ifadesi sırasında pIZ/V5-His (Invitrogen) plazmit vektörüne klonlanması için primerler hazırlandı. Genler bu plazmitte OpIE2 promotörü önüne yerleştirildiler. Bu promotor bir bakülovirüs olan *Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus* (OpMNPV)'e aittir ve kontrolü altındaki gen bölgesini herhangi bir viral faktöre ihtiyaç duymadan ve konak hücrenin transkripsiyon mekanizmasını kullanarak ifade edebilmektedir. Ancak bu plazmitte genlerin etkili şekilde ifade edilebilmeleri için translasyon başlama bölgesini içeren kozak dizisi ((G/A)NNATGG) genlere ait ileri primerlerin baş kısmına ilave edildi. Ayrıca klonlama bölgesinin sonunda bulunan poly-Histidin ve V5 kuyruklarının proteinlerle bütünleşik halde ifade edilebilmeleri için genlere ait geri primerlerdeki restriksiyon enzim bölgeleri ile gen arasına fazladan nükleotitler ilave edilerek baz kaymaları engellendi. Protein sıralarında sinyal dizisi veya transmembran domaini içeren genlerin ifade edildiklerinde konak hücre içerisinde kalabilmeleri için (kendileri ile birlikte hücreye aktarılan diğer plazmitte bulunan promotor bölgesine bağlanmaları için), bu diziler ifade edilen gen sıralarından çıkarıldılar. Bu sebeple protein dizileri SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ve TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) veri tabanları kullanılarak analiz edildiler. Bu bölgelere sahip olanlarda bu kısımlar dahil edilmeyecek şekilde ve olmayanlarda ise genin tamamını alacak şekilde primerler tasarlandı.

2.4. *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6) Genlerinin Transkripsiyonel Analizi

2.4.1. Genlerin Transkripsiyonel Sınıflarının Belirlenmesi

Virüse ait genlerin transkripsiyonel sınıflarının belirlenmesi amacıyla öncelikle inhibitörler varlığında ve yokluğunda virüs ile enfekte hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'larda viral transkriptlerin varlığının araştırılması ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) işlemi ile gerçekleştirildi. RT-PCR, cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezi ve PCR olmak üzere iki aşamalı bir işlemdir.

2.4.1.1. cDNA'ların Oluşturulması

cDNA elde etmek için izlenen yol şu şekildedir: Elde edilen RNA'lardan 1'er µg alınarak 2 µl (20 pmol) gene özgü geri primer ile karıştırıldı. Karışım, hacmi dH₂O ile 12 µl'ye tamamlandı ve 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Buz üzerinde soğutulduktan sonra santrifüjle tüpün dibinde toplanan örnekler tekrar buz üzerine bırakıldı. Üzerine 4 µl reaksiyon tamponu (5X), 2 µl dNTP karışımı (10 mM), 1 µl RNaz inhibitörü (Thermo Scientific, 40 u/µl) ve son olarak 1 µl M-MuLV revers transkriptaz enzimi (RT) (Thermo Scientific, 200 u/µl) ilave edilerek yavaşça karıştırıldılar. Bir saat boyunca 42 °C'de inkübe edilen örnekler, 70 °C'de 5 dakika bekletildi ve böylece reaksiyonlar sonlandırıldı. Bu şekilde tek zincirli olan cDNA'lar elde edildi.

2.4.1.2. Ters Transkripsiyon PCR (RT-PCR)

RT-PCR'in ikinci kısmı ise tek zincirli cDNA'lardan çift zincirli DNA'ların oluşturulmasıdır. Bunun için reaksiyon tüpüne 1µg cDNA, 5 µl reaksiyon tamponu (5X), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP karışımı (10 mM), 0,5 µl gene özgü ileri primer (10 µM), 0,5 µl gene özgü geri primer (10 µM), 0,1 µl DNA polimeraz enzimi (Promega) bırakıldı ve son olarak dH₂O ile hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Reaksiyonlar 95 °C'de 2 dakika ilk denatürasyondan sonra 30 döngü olacak şekilde 95 °C'de 30 saniye, 46 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 45 saniye bekletilerek çoğaltma işlemi gerçekleştirildi. Son olarak bir döngü 72 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezi ile etidyum bromür varlığında görüntülendi.

Bu işlemler, çalışılması hedeflenen tüm viral genler için tasarlanan gene özgü primerler kullanılarak tekrarlandı. Primer bağlanma sıcaklıkları her gen için özel olarak ayarlandı. RT-PCR sonuçlarına göre viral genler erken, gecikmiş erken ve geç olmak üzere üç farklı gruba ayrıldılar.

2.4.2. Gen Sınıflarının Promotorlarında Korunmuş Motiflerin *In Silico* Analizi

Transkripsiyon sınıfları belirlendikten sonra, genlerin translasyon başlangıç noktasından yukarı bölgelerinde bulunan ve promotor görevi yapabileceği düşünülen

korunmuş motifler biyoinformatik olarak araştırıldı. Motiflerin promotor aktivitesinde rollerinin olup olmadığını belirlemek için tüm genlerin ATG'den itibaren 200 bp yukarı bölgeleri GenBank'tan alındı. Tüm genler kendi sınıfları içerisinde (IE, DE, L) korunmuş bölge analizine tabi tutuldular. Korunmuş bölge analizi MEME Suite adlı motif tarama motoru (<http://meme-suite.org>) aracılığıyla yapıldı. Motif taraması sadece verilen nükleotit dizisi yönünde aranacak şekilde ve parametreler her bir dizi için bir veya sıfır motif bulacak şekilde ayarlandı. p ve e değerleri sıfıra en yakın olan ve benzerlik oranı en fazla olan motifler belirlendi.

2.4.3. Korunmuş Motiflerin Promotor Aktivitesine Etkisinin Araştırılması

Biyoinformatik olarak tespit edilen korunmuş motiflerin promotor aktivitesinde rollerinin olup olmadığını belirlemek için üç gen sınıfının her birini temsil edecek birer örnek gen belirlendi. Erken genler için 193R, gecikmiş erken genler için 126R ve geç genler için 259R kodlu ORF'leri seçildi. Her genin yukarı bölgelerinden, ilgili motifi içeren ve içermeyen olmak üzere iki farklı bölge çoğaltıldı ve bu çoğaltılan bölgeler promotor fragmanları adı altında pSP-Luc+NF vektöründe promotorsuz olarak bulunan lusiferaz geninin baş tarafına klonlandı. Bu şekilde oluşturulan rekombinant plazmitler daha sonra promotor aktivite deneylerinde kullanıldı.

Geç genler için görülen ihtiyaç nedeni ile 084L ve 061R ORF'lerinin de translasyon başlangıç kodonlarının yukarı bölgelerindeki korunmuş motifler promotor aktivitesi için araştırıldı.

2.4.3.1. Genlerin 5' Yukarı Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması

Seçilen genlere ait 5' yukarı bölgeleri, belirlenen motifi içerecek ve içermeyecek şekilde, dizayn edilen primerler kullanılarak doğrulama aktivitesi bulunan bir DNA polimeraz enzimiyle (Phusion, Thermo Scientific) viral genomik DNA'dan PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi sırasında reaksiyon tüpüne 10 ng kalıp DNA, 0.5 μ M ileri primer, 0.5 μ M geri primer, 1 μ l dNTP karışımı (10 mM), 0.5 μ l MgCl₂, 0.5 μ l DNA polimeraz (2 u/ μ l), 5 μ l reaksiyon tamponu (10X) bıraktıktan sonra reaksiyon hacmi ddH₂O ile 50 μ l'ye tamamlandı. PCR koşulları ise 98 °C'de 30 saniye ilk döngünün ardından 35

döngü olacak şekilde 98 °C'de 10 saniye, 55 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 15 saniye bekletilerek son uzama basamağı olarak 72 °C'de 10 dakika tutuldu. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelden temizleme kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak temizlendi. Konsantrasyonları nanodrop (Thermo Scientific) aracılığıyla belirlendikten sonra vektör:fragment oranı 1:3 olacak şekilde ara vektöre ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon tüpüne 10 µl reaksiyon tamponu (2X), 1 µl pJET1.2/blunt ara vektör (50 ng), 1 µl T4 DNA ligaz ve 150 ng PCR ürününden ilave edildi. Son hacim 20 µl'ye ddH₂O ile tamamlandı. Ligasyon reaksiyonu oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

2.4.3.2. *Escherichia coli* DH10β Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Genlerin 5' yukarı bölgelerini ihtiva eden pJET1.2 rekombinant vektörlerini aktarmak için kompetent hücreler hazırlandı. Bu işlem için petri kabında büyütülmüş olan *E. coli* DH10β hücrelerinden tek koloni seçilerek 3 ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyeriye aşılama yapıldı. Sallayıcı inkübatörde 37 °C'de 16 saat büyüyen kültürden 100 ml taze sıvı besiyeriye 1 ml aşılama yapıldı. Hücre yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0.4-0.6 olana kadar 37 °C'lik sallayıcıda büyütüldü. İstenen yoğunluğa ulaşan kültür, buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Ardından hücreler 4 °C'de 6000xg'de 5 dakika çöktürüldü. Sıvı kısmı döküldü ve hücreler 10 ml stoklama tamponunda (100 mM potasyum klorür, 50 mM kalsiyum klorür, 10 mM potasyum asetat, %10 gliserol) çözüldü. 15 dakika buzda bekletildikten sonra aynı şartlarda tekrar santrifüj edildi. Bu işlemler iki defa uygulandıktan sonra hücreler en son yaklaşık 4 ml stoklama tamponunda çözülerek 100 µl olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine bölündü ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.4.3.3. *E. coli* DH10β Kompetent Hücrelerine Transformasyon

Hazırlanan kompetent hücrelerden ihtiyaç duyulan sayıda alındı ve buz üzerinde çözülene kadar bekletildi. Ardından 5 µl ligasyon ürünü kompetent hücrelerin üzerine bırakılarak örnekler buz üzerinde yarım saat bekletildi. İki dakika 45 °C'lik ısı şoku uygulandıktan sonra tekrar buz üzerinde 1 dakika kadar bekletildi. Örnekler 1 ml sıvı LB besiyeriye aktarılarak 1 saat boyunca 37 °C'de büyümeye bırakıldı. Kültür, 6000xg'de 3 dakika çöktürme işleminden sonra sıvı kısım, geride 50 µl kalacak şekilde döküldü.

Hücreler, geride kalan sıvı içerisinde çözülerek seçici antibiyotik (ampisilin) ihtiva eden katı besiyeri üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda antibiyotikli agar besiyeride büyüyen kolonilerde transform edilen plazmidin varlığını doğrulamak amacıyla gece kültürleri hazırlandı.

2.4.3.4. Plazmit İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Kesim

Steril kürdan yardımıyla kolonilere dokunuldu ve uygun antibiyotik içeren 3 ml sıvı besiyeriye inokülasyon yapılarak gece boyunca 37 °C’de büyütüldü. Büyüyen sıvı kültürler 6000xg’de 3 dakika çöktürüldü ve hücreler pellet haline getirildi. Üst sıvılar geride 50 µl besiyeri kalacak şekilde döküldü. Hücre pelleti kalan besiyeri içerisinde vortekslenerek iyice çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, %5 SDS) ilave edildi, karıştırıldı ve yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 150 µl sodyum asetat (3M, pH 5.2) ilave edildi. 4-5 defa alt üst edildikten sonra 10 dakika 14000xg’de çöktürme yapıldı. Üst sıvılar yeni mikrosantrifüj tüplere aktarılarak üzerlerine 900 µl saf EtOH ilave edildi. Alt üst edildikten sonra yüksek hızda 3 dakika çöktürme yapıldı. Sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldı ve pelletlerin üzerine 500 µl %70’lik EtOH konulup tekrar 2 dakika çöktürme yapıldı. Alkol uzaklaştırıldı ve pelletler kuruyana kadar tüplerin kapakları açık şekilde 37 °C’de bekletildiler. Ardından pelletler 30 µl su içinde çözüldü. Bu şekilde izole edilen plazmit DNA’ların, viral DNA fragmentlerini içerip içermediği restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek belirlendi.

Her bir kesim reaksiyonu için tüplere 2 µg plazmit DNA, 2 ünite restriksiyon endonükleaz enzimlerinden (KpnI ve HindIII), son konsantrasyonu 1X olacak şekilde (1:10) enzim tamponlarından konularak reaksiyonların son hacmi 30 µl’ye ddH₂O ile tamamlandı. Hazırlanan reaksiyonlar, 37 °C’de 4 saat inkübe edildikten sonra yürütme boyası ilave edilerek agaroz jelde görüntüleme yapıldı.

2.4.3.5. Genlerin 5’ Yukarı Bölgelerinin pSP-Luc+NF Vektörüne Klonlanması

Genlerin 5’ yukarı bölgeleri PCR ile çoğaltılırken klonlamalarda kullanılmak üzere primerlerin uçlarına KpnI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzim kesme bölgeleri ilave edilmişti. Dolayısı ile ara vektörde bulunan bu bölgeler enzimlerle kesilerek jelden

temizlendi. Aynı şekilde pSP-Luc+NF vektörü de bu enzimlerle kesilerek ligasyona hazır hale getirildi. Vektör:insert oranı 1:3 olacak şekilde promotor bölgeleriyle ligasyon reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon karışımına vektör ve insert konulduktan sonra üzerine 1,5 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl T4 DNA Ligaz (BioLabs) ve son hacmi 15 µl'ye tamamlayacak şekilde dH₂O ilave edildi. Karışım 16-20 saat boyunca 4 °C'de bekletildi ve ardından transformasyonda kullanıldı. Elde edilen kolonilerden tekrar plazmit izolasyonu gerçekleştirilerek uygun enzimlerle kesildi ve plazmitlerin doğruluğu teyit edildi. Dolu olduğu belirlenen plazmitler MacroGen (Hollanda)'e gönderilerek dizin analizi yaptırıldı.

2.4.3.6. Korunmuş Motiflerin Promotor Aktivitesinin Araştırılması

Genlerin 5' yukarı bölgelerindeki korunmuş motiflerin promotor aktiviteleri, bu motifleri lusiferaz geninin önünde ihtiva eden ve etmeyen rekombinant plazmitlerin böcek hücrelerine transfeksiyonu ve ardından lusiferaz proteinin ölçülmesi ile araştırıldı.

2.4.3.6.1. Plazmitlerin Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu

Bir gün önceden Sf9 hücreleri her gözde 2×10^6 hücre olacak şekilde 6 gözlü hücre kültür kaplarına bırakıldı ve tabana tutunmaları için 2 saat 28 °C'de bekletildi. Diğer yandan, 1,5 µg rekombinant plazmit DNA (~5µl) ile 100 µl katkısız Grace's Insect besiyeri (Gibco®) karıştırıldı (Solüsyon A). Bir başka tüpte 8 µl Cellfectin® II Reagent (Invitrogen) ile 100 µl katkısız Grace's Insect besiyeri homojen bir biçimde karıştırıldı (Solüsyon B). Ardından bu iki solüsyon polisitren tüpte birbirine karıştırılıp 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir sallanarak oda sıcaklığında bekletildi. Tutunan hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve hücreler katkısız besiyeri ile yıkandı. Selfektin-DNA karışımının üzerine 800 µl Grace's Insect katkısız besiyeri eklendi, nazıkçe karıştırıldı ve hücrelerin üzerine yavaşça ilave edildi. Hücreler bu şekilde 28 °C'lik etüvde 5 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda transfeksiyon solüsyonu hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve üzerine %5 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren 2 ml Sf-900™ II SFM (Gibco®) besiyeri eklendi.

Transfeksiyon yapılan konak hücreler hemen ardından yaban tip virüsle enfekte edildiler. Pozitif kontrol olarak yaban tip IIV6 virionlarıyla enfeksiyon yapıldı. Negatif kontrol olarak boş plazmit kullanıldı. Böylece virüsler replike olurken plazmide klonlanan

promotor bölgelerini çalıştırdığında kontrolleri altındaki lusiferaz enzimlerinin ifade edilmesini sağladılar. Enfeksiyon başlangıç saatinden 20 saat sonra hücreler toplanarak lusiferaz aktivite deneyinde kullanıldılar.

2.4.3.6.2. Lusiferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Altı gözlü kabın her bir gözündeki hücreler toplanarak düşük hızda santrifüj yapıldı ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Hücreler, Lusiferaz Assay Sistem Kiti (Promega) içinde bulunan Passive Lysis Buffer (1X) ile (500 µl) homojenize edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında sallayıcıda bekletildi. Ardından sıvı azotta 3 defa dondurulup eritilen örnekler 12000 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi ve üst sıvının 20 µl'si aktivite ölçümü için kullanıldı. Ölçümler luminometre cihazı (Sirius, Berthold)'nda gerçekleştirildi. Substrat olarak, kit içinde bulunan Lusiferaz Assay Substrat ve Lusiferaz Assay Buffer II'nin karıştırılmasıyla elde edilen LarII'den her bir örnek için 100 µl kullanıldı.

2.4.3.7. Geç Gen Korunmuş Motiflerinde Yönlendirilmiş Mutasyonların Oluşturulması

Geç genlerin yukarı bölgelerinde tespit edilen birden fazla motifin transkripsiyonel regülasyondaki görevlerinin belirlenmesi amacıyla bu motiflerde mutasyonlar yapıldı. Bu amaç doğrultusunda 061R geninin 5' yukarı bölgesinde bulunan motiflerde yönlendirilmiş mutasyonlar oluşturuldu. Mutasyonlar PCR ile mutant nükleotitleri taşıyan primerler kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 6). PCR ile elde edilen 5' yukarı bölgeler önce pJET1.2 vektörüne ardından da pSP-Luc+NF vektörüne klonlanarak böcek hücrelerine transfeksiyonları yapıldı. Takiben virüs enfeksiyonu ve lusiferaz aktiviteleri ölçümü gerçekleştirildi.

2.5. En Erken Genlere Ait Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması

Daha önce belirtildiği üzere duyarlı IIV6 enfeksiyonu sırasında ilk olarak en erken genlerin transkripsiyonu başlatılır. Bu işlemde virion yapısında bulunan bir veya daha fazla protein görev almaktadır. Bu proteinler, transkripsiyonu gerçekleştirecek genin promotor

bölgesine bağlanarak bu promotorların aktifleşmesini sağladıkları için “transaktivatör” proteinler olarak adlandırılırlar.

Bu tez çalışmasındaki bir diğer amacımız da virüsün yapısında bulunan proteinlerden hangisi/lerinin transaktivatör görevi yaptığını belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalar dört ana başlık altında verilebilir.

2.5.1. Hibridizasyon ile Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması

Promotor bölgesine bağlanan proteinlerin büyüklükleri southwestern analizi ile belirlendi. Bu işlem için öncelikle en erken genlerden biri olduğu daha önceki çalışmalarla belirlenmiş olan gene (IIV6-012L) ait promotor bölgesi PCR ile çoğaltıldı, işaretlendi ve membran üzerine geçirilmiş viral yapısal proteinlerle hibritleştirildi. Bu şekilde en erken sınıfa ait bir genin promotor bölgesine bağlanan proteinin büyüklüğü hakkında ön bilgi edinildi.

2.5.1.1. Promotor DNA’sının Elde Edilmesi ve DIG (digoksinin) ile İşaretlenmesi

En erken genlerden biri olan *012L* (ekzonükleaz)’nin promotor bölgesi (Dizman ve ark. 2012) PCR ile çoğaltılarak fazla miktarda elde edildi. Bu PCR ürününden 4 µl (100 ng) alınarak üzerine 12 µl dH₂O ilave edildi. Tüpler, 10 dakika kaynayan su banyosunda bekletildikten sonra hemen buz üzerine bırakıldı. Örneklerin üzerine DNA işaretleme kitinde (Roche, 11585614910) bulunan DIG-High Prime (tüp 1) içeriğinden 4 µl ilave edildi ve karıştırılarak nazikçe santrifüj edildi. Tüpler, 37 °C’de 16 saat inkübasyon yapıldı. Ardından 65 °C’de 10 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. İşaretli DNA’lar kullanılana kadar -20 °C’ye kaldırıldı.

2.5.1.2. Viral Proteinlerin Hazırlanması

Virüs partikülleri elde edildikten sonra 0,22 µm filtreden geçirildi. Solüsyon, 14000 rpm hızda 30 dakika boyunca 4 °C’de santrifüj edildi. Ardından pellet virüsün yapısında bulunan proteinleri çözmek için parçalayıcı tamponda (10 mM Tris-Cl, 1 M KCl, 10 mM CHAPS, 1X proteaz inhibitör karışımı) çözüldü. Karışım, 30 °C’de 30 dakika alt üst edilerek

döndürüldü ve %20 süzkroz içeren tampon (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl) üzerine konularak 4 °C’de 2 saat boyunca 36000 rpm hızda ultrasantrifüj yapıldı. Oluşan üst fazdaki viral protein karışımı alınarak diyaliz yapıldı. Diyaliz işlemi için önce membran hazır duruma getirildi. Uygun boyda kesilen membranlar, 10 dakika 200 ml %2 NaHCO₃ ve 1 mM EDTA içeren çözelti içerisinde ve 10 dakika da saf su içerisinde kaynatıldı. Ardından membran soğuk saf su içerisinde alındı. Protein ekstraktı hazırlanan bu membranlar içerisinde doldurularak uçları sıkıca bağlandı ve 50 mM Tris-Cl ve 150 mM NaCl içeren tamponda 24 saat karıştırıldı. Bu süre içerisinde 3 kez tampon değişikliği yapıldı.

2.5.1.3. IIV6 ile Enfekte Hücrelerden Nüklear ve Sitoplazmik Proteinlerin Elde Edilmesi

Sf9 hücreleri IIV6 virüsüyle enfeksiyon yapıldıktan 48 saat sonra sitoplazmik ve nüklear protein ekstraksiyon kiti (Fermentas, K0311) kullanılarak proteinler izole edildi. Bu işlem için öncelikle üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS (fosfat buffer solin)’de çözülerek toplandı ve 250xg’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin 10 katı olacak şekilde lizis tamponunda hücreler 10 saniye vorteksenerek çözüldü ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Tekrar vorteksenerek 500xg’de 7 dakika 4 °C’de santrifüj edilerek süpernatantta bulunan sitoplazmik proteinler dikkatli bir şekilde yeni tüpe aktarılırken nükleusların bulunduğu pellet ise buz üzerine yerleştirildi. Süpernatant 20000xg’de 15 dakika 4 °C’de tekrar santrifüj edilerek sitoplazmik protein ekstraktını içeren süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Nükleusların bulunduğu pellet 2 defa 500 µl yıkama tamponunda vorteksenerek çözüldü ve 2 dakika buz üzerinde bekletildi. 500xg’de 7 dakika 4 °C’de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 150 µl saklama tamponu ilave edildi. Pipetle al-ver yapılarak pellet çözüldü ve üzerine 1/10 olacak şekilde lizis tamponu eklendi. Kısa bir süre vorteksenip 15 dakika 4 °C’de 900-1200 rpm hızda sallandı ve 20000xg’de 5 dakika 4 °C’de santrifüj edilerek nüklear protein ekstraktı bulunan süpernatant yeni bir tüpe alındı. Elde edilen bu örnekler hemen kullanıldı, geri kalan kısımlar -80 °C’de tutuldu.

2.5.1.4. Proteinlerin Membrana Aktarılması

Hazırlanan protein örnekleri poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile ayrıldı. Örneklerin üzerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6.8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β -merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra tüpler kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %12'lik SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 100 V akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeldeki proteinler yarı-kuru elektroforetik blotlama cihazı kullanılarak immobilon membrana aktarıldı. Bunun için Immobilon-P membranı (Millipore) ve whatman kâğıtları poliakrilamid jel büyüklüğünde kesildi. Membran ve kâğıtlar elektroblotlama tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glycine, %0.0375 w/v SDS) ıslatıldıktan sonra cihaza 2 whatman kâğıdı, 1 immobilon-P membranı, poliakrilamid jel ve 2 whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildiler. Cihaz 0.04 Amper'de 1 saat çalıştırıldı ve böylece blotlama işlemi gerçekleştirildi. Blotlanan membran 10 dakika distile (ddH₂O) su ile ardından 5 dakika PBS ile yıkandı. Yıkamalar sallayıcı platform üzerinde 50 rpm hızında gerçekleştirildi.

2.5.1.5. Proteinlerin Membran Üzerinde Renatürasyonu

Proteinler PAGE aşamasında denatüre olduklarından işaretli promotör fragmanı ile bağlanabilmeleri için eski katlanmış durumlarını geri kazanmaları (renatürasyon) gerekmektedir. Bunun için membran, PBS içerisinde hazırlanmış 6 M Guanidium-HCl solüsyonu ile 2 defa 10'er dakika yıkandı. Ardından sırasıyla 3 M, 1.5 M, 0.75 M, 0.38 M ve 0.19 M Guanidium-HCl solüsyonları ile 10'er dakika yıkamalara devam edildi. İki defa PBS'te 5'er dakika yıkanan membran yine PBS içerisinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozunda 37 °C'de 2 saat veya 4 °C'de gece boyu bekletildi.

2.5.1.6. Southwestern Hibridizasyonu

Membran, %0,5 süt tozu içeren PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandıktan sonra 2 defa hibridizasyon tamponunda (0,1 M Maleik asit, 0,15 M NaCl, %1 bloklama tozu (Roche)) 5 dakika yıkandı. Ardından 1,5 μ g işaretli DNA içeren hibridizasyon tamponunda gece boyu

inkübasyona bırakıldı. %0,5 süt tozu ve %0,3 Tween-20 içeren PBS ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı. %0,5 süt tozu içeren PBS ile 1 defa 10 dakika yıkandı. %0,5 süt tozunda 1:5000 oranında hazırlanmış anti-DIG ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak sadece %0,3 Tween-20 içeren PBS ile 3 defa 10'ar dakika yıkandıktan sonra görüntüleme işlemine geçildi. Bir defa dengeleme (Alkaline Phosphatase Buffer, AP) tamponunda (0,1 M Tris-HCl pH 9.5, 0,1 M NaCl) 10 dakika yıkanan membran yine bu tampon içerisinde hazırlanmış %1 NBT/BCIP (nitro mavi tetrazolyum/5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat, Roche) stok solüsyonu ile muamele edilerek bantlar görünür hale getirildi.

2.5.2. Ko-transfeksiyon ile Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması

Bu aşamada ise southwestern analizinde tespit edilen büyüklüklere tekabül eden yapısal proteinleri ve aynı zamanda sahip oldukları bazı önemli özelliklerinden (DNA bağlanma domaini, nükleer lokalizasyon sinyali) dolayı birkaç yapısal olmayan proteini kodlayan toplam 36 gen, teker teker pIZ/V5-His vektöründe bulunan bakülovirüs en erken (IE2) promotörü önüne klonlandı. Bu promotör sayesinde plazmide klonlanan gen bölgeleri, viral proteinlere ihtiyaç duymaksızın konak hücre tarafından ifade edilir. Aynı anda IIV6 en erken gen promotörü, pSP-Luc+NF vektöründe *lusiferaz* geninin baş kısmına bu genin transkripsiyonunu sağlaması için klonlandı ve böylece promotör plazmidi elde edildi (Dizman vd., 2012). Oluşturulan promotör plazmidi viral genlerin klonlandığı plazmitler ile konak hücreye ko-transfeksiyon yoluyla aktararak viral genlerin promotör üzerindeki etkisi araştırıldı.

2.5.2.1. Viral Genlerin pIZ/V5-His Vektörüne Klonlanması

IIV6'ya ait 36 genin kodlama bölgeleri, dizilere özgü primerler (Tablo 7) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Deney tüpüne 1 ünite Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz (Finnzymes), 10 µl 5X Phusion HF tamponu (1,5 mM MgCl₂ içerir), 1,5 µl 1mM ileri primeri, 1,5 µl 1mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril dH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 98 °C'de 30 saniyelik denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 98 °C'de 10 saniye, 49-60 (T_m) °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika (30 sn/1kb) ve son olarak

da 72 °C’de 10 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1’lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi.

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan DNA’lar agaroz jelden kesildi, Nucleospin Extract II DNA Temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak firma tarafından tavsiye edilen yönteme göre jelden temizlendiler. Elde edilen DNA’ların saflığı ve konsantrasyonu nanodrop ile kontrol edildi.

PCR ile çoğaltılan viral genler, pJET1.2 (ThermoScientific) ara vektöre, gen:vektör oranı 3:1 olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan plazmidlerin kompetent *E. coli* DH10β hücrelerine transformasyonu yapıldı. Oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı, restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğru klonlar tespit edildi. Doğru klonlarda bulunan genler, pJET1.2 vektöründen uygun enzimler ile kesilerek çıkartıldı ve yine aynı enzimler ile kesilmiş pIZ/V5-His ekspresyon vektörüne klonlandı. Rekombinant pIZ/V5-His vektörlerini içeren bakteri kolonileri, vektörde bulunan antibiyotik dirençlilik geni (*zeocin*) sayesinde besiyeriye zeosin (25 µg/ml) ilave edilerek seçildi. Doğru kolonilerin seçilmesi işlemi daha önce anlatıldığı şekilde yapıldı.

Çalışmada pozitif kontrol olarak yeşil floresan proteinini (green fluorescent protein, GFP) kodlayan gen klonlanmış pIZ/V5-His vektörü kullanıldı.

2.5.2.2. Rekombinant pIZ/V5-His ve pSP-Luc+NF Plazmitlerinin Böcek Hücrelerine Ko-Transfeksiyonu

Potansiyel transaktivatör olarak düşünülen yapısal proteinlerin bu çalışmada kullandığımız IIV6-012L (*exonuclease*) promotorunu aktifleştirip aktifleştirmedini anlamak için her iki plazmidin de aynı anda hücrelere transfekte edilmesi (ko-transfeksiyon) gerekir. pIZ/V5-His vektörüne klonlanan gen bölgeleri vektörde bulunan *Opie2* promotoru sayesinde fazla miktarda ifade edilecektir. İfade edilen bu proteinlerin *012L* promotorunu aktifleştirmesi durumunda rekombinant pSP-Luc+NF’de bulunan *lusiferaz* geni ifade edilecektir.

Virüse ait yapısal proteinleri ifade eden rekombinant plazmitler, hem teker teker hem de çeşitli gruplara ayrılarak hücrelere transfekte edildiler. Gruplandırma büyüklüklerine ve DNA bağlanma domaini içermelerine göre yapıldı. Gruplar 95 kDa’dan büyük olanlar (443R, 295L, 179R, 022L, 261R, 209R, 396L), 55-95 kDa arasında olanlar (268L, 149L,

232R, 439L, 361L, 380R, 213R, 118L), 26-34 kDa arasında olanlar (219L, 142R, 457L, 155L, 401R, 117L, 415R) ve 26 kDa'dan küçük olup DNA bağlanma domainine sahip olanlar (104L, 366R, 378R, 084L, 227L) olmak üzere 4 farklı şekilde yapıldı. Her bir grup, DNA bağlanma domaini içeren proteinlerin bulunduğu grupla birlikte transfekte edildi. Gruplandırılmalarının haricinde, bütün plazmitler karıştırıldı ve toplu halde de hücrelere transfekte edildiler. Transfeksiyon işlemi daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 18 saat sonra hücreler toplandı ve lusiferaz aktivite ölçümlerinde kullanıldı.

2.5.3. DNA-Afinite Kromatografisi ile Transaktivatör Protein(ler)in Araştırılması

Belirli bir DNA dizisine bağlanan proteinlerin saflaştırılabilmesi için öncelikle istenen diziye sahip DNA örneklerinin bir yüzeye tutunması gerekir. Yüzey olarak kromatografik yöntemlerde yaygın olarak reçineler tercih edilir. Önce yakalayıcı olarak görev yapacak DNA örnekleri rezinle biraraya getirilerek birbirlerine bağlanmaları sağlanır. Ardından protein örnekleri kolona yerleştirilen reçineden geçirilerek saflaştırma işlemi uygulanır.

Bu çalışmada DNA-affinite kromatografisi adı verilen yöntem ile bir kolon içerisindeki reçine maddesine bağlanmış IIV6 promotor sıralarına tutunan virion proteinleri araştırıldı.

2.5.3.1. Oligonükleotitlerin Hazırlanması

Affinite kromatografisi için öncelikle reçineye tutunacak DNA sıralarını içeren oligonükleotitler hazırlandı. DNA dizilerinin uç kısımlarına reçineye tutunmalarını kolaylaştırmak için sarkık olacak şekilde 5'-GATC nükleotitleri ilave edildi. Bir çifti *012L*'nin promotor bölgesi diğer çifti negatif kontrol amacıyla aynı uzunlukta (85 baz) ve aynı GC içeriğine (%14,81) sahip olmak üzere birbirinin komplementeri olan oligonükleotit çiftleri yüksek miktarda (~3 µg/µl) sentezlendi (Integrated DNA Technologies Inc.). Oligonükleotitler ayrı ayrı 94 °C'de 2 dakika bekletildikten sonra her biri kendi komplementeri ile birleştirilerek 94 °C'de 3 dakika inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kullanılincaya kadar -20 °C'de muhafaza edildiler. Sentezlenen diziler şu şekildedir; *exo oligo (012L promotor) için ileri dizi: 5'-*

GATCCAAATTTATAAATAAATTTGAACTATATATTGGATCATATTTTAAAGATT
TAAAAGTTAAAGAAGATTAGTAAAGTATAAA-3' ve ters komplementeri 5'-
GATCTTTATACTTTACTAATCTTCTTTAACTTTTAAATCTTTAAAATATGATCCA
ATATATAGTTCAAATTTATTTATAAATTTG-3', negatif kontrol oligo için ileri dizi: 5'-
GATCTTGAATTATGCAATAAAATTATTTTAAATGAAAGTAACAATAATACAA
CATTAAAATTGTTAGAACTTATAAAAGAAATT-3' ve ters komplementeri 5'-
GATCAATTTCTTTTATAAGTTCTAACAATTTTAAATGTTGTATTATTGTTACTTTC
ATTTAAAATAATTTTATTGCATAATTCAA-3'.

2.5.3.2. Kromatografi Dolgu Maddesinin Hazırlanması

Tez kapsamında reçine olarak aktifleştirilmiş CNBr (siyanojen bromür) 4B dolgu maddesi kullanıldı. CNBr'nin oldukça toksik olmasından dolayı laboratuvarında aktif hale getirmek yerine ticari olarak aktifleştirilmiş olan türü tedarik edildi. Her bir kolon için 1 gr aktif CNBr 4B tartılarak yaklaşık 5 ml 1 mM HCl içerisinde alt üst edilerek birkaç dakika (boncuklar şişene kadar) bekletildi. Elde edilen dolgu maddesi kolona aktarıldı ve 170 ml 1 mM HCl ile kademeli olacak şekilde yıkandı. Ardından önce 30 ml steril su sonra 30 ml 10 mM potasyum fosfat (pH 8.0) ile yıkandı. Akan sıvılar tamamen bittikten sonra dolgu maddesi akışkan bir hal alacak kadar 10 mM potasyum fosfat (pH 8.0) ilave edildi. Daha önceden hazırlanan oligonükleotitler ayrı kolonlara ilave edilerek kapakları kapatıldı ve gece boyu rotatorda (Stuart SB3) (20 rpm) döndürülerek inkübe edildiler. Bağlanmayan DNA'ları uzaklaştırmak için 60 ml su kolonlardan geçirildi. Reaksiyona girmeyen aktif bölgeleri inaktifleştirmek üzere 30 ml 1 M etanolamin HCl (pH 8.0) ile yıkandıktan sonra bu sıvı içerisinde akışkan olacak şekilde 4 saat boyunca oda sıcaklığında alt üst edildi. Sonra sırasıyla 30'ar ml olacak şekilde 10 mM potasyum fosfat (pH 8.0), 1 M potasyum fosfat (pH 8.0), 1 M KCl, dH₂O ve son olarak kolon stoklama tamponu (10 mM Tris-Cl pH 7.8, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.3 M NaCl, %0.04 w/v NaN₃) ile yıkandı. Kullanılana kadar stoklama tamponu içerisinde 4 °C'de muhafaza edildi.

2.5.3.3. Proteinlerin Kromatografiden Geçirilmesi ve Southwestern Analizleri

Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan kolonlar kapakları açılarak içindeki sıvı yerçekimine bağlı olarak damlamaya bırakıldı ve tamamen uzaklaşana kadar bekletildi. Ardından 2 defa 10'ar ml olacak şekilde 0.1 M KCl içeren Z tamponu (25 mM HEPES (K⁺ tuzlu), pH 7.6, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (taze eklenmeli), %20 (v/v) gliserol, %0.1 (v/v) NP-40) kolonlardan geçirildi. Hazırlanan protein örneği kolonlara doldurularak kapaklar tekrar kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika alt üst edilerek inkübe edildi. Kolonların kapakları açıldı ve kendiliğinden damlamaya bırakılarak içindeki sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Kolonlar içlerinden, 2'şer ml olacak şekilde 4 defa 0.1 M KCl içeren Z tamponu geçirilerek yıkandı. Son olarak artan konsantrasyonlarda (0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 ve 2 M KCl) tuz içeren Z tamponları kolonlardan geçirilerek reçineye tutturulan promotor oligolarına bağlanan proteinler elde edildi. Toplanan protein örnekleri, büyüklükleri hakkında bilgi edinilmesi için tekrar southwestern analizine tabii tutuldu.

2.5.3.4. Protein Rf Değerinin Hesaplanması

Southwestern ile elde edilen bandın büyüklüğü, marker aracılığı ile elde edilen büyüklüğün yanısıra, daha detaylı bilgi edinebilmek amacıyla, protein yürüme hızı (*R_f* değeri) dikkate alınarak da hesaplandı. *R_f* değeri, büyüklükleri bilinen protein bantları (markır) baz alınarak, büyüklüğü bilinmeyen protein bantlarının yürüdüğü mesafeye göre büyüklüklerinin hesaplanmasında kullanılır. Örneklerin yürümeye başladığı kuyular başlangıç noktası olarak, boyanın jel üzerinde yürüdüğü en uç nokta ise bitiş noktası olarak işaretlenir. Protein bantlarının başlangıç noktasından itibaren yürüdüğü mesafelerin, başlangıç noktasından bitiş noktasına kadar olan mesafeye oranlanmasıyla elde edilen grafik yardımıyla büyüklüğü bilinmeyen bu protein bandının büyüklüğü belirlendi.

$$R_f = \frac{\text{Örneğin yürüdüğü mesafe}}{\text{Boyanın yürüdüğü mesafe}}$$

2.5.4. Transaktivatör Kompleksinin Muhtemel Başlangıç Proteinlerinin Biyoinformatik Analizi

IIV6’da en erken genlerin transaktivatör proteininin tespiti ile ilgili bulgular, promotor bölgesine bağlanan proteinin büyüklüğü hakkında fikir yürütülmesine imkân verdi. IIV6’nın proteomik analiziyle tespit edilen yapısal proteinler içerisinde belirlenen değerden küçük olan bütün protein dizileri, DNA’ya bağlanan proteinlerin tahmin edilmesinde kullanılan veri tabanı (DNABIND, <https://dnabind.szilab.org/>) yardımıyla analiz edildiler (Szilagyı ve Skolnick, 2006). Analizler yapılırken istenen yanlış pozitif olma ihtimali (desired false positive rate) %0 seçilerek DNA bağlanma potansiyeli en yüksek olan proteinler tespit edildi. Girdi tipi (input type) tek sekans (single sequence) seçilerek her bir protein ayrı ayrı tarandı.

İstenilen büyüklük civarında (26 kDa’dan daha küçük) ve DNA’ya bağlanma kapasitesinde olduğu belirlenen potansiyel transaktivatör protein sırasının en erken gen promotor bölgesiyle etkileşiminin belirlenmesi biyoinformatik olarak gerçekleştirildi. Protein-protein veya protein-DNA/RNA etkileşimlerinin tahmin edilmesi amacıyla kullanılan HDOCK Server (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) veri tabanı yardımıyla aralarındaki etkileşim görselleştirildi (Yan vd., 2017). Ardından bu muhtemel küçük proteinle etkileşimde bulunan diğer yapısal proteinlerin ilişkisi yine aynı şekilde görsel olarak ortaya konuldu.

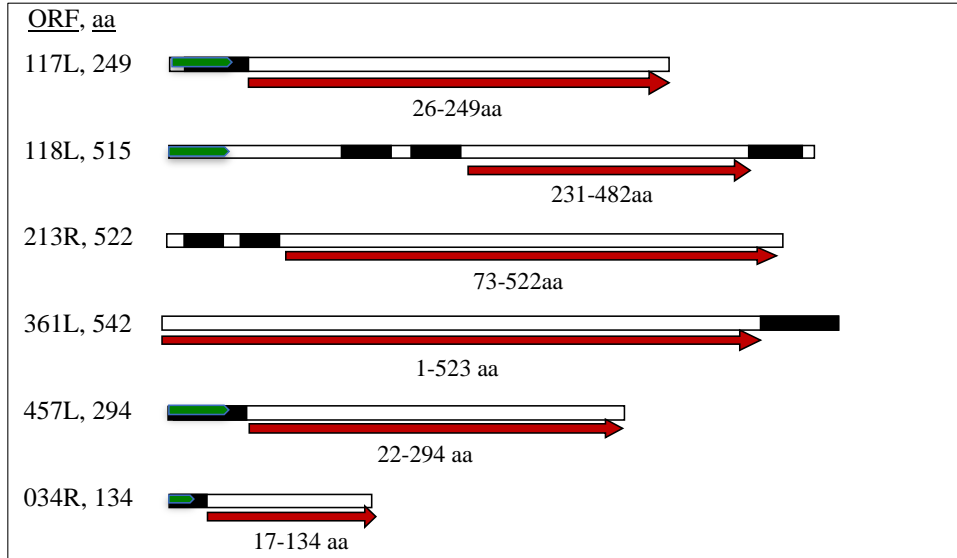
3. BULGULAR

3.1. Primerlerin Tasarımı

Bu çalışmada üç farklı amaçla primer tasarımı gerçekleştirildi. İlk olarak gen sınıflarının belirlenmesine yönelik gen sınıfı belli olmayan 171 tane ve sınıfı bilinen 3 tane açık okuma zinciri (ORF) için primer çifti tasarlandı (Tablo 5). Bu primerlerden geri olanlar cDNA sentezi için kullanıldıktan sonra aynı primerler ileri primerlerle birlikte PCR reaksiyonlarında kullanıldılar.

İkinci olarak potansiyel promotor plazmidlerini oluştururken korunmuş motifleri içeren ve içermeyen fragmentleri çoğaltmak için primerlere ihtiyaç duyuldu (Tablo 6).

Üçüncü olarak ise muhtemel transaktivatör proteinlerin araştırılmasına yönelik muhtemel 36 adet gen bölgesine uygun primer çifti tasarlandı (Tablo 7). Bu primerler tasarlanırken gen bölgelerinin transmembran domaini ve sinyal dizisi içerip içermediği araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre 6 tane genin transmembran domaini, 4 tane genin sinyal dizisi içerdiği tespit edildi (Şekil 9). Primerler tasarlanırken bu bölgeler dahil edilmedi.



Şekil 9. Transmembran ve/veya sinyal peptidi içeren ORF'ler. Kırmızı oklar ve altında yazan sayılar çoğaltılan bölgeleri ve büyüklüklerini, yeşil kısımlar sinyal peptitleri, siyah kutular transmembran domainlerini göstermektedir. ORF: açık okuma zinciri, aa: amino asit.

Tablo 5. Transkripsiyon sınıfının belirlenmesinde kullanılan primerler

ORF	Tm (°C)	Büyüklik (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
006L	52	700	ATGGATTCTTTAAATGAAGTGTGTTATG	TGTTTTGGATATTGTCAATTTTAAAGTT
009R	50	258	ATGATTAAATTATTTTGTGTTTTAGCAG	TTAAATGTCATGACATTTAATAAGAGTAC
010R	47	363	GACATATGAATAATTTTAATTACTTTAATGG	TTATCTTCGTGTAGAAGAACAA
012L	48	700	ATGGGTATTAATATTTTTTAAATGG	CATCAGAGCCATATATGCAATAT
019R	48	700	ATGAAAATTGGTTACATTTATGC	TTGCTATTAACCATTTTCTATTTG
029R	52	390	ATGGTAGAACGATTAGGCATAG	TTATACATCGCGTTTTTCATCATC
030L	50	700	ATGGAACAAACAAGAATTACAAATT	TTAATTTTTCTTCTTTTTTCATGTGT
032R	48	303	ATGGGAGTATACAAGTTTTGTTA	CTAAATATAATATACAACACTTCTATAC
037L	52	700	ATGGAGAAAACAATGTTTGCATATTC	ATACTTCTATATCCCATGCCATTAC
041L	47	369	ATGAATTTTATAAGAGAAAATGAAAC	TTAAAAATTCCCAATTGTCTATTTA
042R	52	285	ATGGCAACCTTACAACAAGC	TTAATTAGATCTCATAGAACATTTTTGAC
043L	44	351	ATGGACTTAATTAATAAATTTAA	TTAAATTGGAATATCATTAAAC
044R	50	198	ATGTATCTGTATCAAAAAATAAGAAATTG	TTACATCAGATCCCTTATTTATGTTCT
045L	51	700	ATGGCTACATCTAATCATAAAAAACA	CATCTAATACGTGTTTTCTAAAAATACC
049L	47	372	ATGGATAAAATAGAAGAATTAATAAATAG	TCAAACATTATTATAAACACCAATA
050L	47	700	ATGATTGAATTAAGCTTAAAAATTTT	TTTCTAATTTAGATTTTAAAATAGAGTG
056R	50	700	ATGGAACAAAAAATTGATAAAAAAATTC	CAATGCTTTCATGAGGAATTAAG
060L	49	711	ATGTCTAAAAATAAATCTCCACTATT	TTATTCCTCGTCTGTTTCTTC
061R	52	396	CGGAATTCAAAAATAAAAAGGTAACAGGAAATTATGG	CGGGATCCTTATTGTGTTTTAGATAGTTGATATTTAATGC
062L	50	535	ATGAAAAAATATGATATTGTTCTTTGG	TCATCCAAATATTATTAATTAATTTCCC
065R	50	168	ATGAATATCCCCAAGACCTG	TTAAATAAGGTTAATTAAGAATTAAGA
067R	51	700	ATGAAAACCATCATAATTAGAAAAATACC	TTTTGTCTTCTTCATTTTCTTCATGA
069L	50	693	ATGTCTGACAAAATTGATAATCAAAT	TTAATGATCTTTATAGAGAAGTCTAACA
071L	50	390	ATGAGTATTATAGAAATTTACAGACAG	TTAGCCGATTATTAATATGTTTGACT
075L	54	747	ATGTCAGACACACAAGAATATAGCA	TTGTTTTCCAATTCATATATTCATGGC
077L	50	715	GGATCCGGATGGGAAATTTATGGATTACGAAAACCTCAAAG	TACTTTCATACATATGGCGTTTTAA
082L	47	471	ATGAAAATTAAAAAAATGAAAATTAACCT	TTATAAAAAGATCATTTAAGAATTTTC
083L	47	153	ATGGATAACGAAATAATAATAATAGTTA	TCATTTATTTAATTTTTTAGTTTTAAATTG
084L	47	498	AAGCTTGGGATGGGAAAATTTAATTCCTCAGAAGTTTCTTC	GGATCCATAATAACCATAATTATATAATTGTGG
085L	52	700	ATGAGCGATATAATAATTGACTTGTC	AAATTCCTTGCCATAAATCTCTTGC
094L	52	357	ATGAGTGGAGTTCTTTAATAAACT	CTATACAGTCATATGTTTCGCTAGAAA
095L	48	258	ATGGAATAATAATAGCATTCTTTTA	TTAAGGTAATTTAAAAAATTGTGTTTTG
096L	56	525	CGGAATTCATGACTTCAAGCTTACCAGAATCAATAGATGG	CGGGATCCTTAATCAAAGCATAACTTCTCCATTAATG
098R	52	700	ATGAGCGATTGAGATTATGTTGATT	TATCAAAATGAAGATCGTTATGAATGAA
100L	50	526	ATGGATAATTTAAAGAAGAAGAAACA	TGTATTTAATTTACTTTGATCTTCGT

Tablo 5'in devamı

ORF	Tm (°C)	Büyükük (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
101L	50	705	ATGGAAC TTTATTGTAAATTAATTATGG	TCATATCATTCTAAAAATGTTTTGTCT
106L	54	174	ATGCCTATCTGTGTATTAAGAAAATCA	TTAACGTCTCCTTGGGGATCTT
107L	54	243	ATGGATCCCATAAGATGCTTTTCT	TTAAAAAGGTTTTGTAATGGTTCCGT
110R	50	207	ATGAAAGGATTGCTTTGTTTTATAT	TTAATTAACATCATCAACACTTGG
111R	53	462	GGAATCCATATGCAAAAAAATCAGGAATTATCCACATTATCT	CGGGATCCTTATAATTTATAAGCATCATCAATTCCAATTGG
113L	51	186	ATGCATATATTGATACTGAAGAAACG	TCAAAAAAGTAGATATAAAGGTTCCAG
115R	49	369	ATGTCTTTAGAAGAAAAAGTTAAAAATG	TTAATATTTAATTAAGTAAAAAGTTTCATAC
116L	52	288	ATGAATCAAAATCCTTTAACATCTGAAC	TTAAAAATAATTTACTTTTCCATGTTTTCC
120L	53	363	ATGTTTAAGTTTATTTTATTGTGCTTTTGC	TTAAAAACAACCTCCGTAATATGCC
121R	50	270	ATGGCAACAATTCAAATAAATCG	TTACAGTCTAAAAAAATTTATAGACTG
122R	51	426	ATGACAGATAAAATGGGTACAGATT	TTAGTATTTTATTACCTTTTTTCTTTTTTCG
126R	50	700	ATGAAAAGTACTTTTTGTAAGAAAGTTTA	TTATTTTCATCGTAGTCGTTATCAT
127L	51	708	ATGACTGACTATAAGCACAAAATAAA	TCATACTAAAGAAGATGAAAAGAAAAAATC
130R	51	587	ATGAAGTTAATAGTAAGTGTGTTTTCT	TTATTTAATTTCCACGATTTGTTGC
132L	50	720	ATGGTTAAACAAAGGAAAACATAATAC	TTAGAAATTAATAATATTGCGAAATGTC
135R	57	216	ATGACTAAATTTACATTCTCCCGGTTCCG	TTACATCCTGGGGAAAAAATGCCAG
136R	51	537	ATGATAGAAGATGCTATAATTGTTTCA	TTAAGACGGACAATAATTTTTAACAAATG
137R	48	174	ATGAATGAAATAATAATTACGATAATTG	CTACTGAAAAGTTAATTGATCAAGT
139L	48	198	ATGAAATTCATAAAACTTTTTACTTTTC	TTAATCATCTTCGCAATAATAAATAC
140L	51	195	ATGAATATTAACGACTATAAAGACTCG	TTATTTAACATTGATAATAGCATCAAGAAG
141R	53	255	ATGTACTACAGACGTCAAGGAGA	TTAGTAAACATACTTACACTACCTTTTC
143R	50	588	ATGACAATCATATGTATTGATGGAATA	TTAATGAGAAAAGAAAATTTAATTGCTG
145L	51	468	ATGTTGAGGATAAAGTATCTCTAAATTT	TTAGTCTAAATCATCAATTATTGGATCT
146R	53	700	ATGCGAAAAGGATACATTTACGTAAT	ACTTTGATTGTGAAAATAACACCATTAC
148R	51	700	ATGCTTTTAAAAATTAAGATAAAAAATAAGG	AACGTTCTTCTGATTGTTTTCTTTC
156R	52	174	ATGAATTTTTTACAAAATTTTTGCAGG	TTAAAAAGTTGTGTGAGGAAAGTTG
157L	52	459	ATGGAAATCGATAAAGTCTTTTGTGA	TTAAGATTTATTTATTTTAGATCTGCACATT
160L	47	162	ATGTCGATATTACTTAAAATTTTTATTT	TTAACATGAATATTTAATATCGCAT
161L	47	630	ATGTCATGTAAAATTAATATAAATGAA	ATATAACAACTTCTAAATGTTTTTCT
162R	52	459	ATGCGAAAATGTTAGCATATACACT	TTATCGTTTTTTTTCTCATAAGAGTC
165R	51	700	ATGAAAATAAATACAACAGATGTTCCG	GAATAGATTTAAATGGTGGTGACAA
169L	50	399	ATGTTTTCAAATATTTCAAATCAAAAAT	TTAAAGCCAACGATTAGATCTATCA
170L	55	706	ATGTGTGACAAAGAAATGTGTGACA	GCAGTTGACAAATAACATCACACATA
172L	55	630	ATGGCAGACGCTATGAATGAATTATG	TTCCCATGGTGTCCATAAATAACTG
175R	50	555	ATGAAAAGTTACTTAAGAGCG	TTAGTTAATCTAAAAAATCTCAATTCTT

Tablo 5'in devamı

ORF	T _m (°C)	Büyükük (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
176R	51	640	ATGTCTGCAAATAATAATATGGAAAGT	GGGATATTCCTAACATTTCTACATATTC
184R	51	700	ATGACAGATGTATTTAAAGTGTTAACAC	AAATAGAAATTTCTTGTGATTATGATCC
192R	50	222	ATGTCTTTCAAAAAATTAACAAACGT	TTAAATTTAAACTTTTTTAAATCCTCTTTTTG
193R	50	627	ATGGATACATGTGGAATTTATAAAGT	TTATATAAAAAAGATTGTTAATTTTGATAAAGTT
195L	51	405	ATGCCAAGTAGAAAATACAAAATATATG	AATTTTTCTTTTTTTTTGTGGTTTAAACA
196R	55	525	ATGTCTTTCATGCTATATTTAGATAAGGCTG	TTAATCAAAAAGATGGGGGAGGTG
197R	54	700	ATGGATGAATTAATGGGGAAAACG	GTAATAATTGTTGTTTGAAGAAGGATG
200R	48	186	ATGATGAAAGATTTATTTACATTTGT	TTAATACAACCATACTTTCACTG
201R	52	700	ATGGACGCGTTAATAAATCTTAAAG	GATCTTTAAAAGATTGTACACCTCC
203L	45	402	GACATATGCCATATCATAATTTTATGAAGC	GAGGATCCCTATAAAATTTTTATCATTTAAACATT
205R	52	630	ATGGACGAAACACAACAATTAATCTT	TTGATATTCGTTTACAGGAAAATTTAT
206R	54	459	ATGTCAGAGGAAAAGCTTTCTACA	TTAGAATAAAGCCGAAACATCAAGATG
211L	53	630	ATGGAAATGAATCAAAAACTGCATT	CATTTACAGACATTTACCAAGAATAGA
212L	50	630	ATGAATAAAATAACTTTTATGGGAGT	ATGTTCTTCCATTGATAAATTCATTTT
216R	49	483	ATGAAGGTAACTTTATTATTATTGTTG	TTAATTACGAGTTCCAAAAATATCAG
218R	52	700	ATGGCAAAATATCAACATTATGCAA	TTTCAAATTTCTTTTCAAACAATTCGC
221L	57	171	ATGTTGCAAACAAACAGTATGTTGATCT	TTACACCATCTGCACCTGTCCATA
224L	50	700	ATGAAAATAAGAATCGATTACTAAA	GTAGAATTTGGTTATTAAGAACTTCG
225R	48	630	ATGGATATTAATAATGAAGAAAAACAA	TAATAATGCATAACTTGCTATGTTAA
226R	49	291	ATGTTAAACATGGATTGTTAATTTAA	TTAATTATAACAACATGAAAATGTACAT
228L	54	700	ATGTGGTCAATACCTAAGTTTGGAA	TCAAAACACTTTTGTCAAATCGTAATG
235L	48	798	ATGGATATTTGTATATGTTATTTTTTTAC	CTAAACCCTACATCCTATAAAATTTTA
236L	54	222	ATGAAGAAAACACGAAGGTCTTCTT	CTAGTAACGAAAATTACAGCGCAAG
238R	55	572	ATGGCTTTTAATGGTATCGAACGATT	GGTTTCATGACTAGCCATTTAGAGC
240R	62	189	ATGACGTCACGCGGCCACCT	TCACAAGCAGAAGAAAGAAAGTTCATAGTCCAC
241L	49	513	ATGGAATAAACTTACTGATTTAG	TTATTCTTCATCACATTTGTTACAATA
242L	51	300	ATGGAAGAAAAAATGGATGGAA	TTACTTCATTTTCCCATTCAAAAATG
244L	48	700	ATGGACAATTGTAATAATCTATTTAT	GTATTTTTTTAACCATCAATGGATA
246L	46	381	ATGTTGATAAAATTTCTTATAATACC	CTATTCTTCATCTAAATTTTTCATAGA
247L	55	354	ATGGCACATACTGTTTTGTACCC	TTAATCAGATAAAATTTTTCAGTTTGCTCCC
249R	45	165	ATGAAAGAATTGATATTTTTTTTATTA	TTAAAACCAATTAGTTAATCCA
250L	50	426	ATGAATACAGAAAAAGTCATATTTAATT	TTATTGAAATGAACCTGAGCAC
251L	51	642	ATGTCATTA AAAACAGTCGTTTCC	TCATATATACTCAAGTTTGTGTTTTCT
253L	49	501	ATGGTTAAGACATTGATATTTAAAAAC	TTAAAAAGTAATACTTTGTGCTTCAT
254L	50	688	ATGAATCAAGAAATGAATTACGAAAA	TATGCCATGCTTCTTTCATATTA
255L	52	180	ATGGTTTTGACAAACCTACAAAAG	TCATATAAACATGATCATCGTTAGGA

Tablo 5'in devamı

ORF	T _m (°C)	Büyüklik (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
259R	50	700	ATGACTACAAAACACGAATTAGTG	CTTCCATTGCTTTAGTATATTTTTCA
272L	50	216	ATGTTCTTTACAGCTATTTTAAAATCTT	TCATTTGTTCCCATATTCAAGAATT
273R	50	411	ATGCAAAATGCTGAAATTTTTTATAA	TCAAAACGTTCTTTTTTTAGAGTTT
274L	51	630	ATGCTATTTTCTTCGTCAAATGTAAC	TTGGAAATTAATTCTCATTTCATTGTAT
282R	46	700	ATGATTAATGAAGATATAGACATTT	GTTCTTCTAATTCATCATAAAATTC
284R	51	447	ATGGATAAATACACAATACGTCAGT	TTAATAATTTTCAAATTCGATGCATC
285L	49	366	ATGGATAATAAGTGTACGTTTTCTAG	TTATTTGTTTAAATTTCTTTCATCTATC
287R	52	700	ATGGAACACAATATTGCAGAAATAAG	GATTATCTGAAAGCTTTTTCTAGCAT
289L	52	700	ATGGACGCGTTAATAAATCTTAAAG	ACTTTAATAGGTCAAAGTTTGAACTC
293R	50	459	ATGGCATCTGTTGATACGTATAA	TTAATAAGTTTTTTCAATAAGAATAACATC
300R	46	186	ATGAAAAAGAATTTTTAGATCTTT	TTAATTTTTTTTTATGATGATTTTGAAG
301L	47	225	ATGTATAAAAAAGATGTTAAAAAAGC	TTATATATTTGTATTTTGTGTTGTAC
302L	50	700	ATGGATATTGTATGTGAGTTTTGT	AACTTACTTCTTTGTAATCAATTTGT
306R	49	700	ATGAGTACTGAAATTAATAGTTCTAA	AAGGATACAAAGTTAATTCTGATGT
307L	48	501	GACATATGGGTATAAAGGGATCTTGGAG	TTATTGTAATGAATTTAATAACCAAG
308L	47	222	ATGTTACATTTAATAAAAATGGTTTC	CTAAATTACGCTATATTGGCAT
313L	54	700	ATGGCATCATTAAATGACGTTTGTTATG	CTTTTGAATTTGTTCTTGAACATTTTC
315L	52	630	ATGGCATCATTAAATGACATTTGTTA	GTCAAGATCTTTCAAACAACAATCTTC
322R	45	210	ATGATGATTCAAAAATATATCAAAA	TTAATTAATTTTAAACAATAATATGTAC
325L	54	408	CGGAATTCAAACCACATGTTGTTTTAACACCATTAGAATAC	CGGGATCCTTAATAATATGTAACATTTGTTTTATTTGTTTGAATAC
332L	57	630	ATGGAGTACACACGTGAAACAATGC	GCTACAAGGACCACAAGTTATGACA
335L	50	685	ATGGAATTTTCATTGTAAAGAATTG	CTCGAAGTTTATAAGAAAAAATTCATG
340R	51	522	ATGGAAAAACAAAAAGATAACGTAAC	TTAAATATCGTCTATATCAACAGAGTC
343L	50	686	ATGGAATTGAAAAATATGGAATTGAA	TCTAATTTATTTTTGATAACCGATGG
346R	45	210	ATGAATCGAAAATATAATTTTAAATGA	TTATTTTTTAAATCTTTTTCTTCT
347L	51	336	ATGACAGATATAGATCCACATATTTG	TTAAAATCTCCATTTTTTCTAGCAAC
348R	49	297	ATGACACACAAATATCAAATTTTG	TTATAAATTATTGAGAGCTTTATAATGAG
349L	51	423	ATGGACTTGGCTTTAAAAGTTAAAA	TTATAACACCCATTTACTTTTACATGA
350L	47	624	ATGTCACCTAAAATTAAGTTAGTA	TTAACAAACACTTATTTTTTTTGA
352R	52	213	ATGGAACGTTTCGTTTCATCC	TTATCTATCACGAAGTCCTTTTTTTAA
355R	47	549	GACATATGAAAAATATTTTTGGATTAGAC	GAGGATCCATTTAAATGACGATTTAAAACATC
357R	46	495	ATGATTTTAAATTTTAACTATAATAGTAG	TTAAGTTAATTTTGTGGAAGAAA
358L	48	459	ATGTTTGCAATTAATAATAGATAAAAATC	TTATTCATTATCAGATACATCATCA
359L	53	700	ATGGACGATTTGATTCATTCGTTAA	ATCTTGTTTCCGGTACTTTTCATTTTA
366R	45	345	GACATATGCCATTATTAAGAAAACGATC	GAGGATCCATAATTTCTCATCATGATAAG
368R	50	282	ATGAGTATCCCAAATTTATCTTCTG	TTAAACTTTATAATCAGGTGAAAACG

Tablo 5'in devamı

ORF	Tm (°C)	Büyüklik (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
369L	51	700	ATGGGTATTA AAAACCTTACAAAATTT	CAAAATCAACAATTA AATTACACCCA
373L	47	732	ATGATAGAAATAATTATATCAACGATAT	TTAGTTTAAAAGTATTA AAAACGAATAA
375R	51	156	ATGAAGAAGATGATGAAGAATATGG	TTATGCTAACGTATCAACGAAAG
376L	47	663	ATGTCATTATTA AAAAGGTAGAAAATTA	AACAAACTTTTAAAAGTTCAATC
384L	46	123	ATGAATATAGCAATTTTCATTTAC	CTACATTCTGTGTAATTTTAAAAC
385L	46	655	ATGAATATATCTAAAACAAAATCAG	TTCTAAATTGTTGTGAAAAATATAA
388R	54	630	ATGGAAAAGGAAACAACATTTCTTGG	ATCATGTGCGTTTTTCAGCTTCTAATT
389L	50	700	ATGGATCTTAAAGACGAATTTATTC	AGTCACCATTTC TAAACAATTAT
391R	46	700	ATGTTTATAGTTAAAATTTAAACTTC	ATTCTTCTATTTGAGATTTTGTA
393L	52	700	ATGGATTCAAAGCAAAC TAAAACATG	TTGTTGTTTTGTTGTTGATTTTTTCG
395R	50	456	GACATATGTCAGGATCTGGATATGCAGC	GAGAATTCAAAATTCATATTA AATTGTAAGGG
400R	45	132	ATGAAACTTCTTAATTTTATTTTTAA	TTACAATGAGGTAGTGGACTT
404L	53	717	ATGGTGAAGCCTAAAAC TAAAGATTT	TTACGGCCAATCATATGACCAATA
411L	51	630	ATGCATGTTTTAACTACAATAACAA	ATCCCTTACTTCAACTGGTTTTT
413R	49	621	GGATCCGGGATGGGAGATGCAATTTTTTATCCGTTGC	GAATCCCTGGTAGTCTTGCTATAATTTTTATT
414L	45	579	ATGAAGGTATTA AAAAATTTATATAT	TTATATTTTTCTTAATATATATTTTCGTT
420R	55	654	ATGGAAGTCGCTATGACAGATTTG	TAGACGAAGCATCTTTCGTAATGC
423L	46	546	ATGGAAAAAATTGTATGATAATG	TTAAAAATTA AAAAGATTTTCCATTAG
426R	50	417	ATGGAAAAGTATTATACACGATTCTAG	TTATTGAGAAATGTCAAAAATCAAATC
428L	45	656	ATGAATAATATGAATTTGAATAATATG	TTTCTAAAACAAATACTTCTATTATA
436R	54	630	ATGTCATTAGAAAAGGACGAAGAAG	CCATTTGGTTGCAATATCAACCATAT
437L	46	198	ATGGATAATTTATATTCTCAAATAAA	TTAATCATCCAAATTAGTTTCTG
438L	52	658	ATGGATAAAAAACCAACAATTGCTA	ACGATAATCCTGATCTTGAACATATT
441R	45	351	ATGGATAAATTAATATCAAAAAAATT	TTAAAGAAATTTATCCAACAATC
451L	45	390	ATGAATAAAAATTTATGTTAAAAAAGG	TTAAACATAAAAAATCATAGTTATCTT
453L	48	417	GACATATGTATCAACAAAAATTTTTGAAAAAC	GAGGATCCACCCATTACATAATTAACAATG
454R	49	555	ATGTTCTCTAAATCATATCAGATTACA	TTATTTAACAATTCGATATGATACAAAC
460R	50	663	ATGGAAGTTGGATGTGTTTATATAAT	TTAATCAAGTTTGAGATTATCAATTTG
463L	47	665	ATGAATCATTTTGTTTATTTAATGG	ATTATCCAATCACTTTTCTTTTTA
466R	51	273	ATGAATATGCCTGGAAAAACTC	TTAATTGAGTTGATTTTTAATGACCAA
467R	46	659	ATGGATGATATTTTTAATTTTGAAT	CATATCTTAACAATTTATTTTCC
468L	52	700	ATGGAAATGGCAACAAAAAATGTA	GATCATTATTTTCGTGCTTATGTCT

Tablo 6. Promotor plazmitlerini oluşturmak için kullanılan primerler

Primer Adı	Tm (°C)	Primer dizisi (5'-3')
193R-prom-Fw1	46.4	<u>GGTACCGAGGATTTAAAAAAGTTTTAATTTAAA</u>
193R-prom-Fw2	46.4	<u>GGTACCTTCAAAAATTAATAATACATGATACAAT</u>
193R-prom-Rv1	48.1	<u>AAGCTTATTATAAATTCACATGTATCCAT</u>
126R-prom-Fw1	50.1	<u>GGTACCGGTTTTATAAAACAATTAGCACAAATTT</u>
126R-prom-Fw2	45.2	<u>GGTACCGATAACCATTAAAAATTATAAATAATTG</u>
126R-prom-Rv1	47.4	<u>AAGCTTTTCTAAATTTGAAAAATAAACTTCTTAC</u>
259R-prom-Fw1	50.4	<u>GGTACCGGATTTTTCGTAATTCATTTCTTGAT</u>
259R-prom-Fw2	50.8	<u>GGTACCGGATTGATGCTTTTAAATGAAAAATATG</u>
259R-prom-Rv1	51.7	<u>AAGCTTTGTATTTATCACTAATTCGTGTTTTGT</u>
084L-prom-Fw1	50.5	<u>GGTACCTAAAGTTTCAATTTTGGGAAGTTTCG</u>
084L-prom-Fw2	50.5	<u>GGTACCAACTAATGGAAGAAGACTTTCAG</u>
084L-prom-Rv1	49.5	<u>AAGCTTAGGAGACATTCCTTTATTTACAATTAA</u>
061R-prom-Fw1	46.9	<u>GGTACCCATCATTTTTTCACTTTCATTTAA</u>
061R-prom-Fw2	45.9	<u>GGTACCGTAATATTTCTTTAATACTGAAAAATC</u>
061R-prom-Rv1	46.9	<u>AAGCTTAATTCCTACGCAAATAATTATAC</u>
061Rprom-mut1	63.5	<u>GGTACCCATCATTTGGAGTGAGCGTCTTTAATAGTGGAGATTTATTTTTAGACATATCTTGTTTTATTTTAA</u>
061Rprom-mut2	62.4	<u>GGTACCCATCATTTTTTCACTTTCATTTAATAGTGGAGATTTATTTTTAGACATATCGCAGTTATTTTAA</u>
061Rprom-mut3	60.1	<u>GGTACCACTGTTCCGACGACGTTGATATTAACACTACTAT</u>
061Rprom-mut4	58.7	<u>GGTACCACTGAAAAATCAAAGTTGATATGCCTCTGTTGTAT</u>

GGTACC: KpnI, AAGCTT: HindIII, Fw: ileri, Rv: geri

Tablo 7. Muhtemel transaktivatör proteinlerin araştırılmasında kullanılan primerler*

ORF	Tm (°C)	Büyükük (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
022L	60	3516	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGAGTTTAAATTAGAAGATTTTTTCCA	<u>GCGGCCGC</u> GTTTTCTTTAGTTTGAACACCAC
295L	60	4032	<u>GGATCCGGGATGG</u> GA CTTCTTAACGGTAAAAGTTTTAAAAT	<u>GCGGCCGC</u> GAAATTGTTTTTTAAGAGTAAGATAATAATC
118L	52	558	<u>GGATCCGGGATGG</u> GACAATGGACTGTGAGAGAAATATC	<u>GAATTC</u> CCGTGTTATTGTAGATGGTGGACCAT
261R	60	4086	<u>AAGCTTGGGATGG</u> GAGCTTCGTTAACATTGAAAATCC	<u>GAATTC</u> CCAATGACAGATAAGACAGATACAAAAA
149L	55	2001	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAAGAAACCATTTTTGAAATATTTG	<u>GAATTC</u> CCGGCATAAAAATTGATTTTTAACC
179R	60	3561	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAACTTGTAGATCCTAAAACATTTGG	<u>GAATTC</u> CCATACAATATTTTTATTACAATATTTTTATATAC
443R	60	7299	<u>GGATCCGGGATGG</u> GATCATTAAATTTAAATAACGCTTAGACG	<u>GAATTC</u> CCATTATCCAATACTTCAATTCCTGC
117L	50	675	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAAAGAATAAAAAATCAGGTAGTCAA	<u>GAATTC</u> CCCTCAAATTAACAATTTCTACATCTCC
142R	52	879	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGAAAACAATATTGAAAATTTGATCCTTC	<u>GAATTC</u> CCCATAAAAGCTTTAAACCTGTCTGG
155L	50	768	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAAAGAAATTTTCGTCCCAAAC	<u>GAATTC</u> CCGATATATCTTATTAATTGTGTTGCTTTAAC
232R	55	2016	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAATAACAATCAGTGATGAGAAAA	<u>GAATTC</u> CCAGCTACTCCAATACATTGC
380R	49	1587	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAACTTTGATAAAGAAAAATGTGATG	<u>GAATTC</u> CCAGGTAGTTTATAAGTTTCCAAAAT
396L	60	3174	<u>GGATCCGGGATGG</u> GATTCAAGTTAATATTGACAATCCATTAC	<u>GCGGCCGC</u> GATAAGTAACATAATCTGCAACTCC
401R	50	732	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAAAGTAAAAAAGAACTTATGGATGC	<u>GAATTC</u> CCAACCTTAATTTCTTTATTTTTTTACTTGAC
415R	52	729	<u>GGATCCGGGATGG</u> GATCAGGAGGTTATACTTCTTTGG	<u>GAATTC</u> CCATAATCTCCCATCATTCTATATCCAT
439L	49	1614	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGCCGAGTGTTAAGTAAAAAAAT	<u>GCGGCCGC</u> GTTTTAATCTCTGACAGCGATC
209R	60	3141	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGATTCTCTAAAGCAAGTTCAGC	<u>GAATTC</u> CCAGAAATATATAAACCCTAAACCTAATCTTC
213R	50	1350	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAACCTTCTACAGTAGAAGGTT	<u>GCGGCCGC</u> GAAATTGGCCAGTTCCTCTCT
268L	55	2133	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAACAAAGACAAGCACGTTTAA	<u>GCGGCCGC</u> GCCATTTTTTTATTTTCAAACATTCCATA
329R	49	1137	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAATTCATTTTCAAGCATAACAGATAG	<u>GCGGCCGC</u> GATAATTAATTTTAAACACCTTCGTTATC
361L	60	1572	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAACTCGATTATTAATCAACGTTGG	<u>GAATTC</u> CCATACCAATTATTGGTTTTAGAAGTTG
219L	49	1032	<u>GGTACCGGGATGG</u> GATCACTTCCGGTTAATTTTAAAATATA	<u>GAATTC</u> CCCTCCTGTCTTATAACCATAACT
034R	56	336	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGAAAAGAAAAAAGAAGTACCTCTTCCC	<u>GAATTC</u> CCCAATGACCATCTCTCCAC
457L	54	823	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAACAAAAATAATAAACACTACTTCATCATATGAG	<u>GAATTC</u> CCCATATTTGAAGTTCCTAATAATGGTATAGG
468L	60	1131	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGAAATGGCAACAAAAAATGTAATATC	<u>GAATTC</u> CCAACATCTCTTTTTGTCAATTTATCTTC
302L	50	1137	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGATATTGTATGTGAGTTTTGTGATAA	<u>GAATTC</u> CCAACCTTTTAAACAATTCATTTCTTTTTCA
413R	50	627	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGATGCAATTTTTATCCGTTGC	<u>GAATTC</u> CCGGTAGTCTTGCTATAATTTTATT
077L	50	942	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAATATTATGGATTACGAAAACCAAAG	<u>GCGGCCGC</u> GAAACAAATCTATTTTCCAATCATCA
287R	50	948	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAGAACAATATTGCAGAAATAAGTG	<u>GAATTC</u> CCAACCTAAATTTTCAAGAAATATTTTTGTAA
355R	50	549	<u>GGATCCGGGATGG</u> GAAAAAATATATTTTTGGATTTAGACAACAC	<u>GAATTC</u> CCATTTAAATGACGATTTAAACATCTCT

Tablo 7'nin devamı

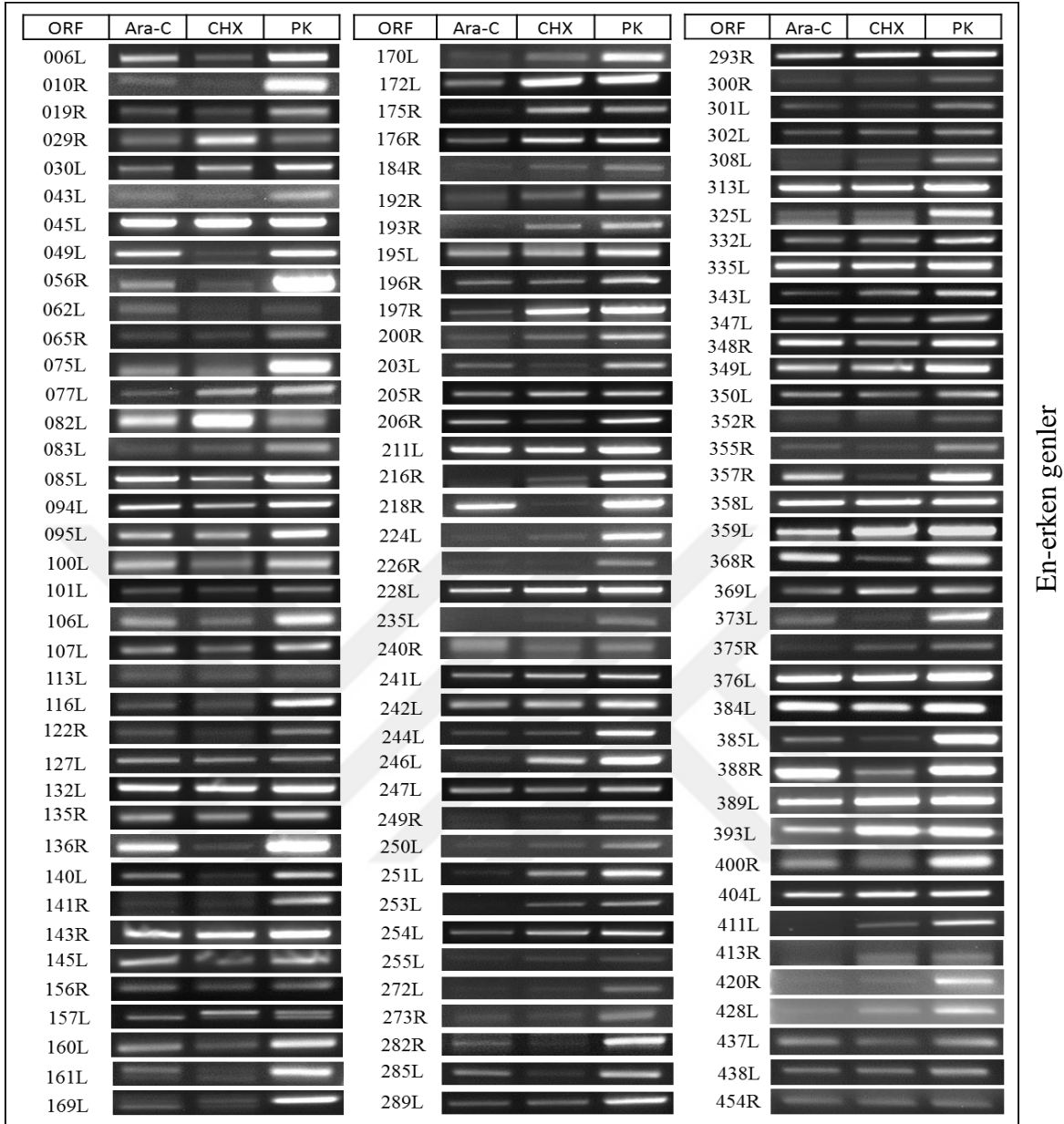
ORF	Tm (°C)	Büyüklik (bp)	İleri primer (Fw) dizisi (5'-3')	Geri primer (Rv) dizisi (5'-3')
349L	50	423	<u>GGATCCGGGATGG</u> AGACTTGGCTTTAAAAGTTAAAATTTA	<u>GAATTC</u> CTAACACCCATTTACTTTTACATGAAG
084L	47	417	<u>AAGCTTGGGATGG</u> GAAAATTTAATTCTTCAGAAGTTTCTTC	<u>GGATCC</u> AATAACCATAATTATATAATTGTGG
104L	54	191	<u>GGATCCGGGATGG</u> ACCACATTACGTTGTTGTAATCG	<u>GAATTC</u> CATATACAACGATGGATCTGCGC
227L	50	140	<u>GGATCCGGGATGG</u> ACCAAAAAGGAGCCTGAAATTA	<u>GAATTC</u> CAAGCCAATTTCTACCATAAAAAG
366R	48	362	<u>GGATCCGGGATGG</u> ACCATTATTAAGAAAACGATCTTTATC	<u>GAATTC</u> CATAATTTCTCATCATGATAAGATGA
378R	50	599	<u>GGATCCGGGATGG</u> AACATCGAAATGTAGTAAATGGC	<u>GAATTC</u> CTTAGGTAAATATGCTTTATACCATC
GFP	55	781	<u>GGGATCC</u> CCCGGGATGGAGTAACGTACCTTTAGCAACGGA	<u>CGGAATT</u> CTCACTTGACAGCTCGTCCAT

*İleri primerlerin baş kısmına restriksiyon endonükleaz bölgeleri (italik ve altı çizili bölgeler; GGATCC: BamHI, GCGGCCGC: NotI, GAATTC: EcoRI, AAGCTT: HindIII) ve Kozak dizisi (kalın olarak belirtilmiş bölge: **GGGATGG**) eklenmiştir. İleri ve geri primerlere eklenmiş yeşil nükleotitler çerçeve kaymasını önlemek için ilave edilen nükleotitleri göstermektedir. Kırmızı ORF'ler: Sinyal peptid veya transmembran domain içerenler.

3.2. Viral Genlerin Transkripsiyon Sınıflarının Belirlenmesi

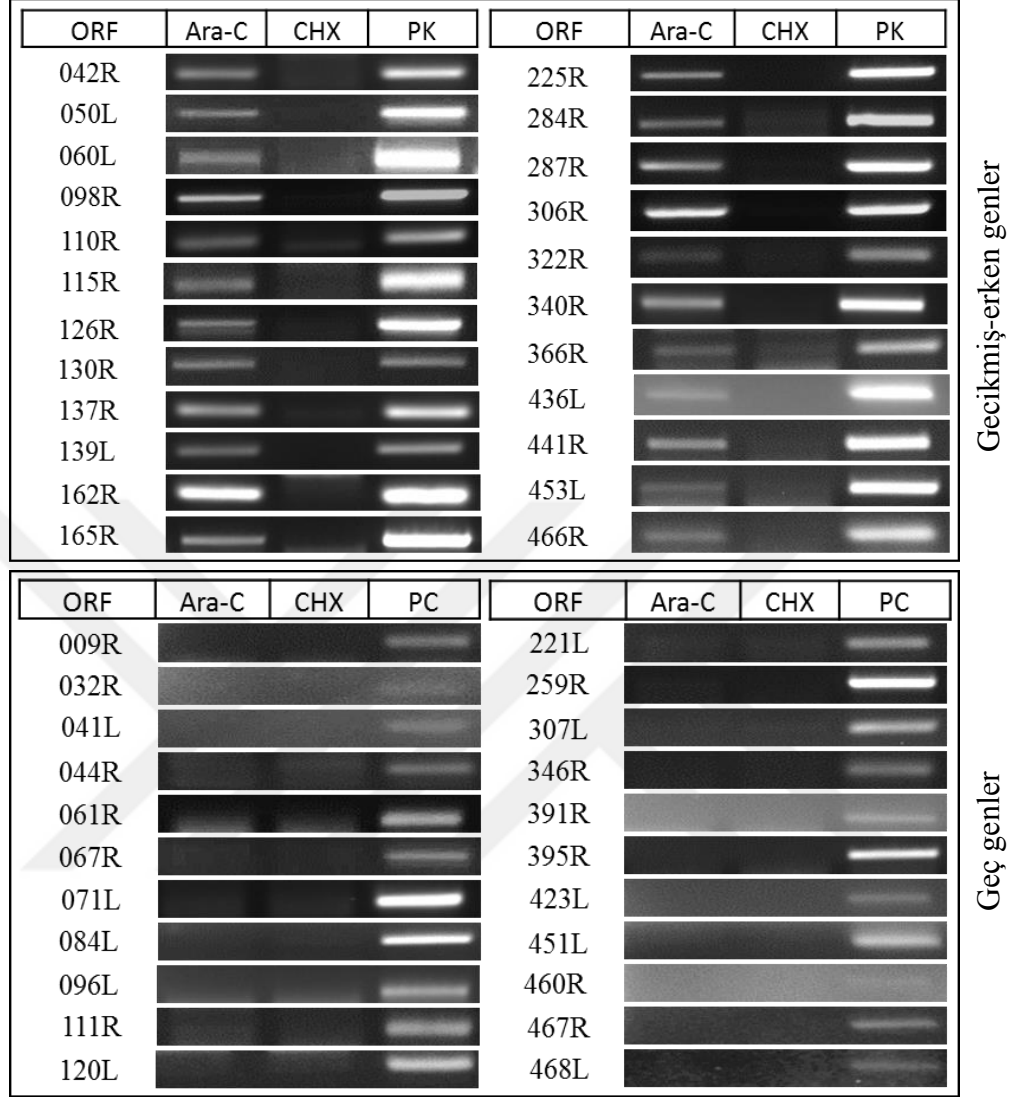
DNA ve protein sentezi inhibitörleri (Ara-C ve CHX) varlığında enfekte edilmiş Sf9 hücrelerinden RNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen RNA'lar DNaz I ile muamele edilerek ortamda bulunabilecek DNA kalıntılarından temizlendi. Ardından bu RNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve her gene özgü geri primerler ile cDNA sentezleri gerçekleştirildi. Oluşturulan bu cDNA'lardan her gene uygun tasarlanmış primer çiftleriyle PCR reaksiyonları yapıldı (Şekil 10).

RT-PCR sonuçlarına göre viral genler erken, gecikmiş erken ve geç olmak üzere üç farklı gruba ayrıldılar. Kullanılan inhibitörlerle DNA replikasyonuna ve protein sentezine ihtiyaç duymadığı belirlenen genler erken sınıfına, DNA replikasyonuna ihtiyaç duyarken protein sentezine ihtiyaç duymayan genler gecikmiş erken sınıfına, hem DNA replikasyonuna hem de protein sentezine ihtiyaç duydukları için her iki inhibitörün varlığında tespit edilemeyen genler de geç gen sınıfına dahil edildiler.



Şekil 10. İnhibitörler varlığında enfekte hücrelerden izole edilen RNA'lardan yapılan en erken, gecikmiş erken ve geç genlere ait RT-PCR görüntüleri. Ara-C (sitozin arabinozit): DNA sentezi inhibitörü; CHX (sikloheksimit): protein sentezi inhibitörü; ORF: açık okuma zinciri; PK: pozitif kontrol (DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonu).

Şekil 10'un devamı



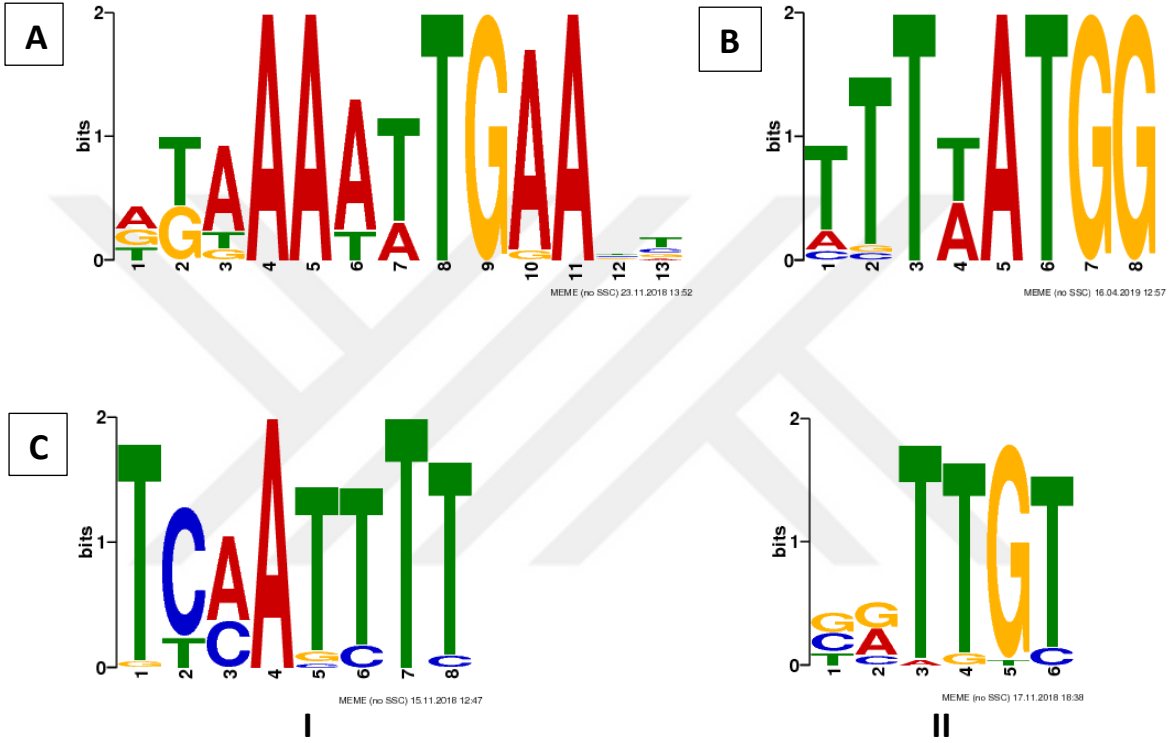
Bu sonuçlara göre sınıflandırılması literatürde yapılmamış 171 genden 114 tanesi en erken, 23 tanesi gecikmiş erken ve 22 tanesi geç gen sınıfına ait genler olarak gruplandırıldı. 12 tane ORF'nin ise transkripsiyon sınıfları belirlenemedi.

3.3. Korunmuş Bölge Analizleri

IIV6 genleri 3 sınıf altında gruplandırıldıktan sonra bu genlerde promotor olarak görev yapabilecek korunmuş DNA dizilerinin varlığı araştırıldı. Bu işlem için, IIV6'nın tüm genlerinin ATG'den itibaren 200 baz çifti yukarı bölgeleri gen bankasından alındı ve her gen

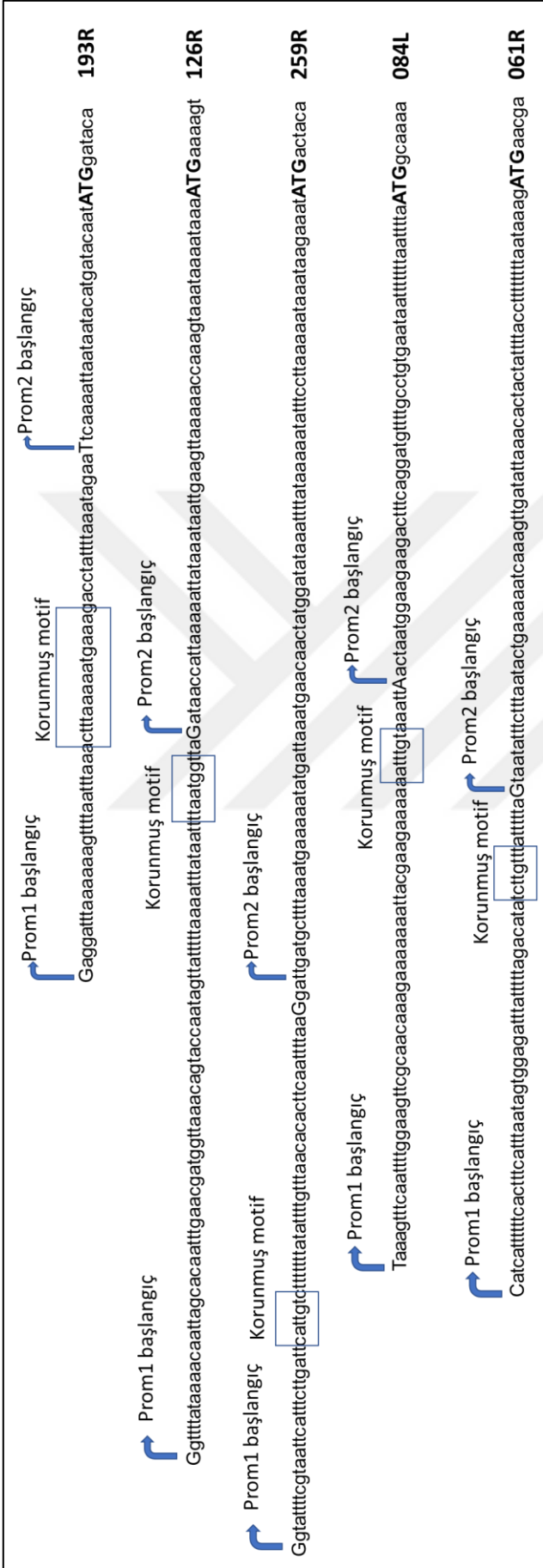
kendi grubu içerisinde korunmuş sıraya sahip olmaları bakımından MEME Suite veritabanı kullanılarak analiz edildiler.

Analiz neticesinde en erken genler için TAAAATTGAA, gecikmiş erken genler için de TTTTATGG şeklinde birer korunmuş motif bulunurken, geç genler için ise TCAATTTT ve NNTTGT şeklinde 2 farklı korunmuş motif belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. IIV6 ORF'lerinin 5' yukarı bölgelerinde belirlenen korunmuş motifler. Her açık okuma zincirinin translasyon başlangıç noktasından (ATG) itibaren 200 baz yukarı bölgesi veri tabanından alındı ve her grup kendi içinde MEME Suite veri tabanında interaktif olarak analiz edildi. Parametreler sadece ileri yönde ve dizi başına 0 veya 1 motif bulunacak şekilde ayarlandı. A: En erken, B: Gecikmiş erken ve C: Geç genlerden elde edilen motifleri göstermektedir. Harflerin büyüklüğü korunmuşluk düzeyinin yüksek olduğunu göstermektedir.

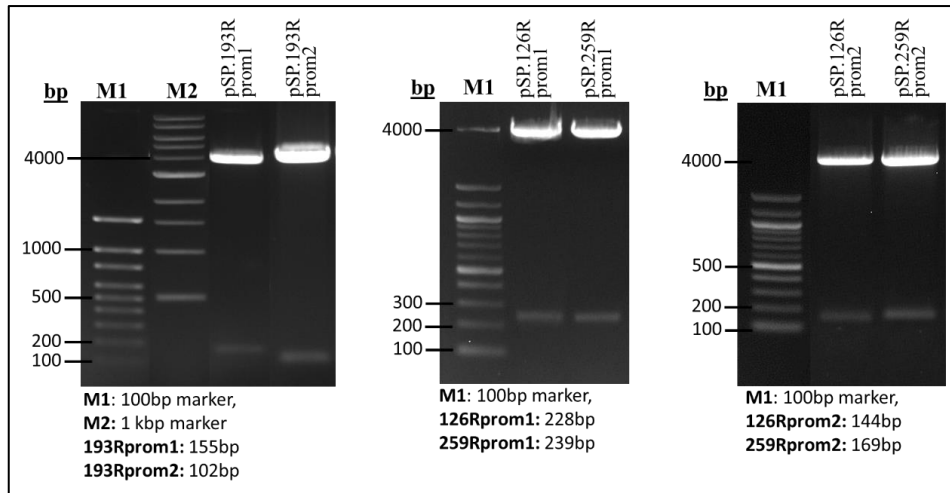
Üç sınıf gen için tespit edilen motifleri ve yapılan delesyon mutasyonlarını göstermek amacıyla her bir genin yukarı bölgeleri Şekil 12'de belirtilmiştir.



Şekil 12. Muhtemel promotor bölgeleri. ATG: translasyon başlangıç noktası. Prom1: Motifi içeren promotor fragmanı, Prom2: Motifi içermeyen promotor fragmanı.

3.4. Genlerin 5' Yukarı Bölgelerinin pSP-Luc+NF Plazmidine Klonlanması

Korunmuş motifler belirlendikten sonra, bu motiflerin promotor olarak görev yapıp yapmadıkları araştırıldı. Bunun için her gruptan birer gen (193R/en erken gen; 126R/erken gen; 259R/geç gen) seçildi. Seçilen genlerin yukarı bölgeleri, tespit edilen motifleri içeren ve içermeyen olmak üzere her bir gen için iki farklı fragman olacak şekilde viral DNA'dan PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bu sıralar, pSP-Luc+NF vektöründe bulunan *luciferaz* geninin baş kısmına, bu genin transkripsiyonunu oluşturması için KpnI-HindIII restriksiyon enzimleri ile promotor sıfatıyla yerleştirildiler. Genlerin motifi içermeyen kısa fragmanlarını çoğaltırken her genin motiflerini içeren uzun fragmanlarının klonlandığı rekombinant pSPLuc+NF plazmitleri kalıp olarak kullanıldı. Uzun fragmanları içeren plazmitlerin kalıp olarak kullanıldığı PCR'larda, kısa fragmanı çoğaltmak için ucunda NarI kesim bölgesi bulunan geri primer kullanıldı. Bu primer, pSP-Luc+NF vektöründeki *luciferaz* geninin içinde bulunan bir bölgeye uygun olacak şekilde tasarlandı (pSP-NarI-Rev). Çoğaltılan genler pSP-Luc+NF vektörüne KpnI-NarI enzim bölgeleri ile klonlandı. Rekombinant pSP-Luc+NF'nin promotor fragmanlarını içerdiği KpnI-NarI enzimleri ile kesilerek onaylandı (Şekil 13). Neticede elde edilen rekombinant plazmitler "promotor plazmitleri" olarak adlandırıldı. Bu plazmitlerden korunmuş motifi içerenler pSP193Rprom1, pSP126Rprom1 ve pSP259Rprom1 olarak isimlendirilirken, motifi içermeyen plazmitler ise pSP193Rprom2, pSP126Rprom2 ve pSP259Rprom2 olarak isimlendirildi.

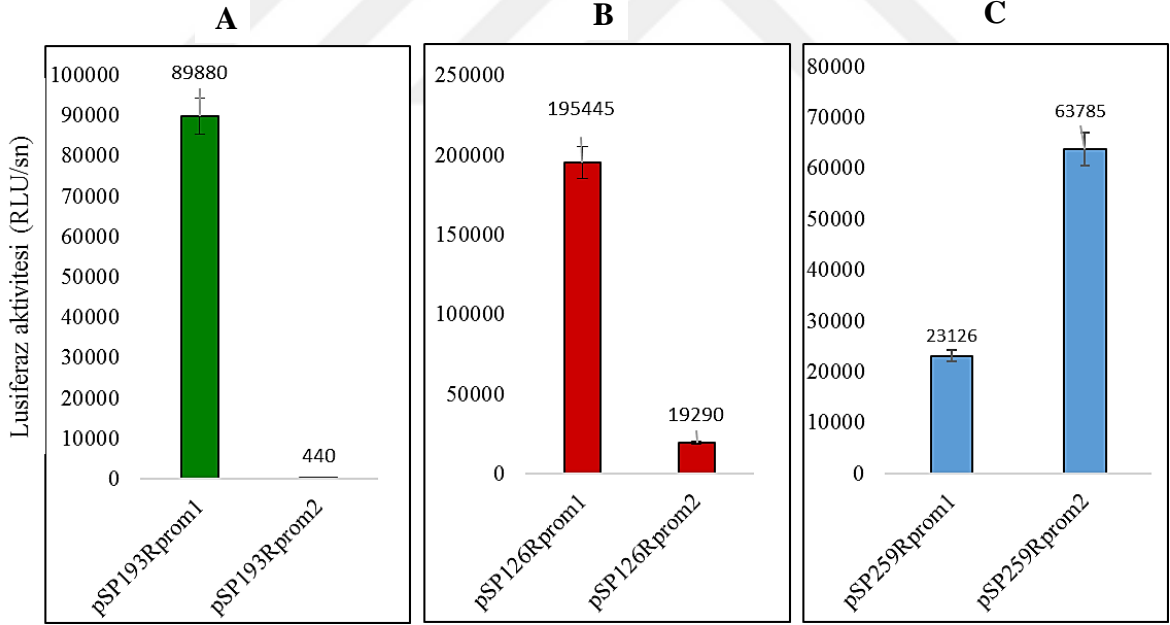


Şekil 13. 193R, 126R ve 259R muhtemel promotor plazmitlerinin kesim analizi. Motifli (prom1) ve motifsiz (prom2) promotor fragmanlarını içeren plazmitler KpnI ve NarI enzimleri ile kesildi.

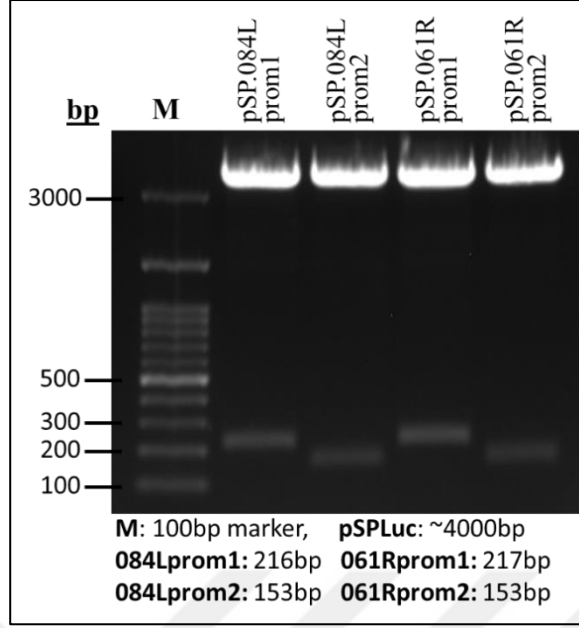
3.5. Promotor Bölgelerinin Lusiferaz Aktiviteleri

Muhtemel promotor bölgelerinin klonlanmasıyla oluşturulan rekombinant pSP-luc+NF plazmitlerinin her biri virüsle enfekte edilmiş Sf9 hücrelerine transfekte edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler toplanarak lusiferaz ölçümleri gerçekleştirildi.

Şekil 14'te görüldüğü üzere en erken ve erken gruba genlerin korunmuş motifi içeren promotor plazmitlerinde promotor aktivitesi yüksek, korunmuş motifi içermeyen promotor plazmitlerinde promotor aktivitesi düşüktür. Ancak, geç genin korunmuş motifi içeren plazmidinde promotor aktivitesi düşük, korunmuş motifi içermeyen plazmidinde ise promotor aktivitesi yüksektir. Bu durumu doğrulamak amacıyla ilave iki farklı geç gene (084L ve 061R) ait yukarı bölgeler klonlanarak deney tekrarlandı. Motifleri içeren plazmitler pSP084Lprom1 ve pSP061Rprom1 olarak, motifleri içermeyen plazmitler ise pSP084Lprom2 ve pSP061Rprom2 olarak isimlendirildi. Rekombinant plazmitlerin promotor fragmanlarını içerdiği KpnI-NarI enzimleri ile kesilerek onaylandı (Şekil 15).

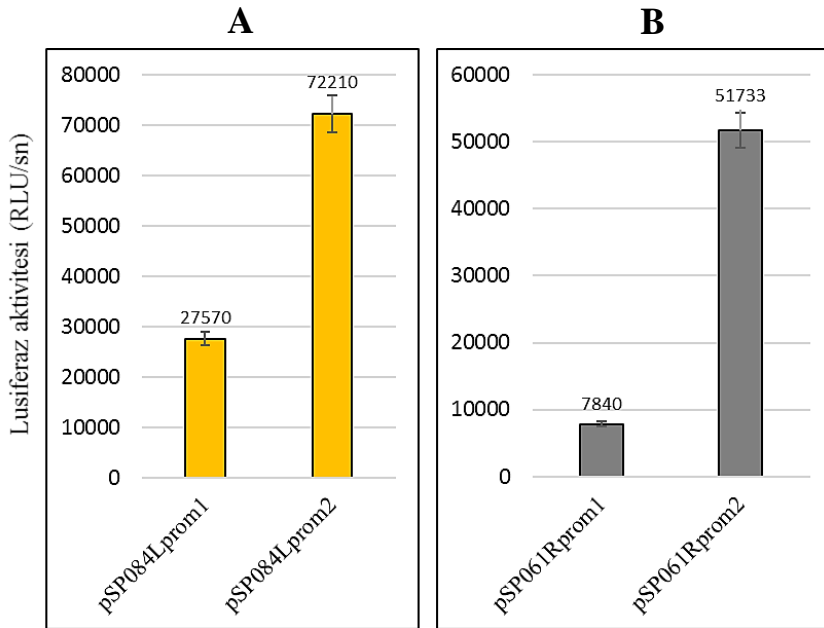


Şekil 14. Muhtemel promotor bölgelerinin lusiferaz aktiviteleri. A: ORF193R (en erken), B: ORF126R (gecikmiş erken), C: ORF259R (geç). Prom1: motif içeren promotor bölgelerini ve prom2: motif içermeyen plazmitlerin aktivitesini göstermektedir. RLU: bağıl ışık birimi



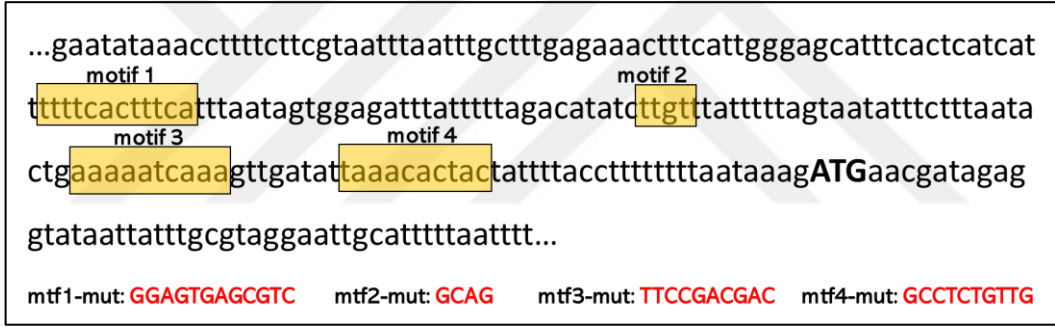
Şekil 15. 084L ve 061R muhtemel promotor plazmitlerinin kesim analizi.

084L ve 061R için hazırlanan promotor plazmitlerinin virüs ile enfekte edilmiş böcek hücrelerine transfeksiyonları gerçekleştirildi ve lusiferaz aktiviteleri ölçüldü (Şekil 16). Sonuçlar daha önce 259R için alınan sonuç ile paralellik gösterdi.



Şekil 16. Geç genlere ait muhtemel promotor bölgelerinin lusiferaz aktiviteleri. A: 084L'ye ait sonuçlar. B: 061R'ye ait sonuçlar. prom1: motif içeren ve prom2: motif içermeyen plazmitler.

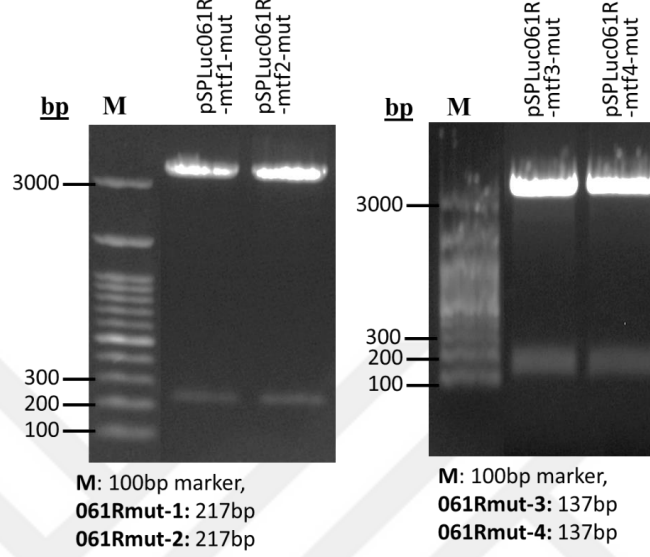
Üç farklı geç gen muhtemel promotor bölgeleri ile yapılan lusiferaz aktivite deneylerine göre, belirlenen korunmuş motifler (motif 1 ve motif 2) silindiğinde promotor aktivitelerinde önemli ölçüde artış olduğu tespit edildi. Dolayısıyla bu motiflerin birinin veya ikisinin genin transkripsiyonunda baskılayıcı (represör) görev yapabilecekleri düşünüldü. Bu düşüncüyü test etmek amacıyla, 061R ORF'sine ait motif 1 ve motif 2'de ayrı ayrı mutasyonlar (yönlendirilmiş mutagenез) gerçekleştirildi. 061R promotor bölgesinde belirlenen motiflerde mutasyonları yaparken değiştirilen nükleotitler Şekil 17'de belirtildi. Hazırlanan mutant plazmitler pSPLuc061R-mtf1-mut ve pSPLuc061R-mtf2-mut olarak adlandırıldı ve KpnI-NarI enzimleriyle kesilerek doğrulandı (Şekil 18). Bu plazmitler, virüs ile enfekte edilmiş hücrelere transfeksiyon yapıldı ve hücrelerdeki lusiferaz miktarı belirlendi (Şekil 19). Sonuç olarak motif 2'de yapılan mutasyonun promotor aktivitesinde artışa neden olduğu görüldü.



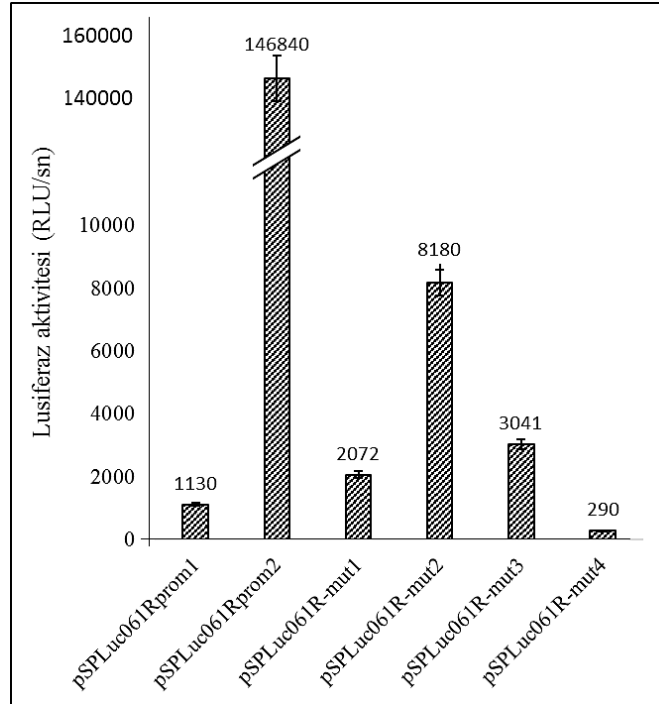
Şekil 17. ORF061R'nin yukarı bölgesinde yapılan mutasyonlar. Sarı bölgeler mutasyon yapılan yerleri temsil etmektedir. Değiştirilen nükleotitler kırmızı olarak yazılmıştır. **ATG**: Translasyon başlangıç bölgesi.

Geç genlere özgü bir promotor motifi veya promotor bölgesi hakkında henüz sonuca varamamamız nedeniyle bu genler için promotor arayışına devam edildi. Motiflerin olmadığı kısa promotor plazmitlerinde yüksek lusiferaz aktivitesi belirlendiği için anahtar promotor sırasının bu kısa bölgede olması gerektiği düşünüldü ve bu bölgeler içerisinde korunmuş motifler MEME suite programı aracılığı ile tarandı. Analiz sonucunda bu bölgede iki potansiyel motif (motif-3 ve motif-4) tespit edildi. Bu kısa bölgede tespit edilen iki farklı motif üzerinde ayrı ayrı mutasyonlar yapıldı (Şekil 17). Mutant bölgeleri içeren fragmanlar aynı şekilde pSPLuc+NF plazmidine klonlandı. Elde edilen plazmitler pSPLuc061R-mtf3-mut ve pSPLuc061R-mtf4-mut olarak adlandırıldı ve KpnI-NarI enzimleriyle kesilerek

doğrulandı (Şekil 18). Bu plazmitlerin virüs ile enfekte böcek hücrelerine transfeksiyonu ve ardından lusiferaz ölçümü yapıldı. Sonuç olarak her iki motifin mutasyonu durumunda da aktivitede önemli ölçüde düşüş görüldü (Şekil 19).



Şekil 18. 061R yukarı kısımlarında yapılan mutasyon bölgelerini içeren vektörlerin kesim analizi.

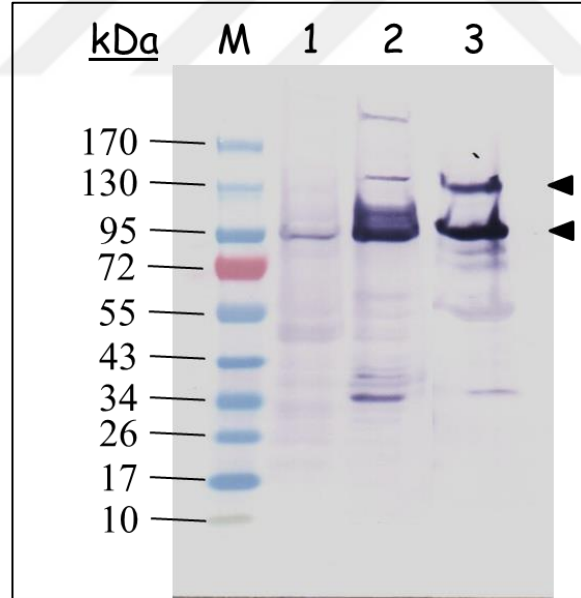


Şekil 19. 061R'nin yukarı bölgelerinde yapılan mutasyonların lusiferaz aktiviteleri.

3.6. IIV6 En Erken Genlerinin Transaktivatör Proteinlerinin Belirlenmesi

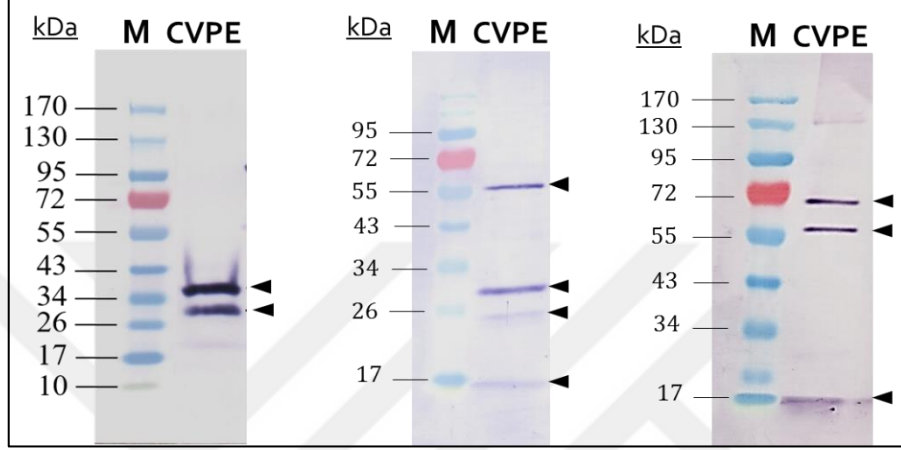
3.6.1. Southwestern Hibridizasyonu ile Potansiyel Transaktivatör Proteinlerin Büyüklüklerinin Tespit Edilmesi

Konak hücreler virüs tarafından enfekte edildikten sonra hücrelerin sitoplazmik ve nükleer proteinleri izole edildi. Bu protein örnekleri SDS-PAGE’te yürütülerek membrana aktarıldı. Diğer yandan, IIV6’ya ait en erken genlerden biri olan 012L (*ekzonükleaz*)’nin promotor bölgesi oligo sentezi yapılarak fazla miktarda elde edildi. Bu DNA parçaları digoksinin (DIG) ile işaretlendi. Elde edilen virüse ait protein karışımları membrana aktarılarak bu işaretli DNA’larla hibritleştirildi. Bu proteinlerden 130 ve 95 kDa civarında olmak üzere iki farklı bölgede etkileşim olduğu görüldü (Şekil 20). Böylece en erken genlerin promotor bölgelerine bağlanan virüse ait yapısal proteinlerin büyüklükleri hakkında fikir elde edildi.



Şekil 20. IIV6 ile enfekte konak hücrenin (Sf9) nüklear ve sitoplazmik proteinleriyle southwestern analizi. 1: CIV ile enfekte hücrenin sitoplazmik proteinleri, 2: CIV ile enfekte hücrenin nüklear proteinleri, 3; CIV virionları. kDa: kilodalton. M: protein markır (PageRuler Pre-stained, 10-170 kDa)

Diğer yandan virion yapısında bulunan bütün proteinler deterjan (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS) yardımıyla çözülerek solüsyon halinde elde edilerek jele yüklendi. Pozitif kontrol olarak deterjanla muamele edilmemiş virionlar direkt jele yüklendi (Şekil 21).



Şekil 21. Viral yapısal proteinlerle elde edilen tekrarlı southwestern analizleri. CVPE: CIV viral protein ekstrakt (CIV'ye ait yapısal protein karışımı). Ok başları DNA-protein etkileşimlerinin olduğu yerleri göstermektedir. M: protein markır (PageRuler Pre-stained, 10-170 kDa)

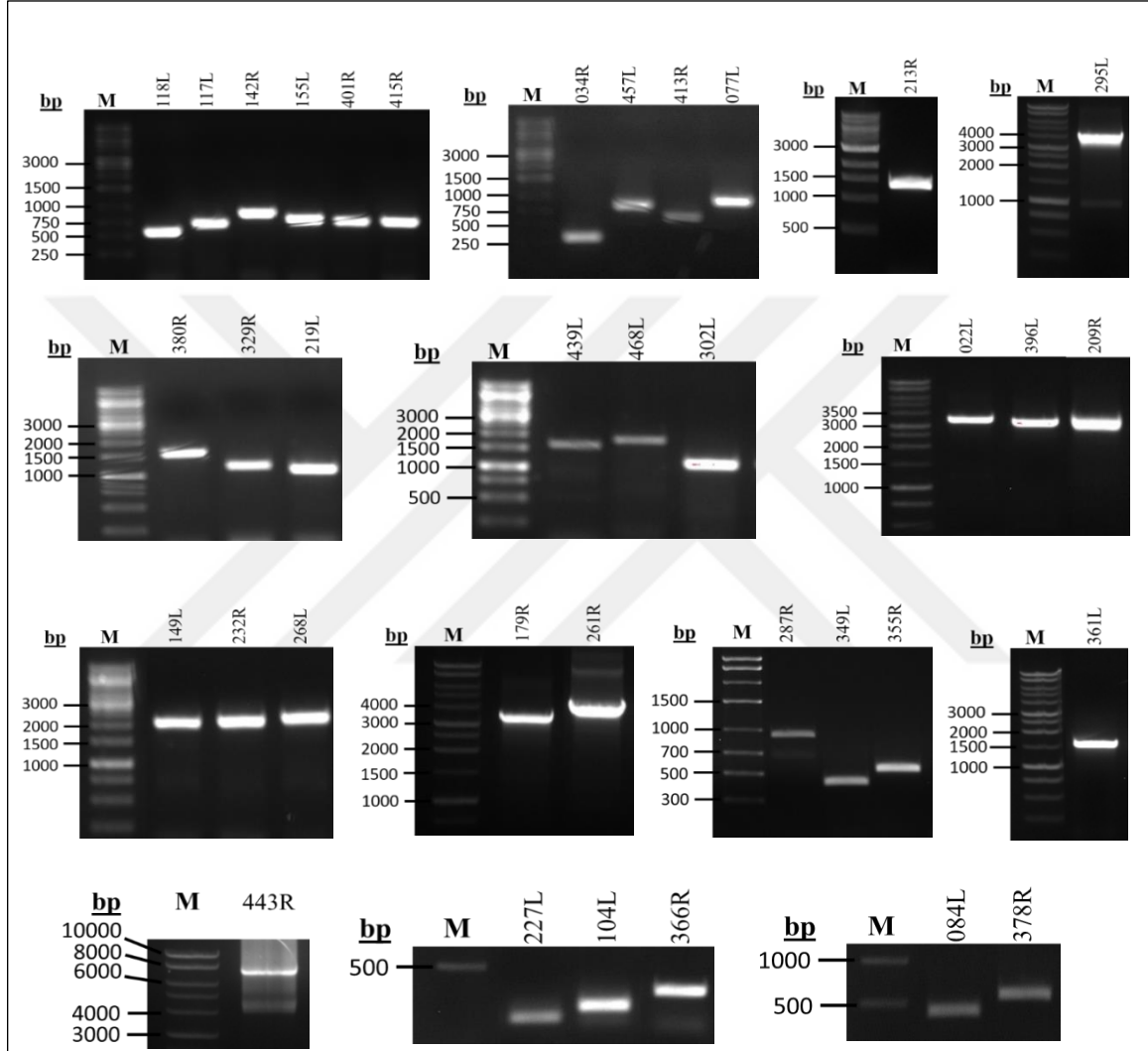
Bu deneyin tekrarlarından Şekil 21'de görüldüğü gibi elde edilen sonuçlara göre, en erken gen promotor dizisinin, yaklaşık 70, 55, 40, 30, 25 kDa civarında ve bir tane de 17 kDa'dan küçük moleküler ağırlıklara sahip olmak üzere 6 farklı bölgede etkileşim gösterdiği tespit edildi.

3.6.2. Potansiyel Transaktivatör Proteinleri Kodlayan Genlerin pIZ/V5-His Vektörüne Klonlanması

3.6.2.1. Potansiyel Transaktivatör Protein Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

South-western analizinde tespit edilen büyüklüklere tekabül eden yapısal proteinleri ve aynı zamanda sahip oldukları bazı önemli özelliklerinden (DNA bağlanma domaini, nükleer lokalizasyon sinyali) dolayı birkaç yapısal olmayan proteini kodlayan toplam 36 gen, teker teker pIZ/V5-His vektöründe bakülovirüs IE2 promotoru önüne klonlandı. Her bir

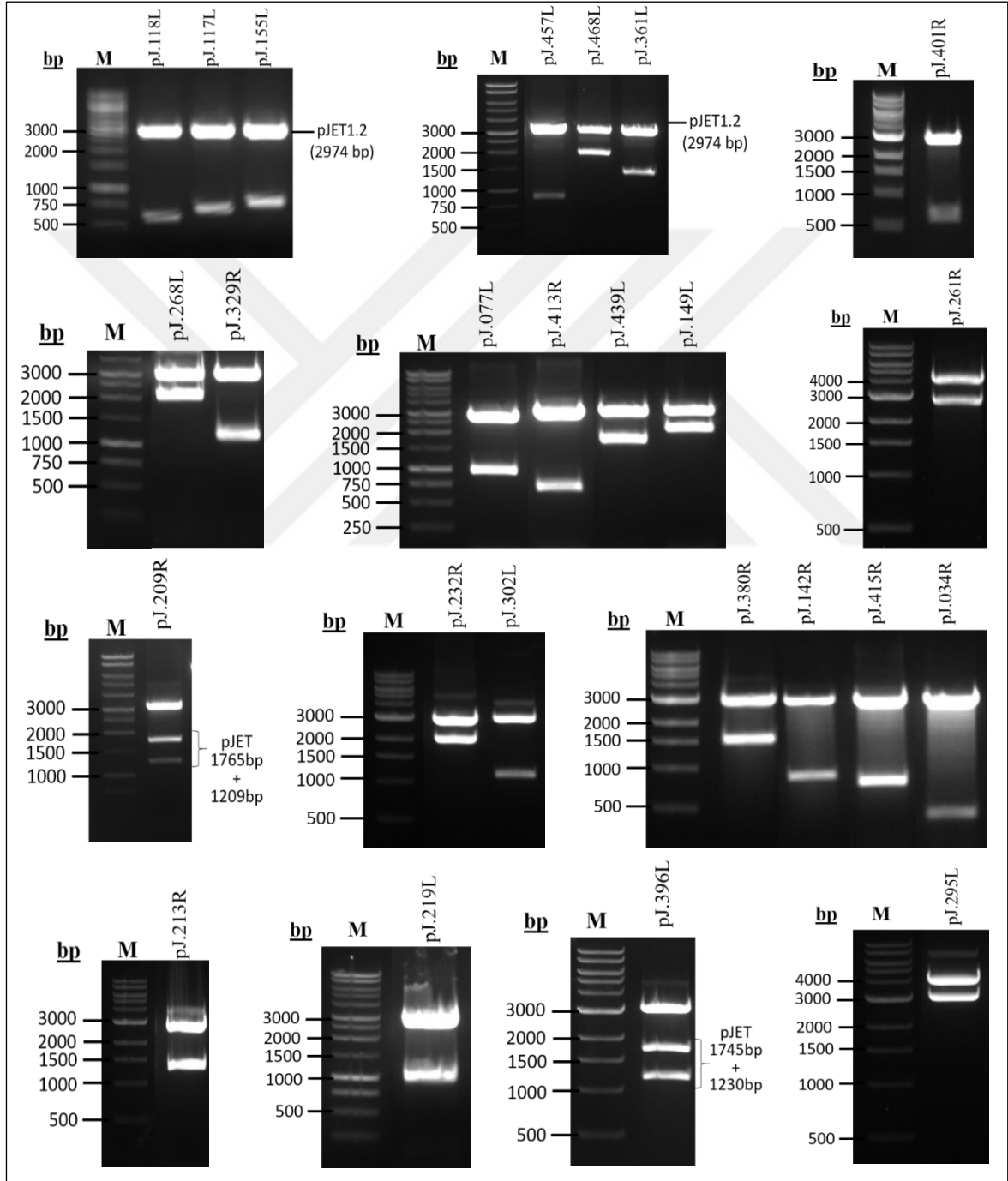
gen bölgesi Tablo 7’de verilen kendine özgü primerlerle yüksek doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimi kullanılarak PCR reaksiyonu yardımıyla çoğaltıldı ve etidyum bromür varlığında %1’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 22).



Şekil 22. Potansiyel transaktivatör gen bölgelerinin PCR görüntüleri. bp: baz çifti, M: markır (1 kbp)

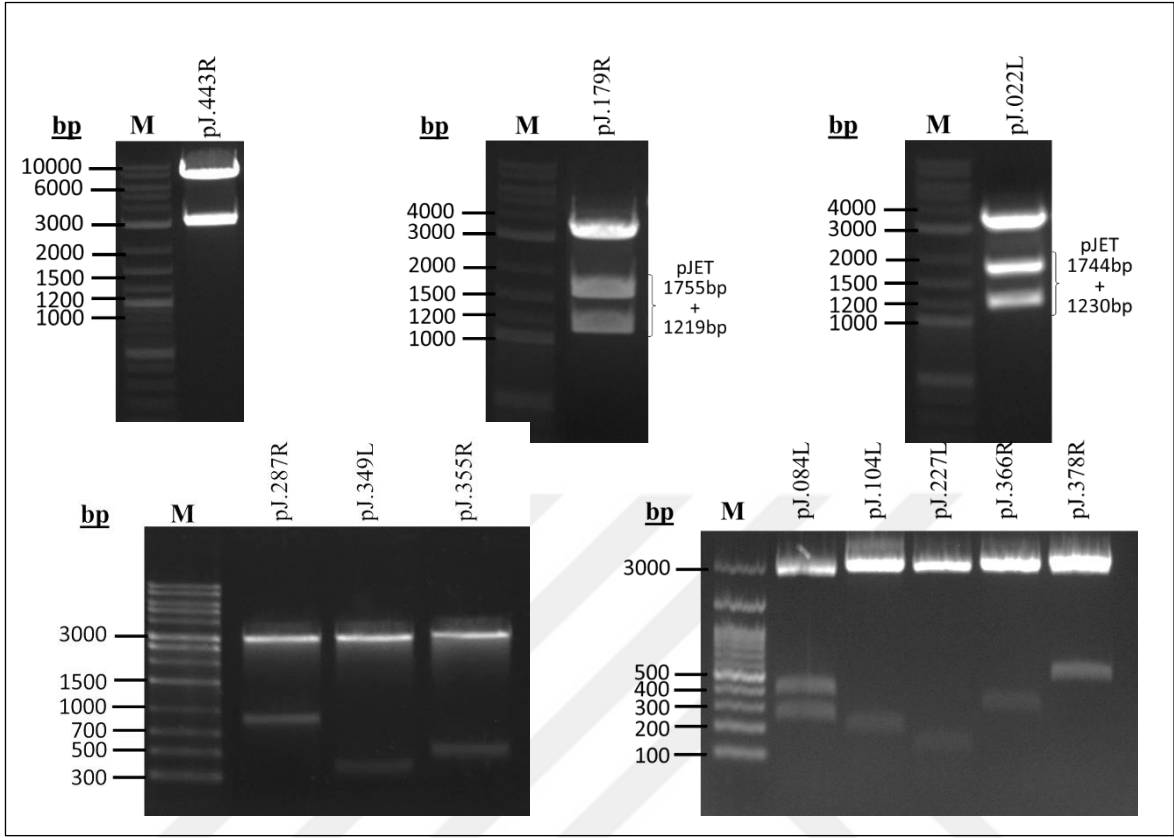
3.6.2.2. Gen Bölgelerinin Klonlama Vektöründe Gösterilmesi

Her bir gen bölgesi bol miktarda elde edilebilmesi için ara vektör olan pJET1.2/blunt'a klonlandı. Bu şekilde izole edilen plazmitlerden her bir gen primerlere ilave edilen enzim kesme bölgelerinden kesilerek agaroz jelden temizlendi (Şekil 23).



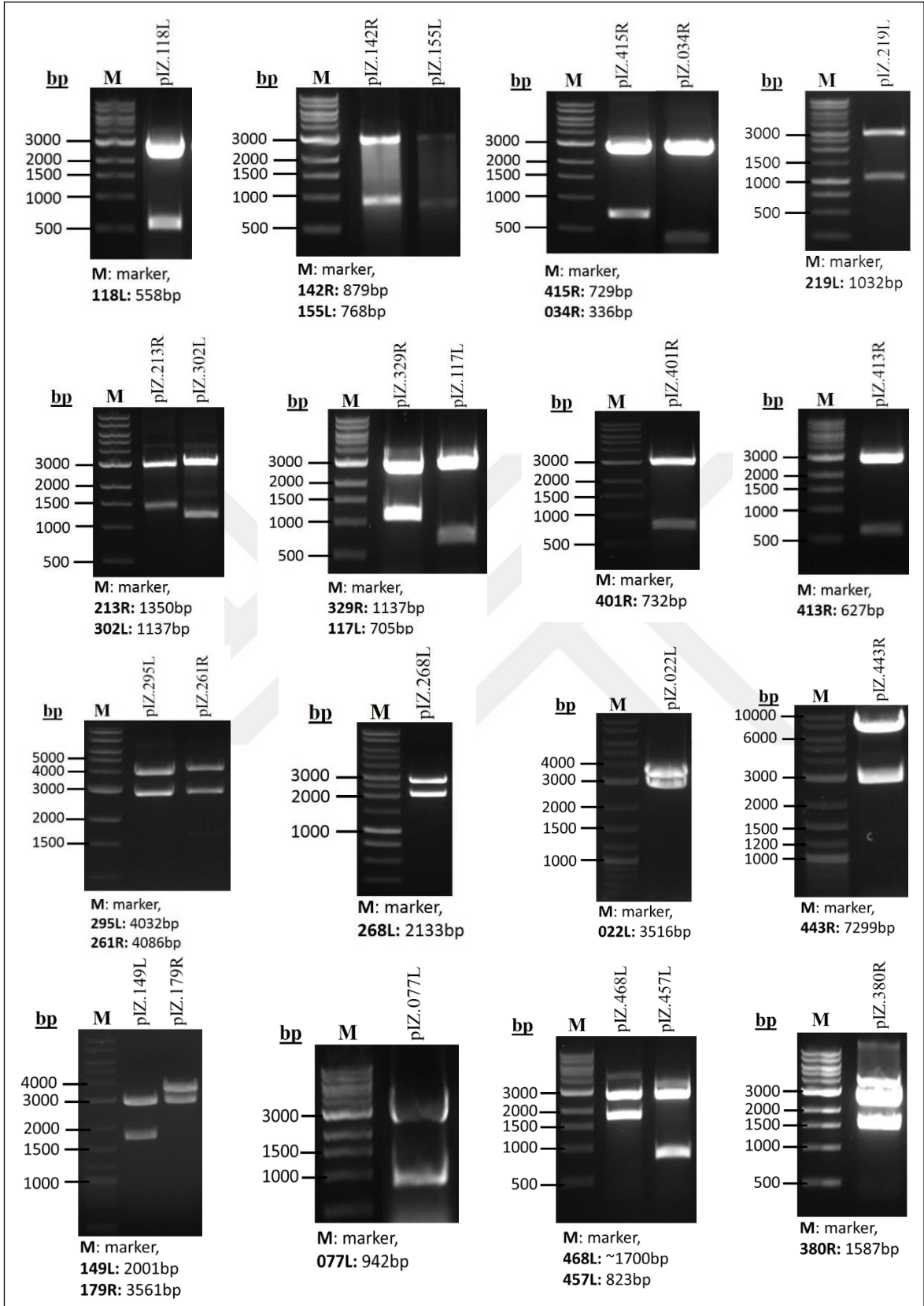
Şekil 23. IIV6 potansiyel en erken transaktivatör gen bölgelerinin ara vektörde doğrulanması. bp: baz çifti, M: markır (1 kbp).

Şekil 23'ün devamı



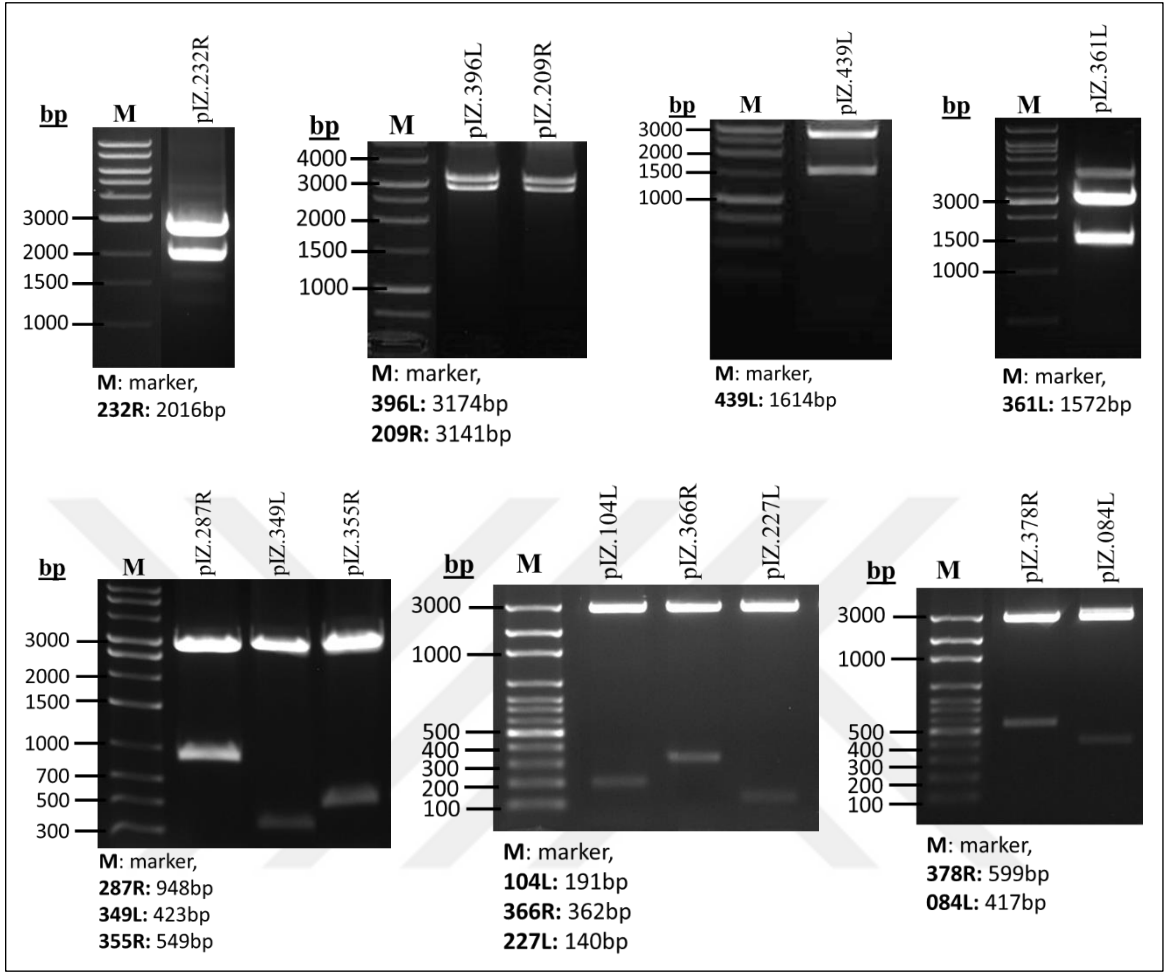
3.6.2.3. Gen Bölgelerinin Ekspresyon Vektöründe Gösterilmesi

Gen bölgeleri uygun enzimlerle kesildikten sonra protein ifadelerini sağlamak üzere aynı enzimlerle klonlamaya hazır hale getirilmiş pIZ/V5-His vektörüne klonlandılar. Rekombinant plazmitlerin doğruluğu, her bir gen bölgesine uygun enzimlerle tekrar kesim reaksiyonu kurulması ve kesim ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi ile belirlendi (Şekil 24).



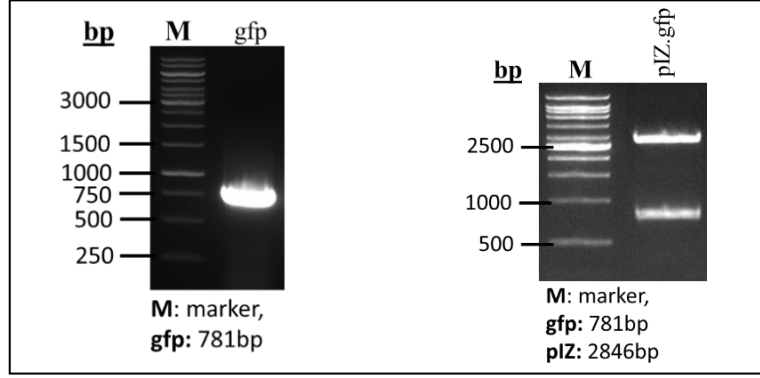
Şekil 24. IIV6 potansiyel en erken transaktivatör gen bölgelerinin ekspresyon vektöründe doğrulanması. Plazmitlerin isimleri şekillerin üstlerinde, gen bölgelerinin büyüklükleri şekillerin altlarında gösterilmiştir. bp: baz çifti, M: markır.

Şekil 24'ün devamı



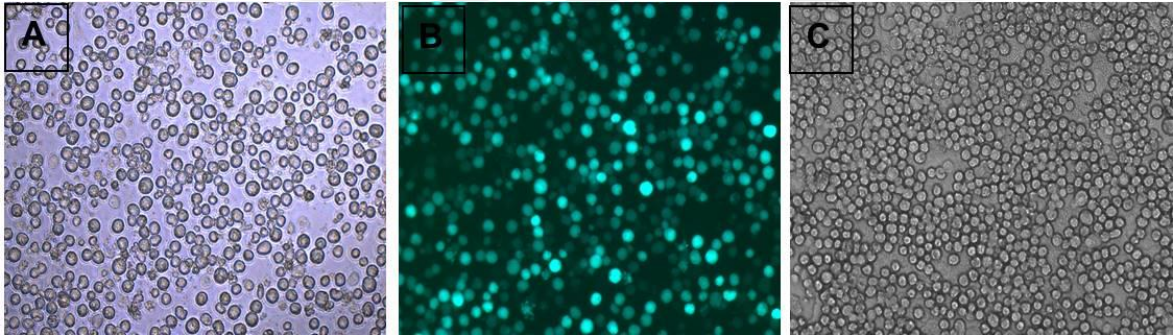
3.7. Yeşil Floresan Proteinin (GFP) pIZ/V5-His'te Ekspresyonu

Klonlanan genlerin ifade edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla oluşturulan bu plazmit, diğer gen bölgeleriyle aynı özelliklere sahip özel primerler yardımıyla çoğaltılan yeşil floresan proteini (GFP) ifade eden gen bölgesinin klonlanmasıyla oluşturuldu (Şekil 25). Aynı konak hücrelere transfeksiyondan sonra belli aralıklarla gözlemlendi ve 48 saat sonra proteinin ifade edildiği floresan mikroskop altında belirlendi (Şekil 26).



Şekil 25. Yeşil floresan geninin ekspresyon vektörüne klonlanması.

Hazırlanan plazmit DNA kullanılarak yukarıda anlatılan metot yardımıyla transfeksiyon yapıldı. Floresan mikroskop yardımıyla, ifade edilen GFP proteininin varlığı tespit edildi. Bu deney sonucunda ekspresyon vektörüne klonlanan bütün genlerin, ileri primerlere ilave edilen kozak dizisi sayesinde sorunsuz bir şekilde translasyona uğradıklarına karar verildi.



Şekil 26. pIZ/V5-His vektörüne klonlanmış yeşil floresan (*gfp*) geninin böcek hücrelerinde ifadesi. A: pIZ.gfp plazmidi transfekte edilen Sf9 hücreleri (beyaz ışık); B: pIZ.gfp plazmidi transfekte edilen Sf9 hücreleri (floresan ışık); C: Transfekte edilmeyen hücreler.

3.8. Potansiyel Transaktivatör Proteinlerden Elde Edilen Lusiferaz Aktiviteleri

En erken gen promotoruna sahip plazmit teker teker oluşturulan rekombinant plazmitlerle ayrı ayrı ve gruplar halinde transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra konak hücreler toplanarak lusiferaz aktivite ölçümlerinde kullanıldılar (Tablo 8).

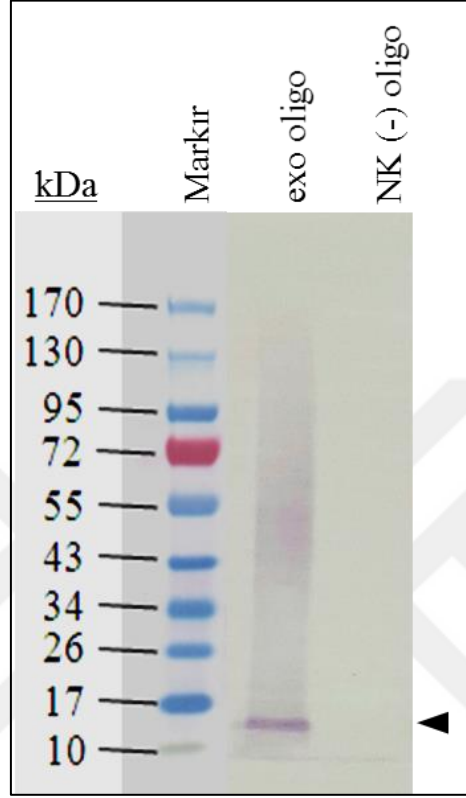
Tablo 8. Lusiferaz aktivite sonuçları

Plazmitler	Lusiferaz aktivitesi (RLU/sn)	Plazmitler	Lusiferaz aktivitesi (RLU/sn)
CIV + pSP.exoLuc (+)	1.423.355	pIZ.149L + pSP.exoLuc	1001
pIZ + pSP.exoLuc (-)	440	pIZ.179R + pSP.exoLuc	708
pIZ.118L + pSP.exoLuc	975	pIZ.443R + pSP.exoLuc	496
pIZ.117L + pSP.exoLuc	2274	pIZ.084L + pSP.exoLuc	382
pIZ.401R + pSP.exoLuc	774	pIZ.104L + pSP.exoLuc	399
pIZ.361L + pSP.exoLuc	2499	pIZ.227L + pSP.exoLuc	411
pIZ.142R + pSP.exoLuc	2710	pIZ.366R + pSP.exoLuc	406
pIZ.380R + pSP.exoLuc	833	pIZ.378R + pSP.exoLuc	371
pIZ.232R + pSP.exoLuc	634	pIZ.396L + pSP.exoLuc	1792
pIZ.415R + pSP.exoLuc	667	pIZ.209R + pSP.exoLuc	1811
pIZ.468L + pSP.exoLuc	784	pIZ.077L + pSP.exoLuc	966
pIZ.213R + pSP.exoLuc	2353	pIZ.302L + pSP.exoLuc	1431
pIZ.457L + pSP.exoLuc	1534	pIZ.155L + pSP.exoLuc	869
pIZ.329R + pSP.exoLuc	689	pIZ.413R + pSP.exoLuc	461
pIZ.034R + pSP.exoLuc	988	pIZ.295L + pSP.exoLuc	1.899
pIZ.219L + pSP.exoLuc	2793	pIZ.261R + pSP.exoLuc	1.740
pIZ.268L + pSP.exoLuc	820	pIZ.022L + pSP.exoLuc	710
pIZ.439L + pSP.exoLuc	2522	pIZ349L. + pSP.exoLuc	638
pIZ.287R + pSP.exoLuc	1115	pIZ.355R + pSP.exoLuc	745
104L, 366R, 378R, 084L, 227L, 443R, 295L, 179R, 022L, 261R, 209R, 396L + pSP.exoLuc	495	104L, 366R, 378R, 084L, 227L, 268L, 149L, 232R, 439L, 361L, 380R, 213R, 118L + pSP.exoLuc	369
104L, 366R, 378R, 084L, 227L, 219L, 142R, 457L, 155L, 401R, 117L, 415R + pSP.exoLuc	346	104L, 366R, 378R, 084L, 227L + pSP.exoLuc	490
Bütün plazmitler	437		

3.9. Kromatografi Yöntemiyle *exo* Promotoruna Bağlanan Proteinlerin Tespiti

CIV'e ait *exonuclease* (012L) geninin promotor bölgesi ve negatif kontrol amacıyla aynı GC içeriğine ve uzunluğa sahip farklı bir DNA dizisi, oligo sentezi yapılarak fazla miktarda elde edildi. Ardından CNBr-Aktif Reçine 4B kullanılarak hazırlanan dolgu maddesine bu oligolar bağlandı. Virüse ait yapısal protein karışımı (CIV viral protein ekstrakt, CVPE) bu reçineden geçirilerek oligolara bağlanan proteinler elde edildi. Bu

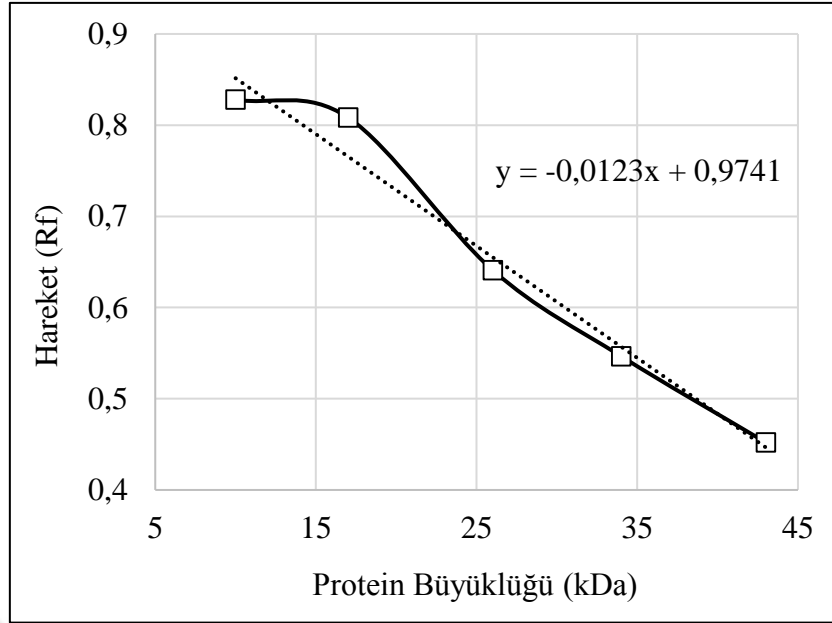
proteinler southwestern analizine tabi tutuldu (Şekil 27) ve proteinin büyüklüğü tahmin edildi.



Şekil 27. Kromatografi ile elde edilen protein örneklerinin southwestern analizi. M: protein markır (PageRuler Pre-stained, 10-170 kDa). Ok başı tespit edilen protein büyüklüğünün yerini işaret etmektedir. NK: negatif kontrol.

3.10. Protein Rf Değerinin Hesaplanması

Yapılan Rf değeri ölçümlerine göre kromatografik yöntemle belirlenen ve en erken gen promotoruna bağlanan proteinin başlangıç noktasına olan uzaklığının jel yürüme mesafesine oranının 0.8083 olduğu hesaplandı. Markır proteinlerinin büyüklükleriyle kıyaslandığında elde edilen bu ölçüm muhtemel proteinin 13,47 kDa civarında olması gerektiğini gösterdi (Şekil 28).



Şekil 28. Protein büyüklüklerinin tespit edilmesi için çizilen Rf grafiği

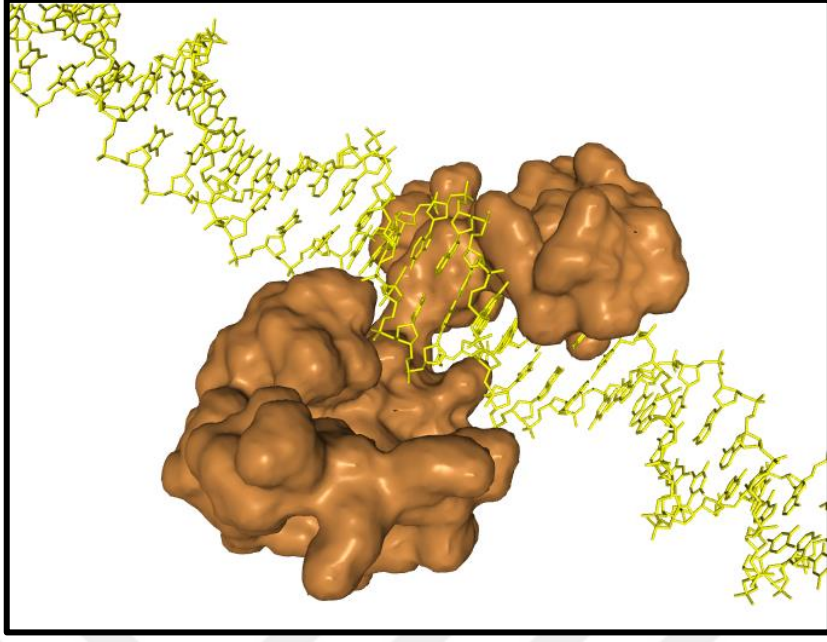
3.11. Muhtemel Transaktivatör Proteinlerin Biyoinformatik Analizi

IIV6'ya ait 26 kDa'dan küçük bütün yapısal proteinlerin DNA-bağlanma özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla 18 tane çift veya daha fazla peptide göre, 7 tane tek peptide göre tespit edilen yapısal protein sıralarının DNA bağlanma özellikleri araştırıldı. Biyoinformatik tarama neticesinde sadece 3 tanesinin (378R, 366R ve 104L) DNA bağlanma özelliğine sahip olduğu görüldü (Tablo 9). Kullanılan programa göre DNA-bağlanma ihtimali 1,0'e ne kadar yakın olursa bağlanmanın özgüllüğünün o kadar güçlü olduğu anlamına gelmektedir. Analiz edilenlerden sadece iki tanesinin (366R ve 104L) DNA-bağlanma ihtimalinin 1,0 olduğu ve iki taneden 366R ORF'sinin moleküler ağırlığının Şekil 27'deki membranda çıkan bandı desteklediği görülmüştür. Ardından 366R'nin en erken gen promotorunda bağlandığı motifle etkileşimi görselleştirilmiştir (Şekil 29).

Tablo 9. Muhtemel transaktivatör kompleksi başlangıç proteinlerinin DNA-bağlanma analizi*

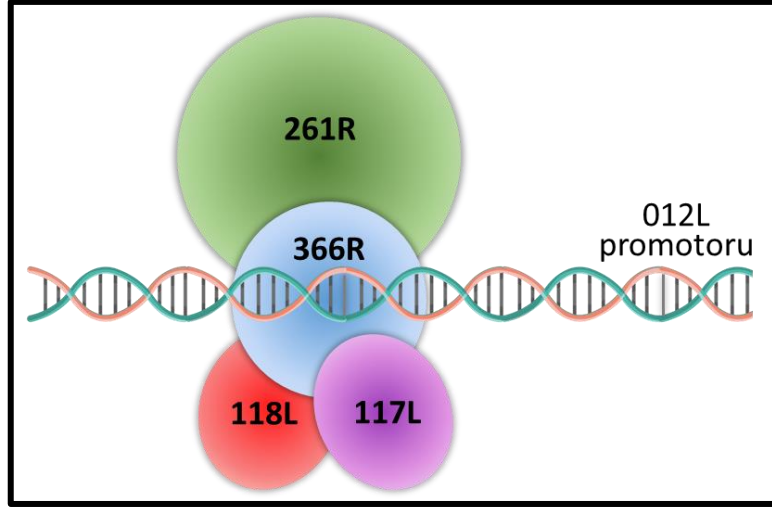
ORF	Moleküler Ağırlığı (kDa)	Skor	DNA-Bağlanma İhtimali	Tahmin
309L	24.83	-1.267	0.2198	non-DNA-binding
422L	22.73	-1.054	0.2585	non-DNA-binding
378R	22.21	6.873	0.9990	DNA-binding
355R	22.01	1.697	0.8451	non-DNA-binding
234R	21.09	-1.850	0.1359	non-DNA-binding
111R	20.01	0.038	0.5094	non-DNA-binding
096L	19.69	-0.272	0.4325	non-DNA-binding
374R	19.12	-1.698	0.1548	non-DNA-binding
325L	18.91	0.788	0.6875	non-DNA-binding
203L	18.53	-0.279	0.4306	non-DNA-binding
084L	18.40	2.977	0.9515	non-DNA-binding
061R	17.91	-1.186	0.2340	non-DNA-binding
123R	16.38	0.644	0.6556	non-DNA-binding
453L	15.91	-1.625	0.1646	non-DNA-binding
034R	14.63	-4.962	0.0069	non-DNA-binding
366R	13.66	12.771	1.0000	DNA-binding
138R	13.03	1.469	0.8129	non-DNA-binding
312R	10.60	2.111	0.8919	non-DNA-binding
130R	23.18	-0.295	0.4267	non-DNA-binding
307L	22.86	1.000	0.7310	non-DNA-binding
395R	17.28	0.433	0.6066	non-DNA-binding
010R	12.84	-2.494	0.0763	non-DNA-binding
342R	9.33	-3.603	0.0265	non-DNA-binding
227L	7.72	3.178	0.9600	non-DNA-binding
104L	7.05	24.894	1.0000	DNA-binding

*Koyu gri ile gölgelendirilen proteinler çift veya daha fazla peptide göre tespit edilen ve açık gri ile gölgelendirilen proteinler tek peptide göre belirlenen yapısal proteinleri göstermektedir. Kalın olarak yazılanlar DNA (012L promotor dizisi)'ya bağlanma özelliği gösteren proteinleri temsil etmektedir.



Şekil 29. 012L promotor dizisi ile 366R proteini arasındaki etkileşimin *in silico* gösterimi

En erken genlerin muhtemel promotorlarındaki motiflere bağlanma ihtimali en yüksek proteinin biyoinformatik olarak 366R olduğu belirlendi. Ancak 366R'nin tek başına bu işi gerçekleştirmediği yapılan lusiferaz aktivite deneyleriyle tespit edildi. Dolayısıyla promotor bölgesine bağlanan bu muhtemel küçük yapısal proteinin başka proteinlerle bir kompleks oluşturarak birlikte transaktivatör görevini yaptıkları düşünülmektedir. Bu noktada 366R'nin etkileştiği proteinlerden (Ozsahin vd., 2018) yararlanılarak kompleksin modeli şematik olarak gösterildi (Şekil 30). 366R yapısal proteini ile etkileşim halinde olduğu belirtilen diğer yapısal proteinlerin arasındaki bağlanma kuvveti HDOCK veritabanı kullanılarak belirlendi. En güçlü etkileşimin 261R ile olduğu (docking score: -336) tespit edildi. Bunun dışında birbiriyle etkileşim halinde olan 118L ve 117L'nin de her ikisinin 366R ile etkileşimlerinin olduğu bilinmektedir. Muhtemel kompleks içerisinde 366R dışındakilerin DNA'ya bağlanma afiniteleri olmadığı için sadece proteinlere bağlanarak bu gruba katılabilirler. 366R (13,67 kDa) ile etkileşim halinde bulunan 261R (129,06 kDa), 118L (55,29 kDa) ve 117L (27,45 kDa)'nin moleküler ağırlıkları, bu etkileşimlerin kombinasyonlarının southwestern sonuçlarında çıkan daha büyük bantların moleküler ağırlıklarının anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 30. Muhtemel transaktivatör kompleksinin modeli.

4. TARTIŞMA

Iridoviridae familyası üyeleri nükleositoloplazmik büyük DNA virüsleri (NCLDV, nucleocytoplasmic large DNA viruses) olup çeşitli omurgalı ve omurgasız canlılar üzerinde enfeksiyon geliştirme özelliğine sahiptirler. Özellikle sucul ve soğukkanlı omurgalılar üzerinde ölümcül hastalıklara neden olan iridovirüslerin enfeksiyon mekanizmasının anlaşılması, balıkçılık ve kültürü yapılan diğer su ürünlerinde ürün kaybının engellenmesi açısından önemlidir. Diğer yandan, böcekler ve izopodlar gibi diğer omurgasız canlılar üzerindeki etkilerinden dolayı, tarımsal ürünlere zarar veren organizmalara karşı biyolojik mücadele ajanı olarak geliştirilme potansiyeline sahiptirler. Bunların dışında, ökaryotik hücrelere aktarıldıklarında hücreyel immün cevap oluşmasını tetikledikleri için immünoloji ve gen terapi amacıyla da dikkat çekmektedirler. Tüm bu amaçlar doğrultusunda omurgalıları enfekte eden iridovirüsler için model organizma olarak *Frog virus 3* (FV3) kullanılırken, omurgasızlardaki çalışmalar için *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6) kullanılmaktadır. Günümüze kadar IIV6 üzerine yapılmış çeşitli proteomik (Ince vd., 2010; Ozsahin vd., 2018) ve transkriptomik (Dizman vd., 2012; Ince vd., 2013; Ince vd., 2008; Nalcacioglu vd., 2003; Nalcacioglu vd., 2007) çalışmalar mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, IIV6 genomunda bulunan daha önce sınıflandırılması yapılmamış tüm açık okuma zincirlerinin (ORF, open reading frames) transkripsiyonel sınıflarının belirlenmesi, genlerin transkripsiyonlarında görev yapan promotor motiflerinin araştırılması ve virüs enfeksiyonunun başlaması için gerekli olan en erken genlere ait transaktivatör proteinlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarla tek ve çift peptide göre belirlenen 54 yapısal proteini kodlayan genlerden 41 tanesinin sınıfı LACE (ligation-based amplification of cDNA ends) yöntemi kullanılarak belirlenmiş olup, 13 tanesi için ise transkript tespiti yapılamadığı belirtilmiştir (Ince vd., 2013). Bu çalışma sayesinde virüsün bütün yapısal genlerinin transkriptomik sınıflandırma çalışması yapıldı ve geriye kalan 171 açık okuma zincirinin de 159 tanesi RT-PCR tekniği ile transkripsiyonel seviyede sınıflandırıldı. Bunlardan 114 tanesinin en erken, 23 tanesinin gecikmiş erken ve 22 tanesinin de geç gen olduğu belirlendi. 12 tane ORF'nin (069L, 121R, 146R, 148R, 201R, 212L, 236L, 238R, 315L, 414L, 426R ve 463L) transkriptine bu yöntemle, enfeksiyon süresinin azaltılıp artırılmasına (0-24 saat) rağmen rastlanılmadı. ORF'lerden beş tanesinin (216R, 235L, 253L, 411L, 413R) ilginç bir

şekilde protein sentez inhibitörü (CHX) varlığında transkriptlerine rastlanırken, DNA sentez inhibitörü (Ara-C) varlığında transkriptleri tespit edilemedi. Bu genler için muhtemelen enfeksiyon başlangıcında virüsün yapısında bulunan proteinler sayesinde ilk DNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla enfeksiyonun en erken aşamasında transkriptleniyor olabilecekleri sonucuna varıldı. Transkriptleri tespit edilmemiş olan 12 ORF'nin ise transkripsiyon seviyeleri çok düşük olduğu için veya enfeksiyon döngüsünde sadece belli bir süreliğine transkriptlendiklerinden tespit edilmelerinin mümkün olmadığı düşünülmektedir.

Daha önceden yapısal ve virionla ilişkili proteinlerin geç safhada ifade edildikleri düşünülüyordu, ancak sonradan her bir genin farklı bir safhada ifade edilebileceği anlaşıldı. UniProt veritabanına göre IIV6'nın genlerinden 91 tanesinin biyolojik süreçlerdeki fonksiyonları tahmin edilirken, 124 tanesinin fonksiyonları hakkında bilgi mevcut değildir.

IIV6 en erken (IE) gen sınıfı, peptidazlar (136R, 224L, 361L), nükleazlar (012L, 085L, 142R, 242L, 369L), membran proteinleri (010R, 049L, 118L, 213R, 300R), RNA polimeraz alt üniteleri (107L, 176R, 343L, 428L, 454R), helikazlar (022L, 030L, 161L, 172L, 184R), apoptozis inhibitörü (193R), fosfatazlar (123R, 197R, 355R, 438L), kinazlar (143R, 251L, 380R, 389L, 439L), ligazlar (205R), katalitik enzimler (232R, 235L, 241L, 244L, 347L, 376L) ve diğer DNA bağlanma ve manipülasyonlarında rol alan enzimler (006L, 045L, 075L, 077L, 095L, 100L, 132L, 157L, 175R, 200R, 211L, 282R, 289L, 295L, 302L, 313L, 332L, 349L, 388R, 393L, 413R, 420R) olmak üzere en çeşitli gen sınıfıdır. Bu genler tarafından ifade edilen proteinler enfeksiyonun en erken aşamasında üretilerek daha sonraki aşamalarda kullanılırlar.

Gecikmiş erken (DE) genler, viral DNA replikasyonundan önce transkriptlenir ve *de novo* protein sentezine ihtiyaç duyarlar. Bu genler tarafından kodlanan proteinler genellikle katalitik aktivitelerde görev alırlar. DNA-bağımlı DNA polimeraz (037L) bu gruba dahildir. Yine bu grupta bulunan 436R'nin proliferasyon hücre nükleer antijen domainine sahip olduğu görülmektedir. Bu domaine sahip proteinlerin DNA replikasyonunda DNA polimerazın anlamlı zincire bağlanmasında muhtemel kofaktör olarak rol oynadığı belirlenmiştir (Travali vd., 1989). 098R (serin/treonin protein kinaz), 165R (metalloendopeptidaz), 179R (protein kinaz), 225R (timidilat sentaz) ve 453L (tiyoredoksin benzeri protein) sahip oldukları domainler dolayısı ile hücresel süreçlerde protein değişiklikleri için potansiyel enzimatik aktivitelere sahip proteinler kodlamaktadırlar (Carreras ve Santi, 1995; Holmgren, 1989; Manning vd., 2002; Stout vd., 2004; Yesilyurt vd., 2019). 306R tarafından kodlanan protein, transkripsiyon aktivasyonunu kolaylaştıran proteinlerde korunmuş olarak bulunan SWIB

domainine sahiptir (Bennett-Lovsey vd., 2002). 340R ise transkripsiyon düzenleyici proteinlerde bulunan çift zincirli RNA bağlanma motifi içerir (Harford ve Morris, 1997). Transkripsiyon sınıfı daha önceki çalışmalar ile belirlenmiş olan 337L ise bir membran proteindir.

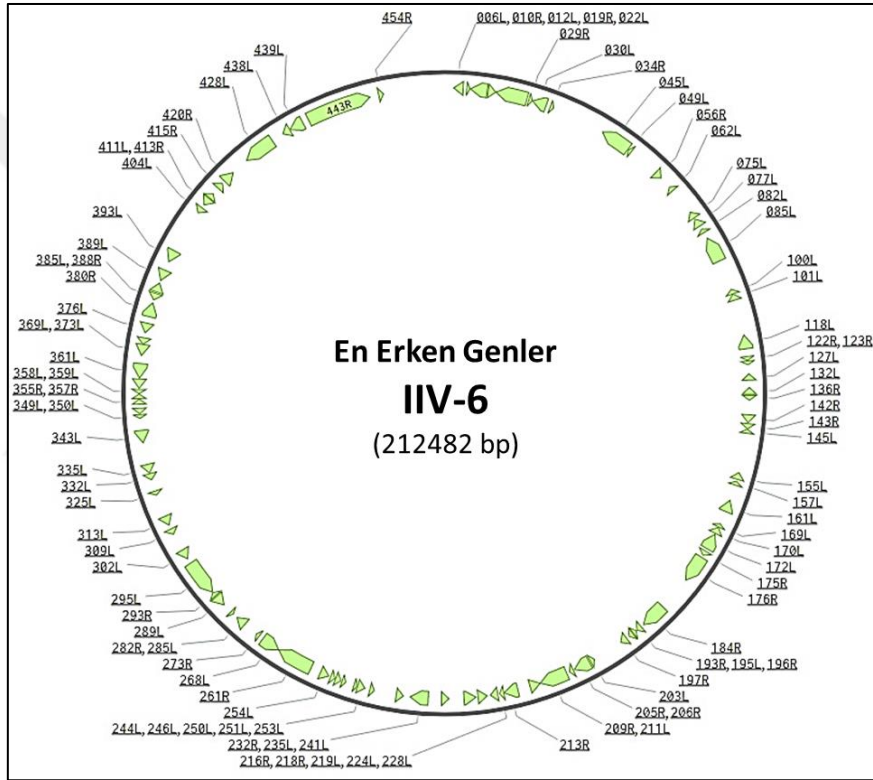
Geç (L) genler grubunda miristilli membran proteinleri (084L, 458R), FAS1 domain içeren bir protein (096L), majör kapsit proteini (274L), HMG-kutusu içeren DNA bağlanma proteini (401R), MSV199 domain içeren bir protein (468L) ve şaperon bağlanma proteini (391R) bulunmaktadır. Bunlardan 096L, 391R ve 468L dışında kalanların fonksiyonel olarak viral kapsit ve integral membran bileşenleri olabilecekleri düşünülmektedir. 096L'nin içerdiği fasiklin (FAS1) domaininden dolayı hücre tutunmasında, 391R'nin viral birleşme esnasında protein katlanmasında ve 468L'nin içerdiği MSV199 domaini sayesinde viral DNA'nın diğer viral proteinlerle etkileşimlerinde görev aldığı düşünülmektedir. Yine bu grupta olduğu belirlenen helikaz ailesi proteinler (067R ve 307L) ise kapsidin ana bileşeninde (274L) olduğu gibi bir sonraki enfeksiyonda kullanılmak üzere çokça üretilip virüsün yapısına katılabilirler.

Sınıflandırılması yapılamayan genler N terminal Bro-N domainine sahip olan 069L ve 201R, RING finger domainine sahip olan 121R, MSV199 domainine sahip olan 146R, 148R, 212L ve 238R ve KİA-N domainine sahip olan 315L'yi içermektedirler. Bu domainlere sahip proteinlerin genel özellikleri DNA bağlanma özelliğinde olmalarıdır. 414L ve 463L'nin ise hidrolaz aktivitesine sahip olabilecekleri düşünülmektedir (UniProt). 236L ve 426R'nin ise görevi bilinmemektedir. Bu genler, sahip oldukları bu domainlerin diğer fonksiyonel viral proteinlerde de bulunmasından dolayı tüm enfeksiyon boyunca transkriptlenmiyor veya düşük miktarda transkriptleniyor olabilirler.

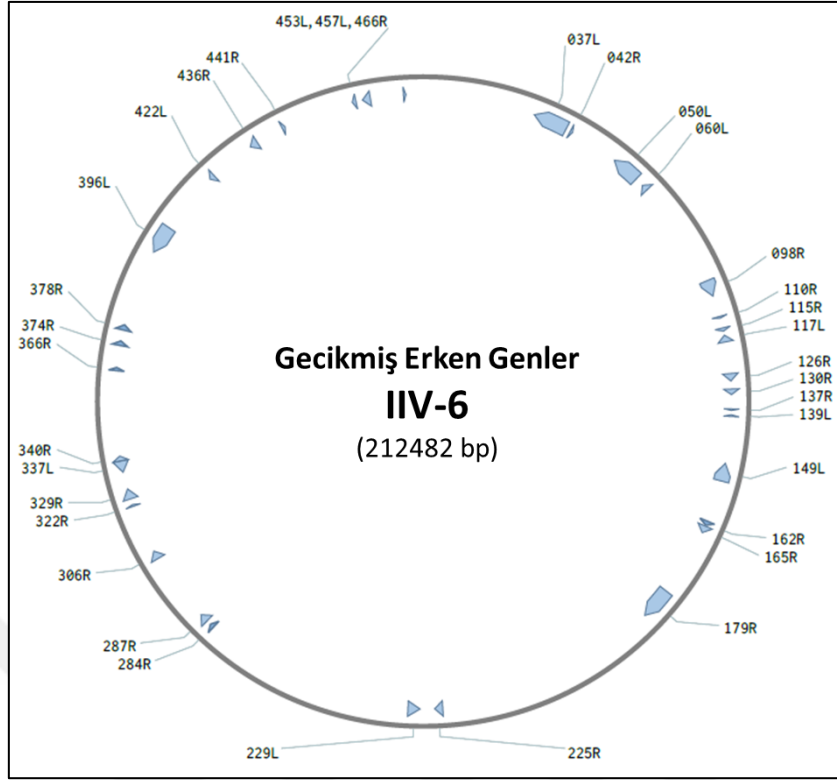
Iridoviridae familyasında bulunan virüsler arasında korunmuş genlerden DNA-bağımlı RNA polimeraz alt üniteleri (107L, 176R, 343L, 428L, 454R) diğer iridoviridlerle uyumlu bir şekilde transkriptlenmektedirler. Benzer şekilde, muhtemel bir transkripsiyon/replikasyon faktörü olan 282R, geç aşamada DNA bağlanma/paketlenmesinde görev aldığı düşünülen FV3-1R (Majji vd., 2009) ve SGIV-116R'nin (Teng vd., 2008) aksine RSIV-092R'de (Lua vd., 2005) olduğu gibi en erken aşamada transkriptlenir. Kinazlar ise her iridovirid için farklı sınıfta transkriptlenmektedirler. Bu durum farklı genlerin aynı fonksiyonel süreçlerde kullanılmasından dolayı olabilir. IIV6 genomunda bulunan bir helikaz/NTPaz (022L) en erken aşamada transkriptlenirken, diğer helikaz proteinlerinden 067R ve 307L geç sınıfa

aittir. DNA işlenmesinde rol aldığı düşünülen IIV6 genleri (075L, 184R, 037L, 349L, 436R, 143R, 393L, 369L) diğer iridoviridlerin transkriptom çalışmalarında olduğu gibi erken aşamada transkriptlenmektedirler (Chen vd., 2006; Lua vd., 2005; Teng vd., 2008).

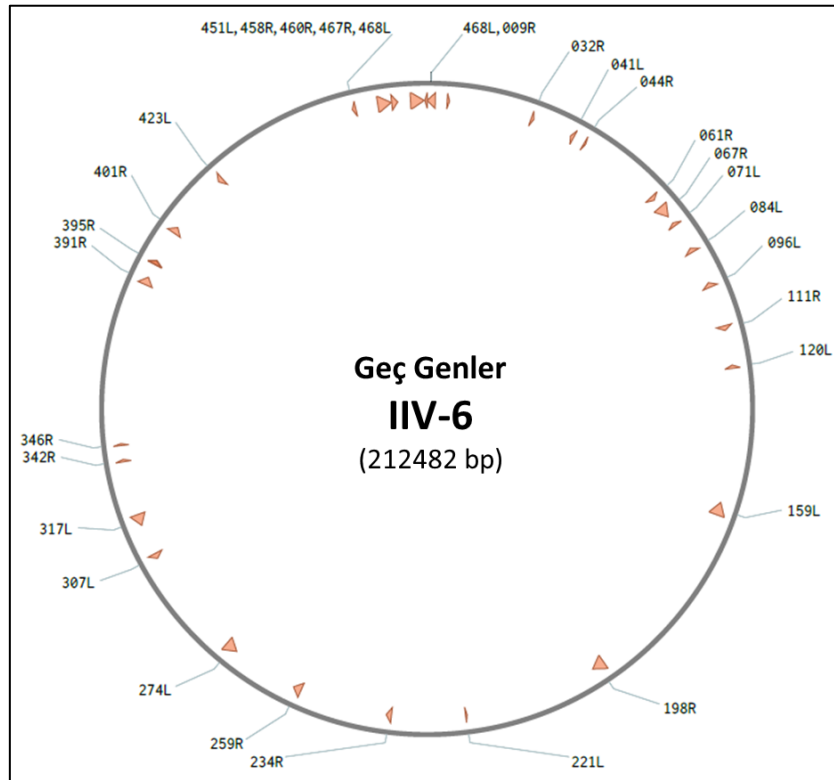
Transkripsiyon sonuçlarını genel olarak değerlendirdiğimizde en erken gruba ait genlerin IIV6 genomunun iç kısımlarında bulunduğunu (Şekil 31), geç genlerin ise daha çok uç kısımlarda yerleşmiş olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 32). Gecikmiş erken genler ise genomda rastgele dağılmış şekilde bulunmaktadırlar (Şekil 33).



Şekil 31. IIV6'ya ait en erken genlerin genom üzerindeki durumları



Şekil 32. IIV6'ya ait gecikmiş erken (DE) genlerin genom üzerindeki durumları



Şekil 33. IIV6'ya ait geç (L) genlerin genom üzerindeki durumları

Çalışmanın ikinci kısmında, en erken, gecikmiş erken ve geç (L, late) şeklinde gruplandırılan bütün IIV6 genlerinin 200 baz çifti yukarı bölgeleri kendi içinde toplanarak korunmuş motif taraması yapan MEME Suite veritabanında incelendi. Parametreler sadece ileri yönde olacak şekilde ve her dizi için en az bir motif tespit edecek şekilde ayarlandı. Promotor bölgeleri incelendiğinde en erken ve gecikmiş erken genler için muhtemel promotor bölgelerinde birer motif, geç genler için iki farklı motifin, ait oldukları gruba özel olarak korunmuş olduğu tespit edildi. Deneysel gen transkripsiyonu ve promotor analizleri iridoviridler için birkaç çalışmayla sınırlıdır. *Iridoviridae* familyası üyelerinde en erken genlerin viral proteinler tarafından transaktive edildiği (Willis ve Granoff, 1985) ve transkripsiyon başlangıç bölgesinden 100 baz çifti yukarı bölgelerinin gen regülasyonunda öneme sahip olduğu kanıtlanmıştır (Willis, 1987). *Bohle iridovirus (Ranavirus)* üzerinde yapılan bir diğer çalışmaya göre iki erken ve bir geç gen için transkripsiyon başlangıç bölgesinden 127-281 baz yukarı kısımlarında (ICP18 için 127 bp, ICP46 için 281 bp ve MCP için 169 bp) bulunan korunmuş dizilerin düzenleyici elementler olduğu kabul edilmiştir (Pallister vd., 2005). IIV6'nın gecikmiş erken genlerinden biri olan DNA polimerazın (037L) translasyon başlangıç (ATG) bölgesinden 50-54 baz çifti yukarısında önemli bir motife sahip olduğu belirlenmiştir (Nalcacioglu vd., 2003). Ancak promotor bölgesi daha da uzatıldığında aktivitenin arttığı görülmüş. Bu durum gecikmiş erken genlerin transkripsiyonunda gerekli başka dizilerin de olabileceğini göstermektedir. Yine aynı şekilde geç genler için ATG'den itibaren 43 baz kadar yukarı bölgenin promotor aktivitesi için yeterli olduğu ve bu bölgede özel bir motif içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca, en erken genlerden birinde (IIV6-012L) yapılan detaylı promotor analizinde kademeli şekilde silinerek elde edilen dizilerden 70 baz yukarı bölgenin %75'in üzerinde bir aktivite artışı sağladığı görülmüştür (Dizman vd., 2012). Tüm bu promotor ve motif çalışmaları, aynı sınıfa ait genlerin promotorlarında korunmuş bazı dizilerin bu genlerin düzenlenmesinde önemli olduğunu göstermektedir.

Buna benzer motif tespit çalışmaları Marsellevirüsler üzerinde de yapılmıştır (Oliveira vd., 2017) ve diğer büyük nükleositoloplazmik DNA virüsleriyle karşılaştırılmışlardır (Graziele Pereira Oliveira vd., 2017). Yine, 8 nükleotitlik korunmuş bir motifin (AAAATTGA) Mimivirüs genomunda erken (veya gecikmiş erken) gen promotorlarında yaklaşık %50 oranında bulunduğu belirtilmiş (Suhre vd., 2005). Bu motifin IIV6'ya ait en erken genlerin promotorlarında bulunan motifle (TAAAATTGAA) çok benzer olduğu dikkat çekmektedir.

IIV6 gen promotorlarında yapılan motif taramasından sonra elde edilen dizilerin promotor aktivitelerinde gerçekten önemli bölgeler olup olmadığı araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre en erken (193R) ve gecikmiş erken (126R) sınıfına ait genlerin sahip oldukları motiflerin silinmesi durumunda promotor aktivitelerinin ciddi oranda azaldığı görüldü. Enfeksiyon döngüsü başladığında ilk önce virüse ait en erken genlerin transkriptlendiği bilinmektedir. Çok sayıda genin farklı transkripsiyon faktörleri tarafından transkriptlenmesi virüs gibi basit yapıların tercih edeceği bir durum değildir. Bu yüzden ortak bir kompleksin tanıyabileceği benzer dizilerin promotor bölgelerinde tespit edilmesi bu hipotezi doğrulamaktadır. Böylece her bir gen için ayrı ayrı promotor analizi yapmak yerine belirlenen bu motifler sayesinde muhtemel promotor bölgeleri tespit edilmiştir. Virüs replikasyonunu engellemek amacıyla bu bölgeleri kapatacak şekilde tasarlanacak moleküller istenen aşamadaki genlerin inhibisyonunu sağlayacaktır. Oysa geç gen promotorlarında (259R, 084L, 061R) tespit edilen motiflerin silinmesi, beklenenin aksine daha fazla aktivite artışına sebep oldu. Bu durum, promotor bölgelerinde aktivite artışı sağlayan diziler olduğu gibi genlerin transkripsiyonunu baskılayan dizilerin de olabileceğini göstermektedir (Yang vd., 2008). Üç farklı gen promotorunda da aynı durum görülmüş olup, 061R promotorunda tespit edilen iki farklı motif üzerinde mutasyon çalışmalarıyla hangi bölgenin bu görev için daha efektif olduğu araştırıldı. A/T bakımından zengin olan birinci motifin mutasyonu aktivitenin geri kazanılmasında hiçbir etki göstermedi. Diğer yandan, geç gen promotorlarında tespit edilen ikinci korunmuş bölge olan NNTTGT motifinin mutasyonla farklı bir dizi haline dönüştürülmesi durumunda, promotor aktivitesinin bir miktar geri kazanıldığı gösterilmiştir. Ancak yine de tamamen silindiklerindeki aktivitenin yakalanamayışı, bu motifin dışında başka dizilerin de etkili olabileceğini veya bu motifin daha uzun bir sıra olabileceğini düşündürmektedir.

İridovirüslerin replikasyon mekanizmaları henüz yeterince aydınlatılmamıştır. Literatürde bulunan bilgiler *Frog virus 3* (FV3)'ün model organizma olarak kullanılmasıyla elde edilmiş kısıtlı çalışmalardır (Şekil 7). Zarflı ve zarfsız virionların her ikisi de enfeksiyon yapma yeteneğine sahiptir, ancak zarflı olanların konağa özgü etkinliği daha fazladır. Bu durum, bir veya daha fazla viral zarf proteininin virion girişinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Virionlar konak hücreye girdikten sonra viral kor DNA doğrudan nükleusa gider ve burada en erken ve gecikmiş erken genlerinin transkripsiyonunu konak hücrenin RNA polimerazını (RNA Pol II) kullanarak gerçekleştirir (Williams vd., 2005). Yapılan çalışmalar iridovirüslerin çıplak DNA'sının tek başına enfeksiyon başlatmak için yeterli

olmadığını, DNA'nın virion proteinleriyle birlikte hücreye verildiğinde viral enfeksiyonun başladığını göstermiştir (Willis vd., 1979).

Viral genler kademeli bir şekilde ifade edilir ve en erken aşamada üretilen proteinler gecikmiş erken genlerin, gecikmiş erken aşamada üretilen proteinler ise geç genlerin ifadesinde kullanılır (Williams vd., 2005). Virion yapısında bulunan bir veya daha fazla protein de virüse ait en erken genlerin transkripsiyonunu başlatmak için gereklidir (Willis ve Granoff, 1985). İridovirüslerde en erken genlerin transkripsiyonunu başlatan transaktivatör proteinlerle ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu tez kapsamında en erken genlerden biri olduğu bilinen IIV6-012L'nin promotor bölgesine bağlanan viral yapısal proteinler araştırıldı. Yapılan DNA afinite-kromatografi sonuçlarına göre yaklaşık 13,5 kDa büyüklüğünde bir proteinin promotora bağlandığı anlaşıldı. IIV6 yapısal proteinleri biyoinformatik olarak incelendiğinde bu büyüklüğe tekabül eden ve güçlü bir DNA bağlanma domainine sahip olan proteinin 366R açık okuma zinciri olduğu belirlendi. Bunun yanında virüsle enfekte edilen konak hücrenin nükleusundan izole edilen proteinlerle yapılan southwestern analizi sonuçları, IIV6 en erken gen promotorunun yaklaşık 130 ve 95 kDa ağırlığındaki proteinlerle etkileştiğini gösterdi. Ayrıca, viral protein ekstraktı ile yapılan southwestern analizi sonuçlarına göre en erken promotor sırasının yaklaşık olarak 70, 55, 40, 30, 25 kDa civarında ve bir tane de 17 kDa'dan küçük moleküler ağırlıklara sahip olmak üzere 6 farklı bölgede etkileşim gösterdiği tespit edildi (Şekil 21). Ancak bu protein bantlarının hepsi aynı anda tek membranda çıkmadı. Yaklaşık 70 kDa büyüklüğündeki bandın olmadığı durumda 25 ve 30 olmak üzere iki farklı bandın ortaya çıktığı görüldü. Bu durum 366R'nin 25 ve 30 kDa büyüklüğündeki proteinlerle etkileşim halindeyken 70 kDa civarında bir bant verdiğini göstermektedir. Ayrıca 25, 55 kDa civarında ve 17 kDa'dan daha küçük olan bantlar farklı iki membranda da ortaya çıktı. Bu sonuçlar 366R'nin muhtemelen bu büyüklüklerdeki proteinlerle etkileşim halinde olduğunu göstermektedir.

Virüse ait 36 tane yapısal proteinin üretilmesini sağlayan plazmitlerin ayrı ayrı ve gruplar halinde transfeksiyonu yapılmasına rağmen promotor aktivitesinde artış görülmemesi, transkripsiyon kompleksinde bulunan proteinlerin virion yapısında gösterdikleri doğal etkileşimle aynı şekilde olmadığını veya ihtiyaç duyulan proteinlerin bir araya gelmemiş olabileceğini göstermektedir. Xia ve arkadaşları (2019), SGIV'nin 4 tane yapısal proteininin (VP12, VP39, VP57 ve MCP) bu virüsün en erken genlerinden ICP46'nın promotoruna bağlandığını gösterdiler. Ancak bu proteinleri teker teker veya gruplar halinde en erken promotor ile birlikte hücreye aktarmalarına rağmen promotor aktivitesinde artış

olmadığını tespit ettiler. SGIV VP057 ve SGIV MCP proteinleri IIV6'da sırasıyla 295L ve 274L proteinleriyle homoloji göstermektedir. Fakat bu çalışmada IIV6'daki 295L proteini, en erken promotor ile bir etkileşim göstermemiştir. IIV6-274L proteini ise potansiyel olmadığı için çalışılmamıştır.

Sonuç olarak IIV6'daki transkripsiyonel düzenlenmenin, genlerin 5' yukarı bölgelerinde belirlenen korunmuş motiflere, viriona ait birden fazla proteinin bağlanması ile, aktivasyon veya baskılanma şeklinde gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Virüse ait genlerin ifade edildiği sınıfların belirlenmesi ve genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde etkili motiflerin aydınlatılması, virüsün moleküler mekanizmasının anlaşılması, biyolojik kontrol ajanı, gen terapi veya aşı geliştirme amacıyla kullanılması açısından önemlidir. IIV6 en çok çalışılan iridoviridlerden biridir ve elde edilen bu bulgular virüsün gen fonksiyonları ve moleküler mekanizmasının aydınlatılması açısından ileriye yönelik faydalı bilgiler sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sayesinde *Invertebrate iridescent virus 6*'ya ait genlerin transkripsiyonel sınıflandırması yapıldı, her bir sınıfa ait genlerin 5' yukarı bölgeleri korunmuş motif yönünden incelendi ve en erken genlerin transkripsiyonunu başlatan protein veya proteinler araştırıldı.

1) IIV6'ya ait 13 yapısal ve 158 yapısal olmayan olmak üzere toplam 171 adet ORF'nin transkripsiyonel sınıflandırılması çalışıldı. Bunlardan 114 tanesinin en erken (IE), 23 tanesinin gecikmiş erken (DE) ve 22 tanesinin ise geç (L) gen olduğu belirlendi. 12 adet ORF'nin ise transkripsiyonları belirlenemedi.

2) IIV6'ya ait tüm genlerin 5' yukarı bölgelerinde yapılan biyoinformatik analizler, en erken genlerde TAAAATTGAA, gecikmiş erken genlerde TTTTATGG, geç genlerde ise TCAATTTT ve NNTTGT motiflerinin korunmuş olduğunu gösterdi.

3) En erken ve gecikmiş erken genlerde belirlenen motiflerin lusiferaz sisteminde analizleri bu motiflerin promotor olarak görev yaptıklarını gösterdi.

4) Geç genlerde belirlenen motiflerin lusiferaz sisteminde analizleri ise NNTTGT motifinin bu genler için promotor olarak değil baskılayıcı sıra olarak görev yaptığını gösterdi.

5) Yönlendirilmiş mutagenesis çalışmaları geç genlerde promotor olarak görev yapan bir motifin değil muhtemelen belirli bir uzunlukta bölgenin olduğunu gösterdi.

6) IIV6 en erken promotor sırasının, DNA afinite kromatografisi yöntemi ile elde edilen sonuca göre potansiyel olarak 13.5 kDa büyüklüğünde bir proteinle etkileştiği belirlendi.

7) IIV6 en erken promotor sırasının, yapısı bozulmamış virionlarla ve virüsle enfekte edilmiş konak hücrenin nükleusundan izole edilen proteinlerle muamele edildiğinde yaklaşık 130 ve 95 kDa büyüklüğünde proteinlerle etkileştiği görüldü.

8) En erken promotor sırası ve virion protein ekstraktı ile yapılan southwestern analizleri en erken gen promotor DNA'sının yaklaşık olarak 70, 55, 40, 30, 25 kDa civarında ve bir tane de 17 kDa'dan küçük moleküler ağırlıklara sahip olmak üzere 6 farklı bölgede etkileşim gösterdiği tespit edildi.

9) En erken genlerin transaktivatör proteini olduğu düşünülen 36 farklı yapısal proteinin tek başına promotor aktivitesi için yeterli olmadığı, muhtemelen diğer viral proteinlere veya konağın transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyduğu sonucuna varıldı.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada IIV6 virüsüne ait genlerin transkripsiyonel sınıflandırması yapıp her bir gen sınıfının promotorlarında korunmuş motif taraması gerçekleştirilmiştir. Ardından motiflerin önemli olup-olmadığını belirlemek için promotor aktivite çalışmaları yapılmıştır. Son olarak, iridovirüsler için iyi bir çalışma modeli olan IIV6'nın en erken genlerinin transkripsiyonunu başlatan protein tespitine yönelik bazı sonuçlar elde edilmiştir. Bu doktora çalışmasından sonra yapılabilecek bazı çalışmaları şu şekilde önerebiliriz:

1) Sınıflandırması yapılan genlerden rastgele seçilerek tespit edilen motifleri içerecek şekilde promotor analizi gerçekleştirilebilir. Böylece her açık okuma zinciri için delesyonlarla çok sayıda plazmit oluşturmak yerine bu motiflerin olduğu bölgeye kadar olan kısımların ilgili gen için promotor bölgesi olduğu kanıtlanmış olur.

2) Tespit edilen motifleri inhibe edecek moleküller veya proteinlerle virüsün çoğalma mekanizmasının inhibisyonu üzerine çalışmalar yapılabilir.

3) Electromobility Shift Assay (EMSA) metodu kullanılarak transaktivatör protein olduğu düşünülen 366R'nin en erken gen promotorlarında tespit edilen korunmuş motifle olan ilişkisi araştırılabilir.

4) DNA afinite kromatografisinden elde edilen bantlar southwestern işlemine tabi tutulduktan sonra kütle spektrofotometrisiyle (MS) analiz edilememektedir. Dolayısıyla daha yoğun protein bantları elde edilerek analiz edilebilirler.

5) Konak hücreye transfeksiyon yapmak üzere en erken genlerin transkripsiyonunu başlatmak için oluşturulan plazmitlerle birlikte henüz araştırılmamış olan diğer yapısal proteinler kombinasyonlar halinde araştırılabilir.

6) En erken gen olduğu bilinen 012L promotorunda korunmuş motif olarak tespit edilen bölgenin diğer en erken gen promotorlarında da bulunmasından dolayı transaktivatör protein(ler) viral döngüyü başka ORF'lerin promotorlarından başlatıyor olabilir. Bu yüzden yapısal proteinleri içeren plazmitler kullanılarak virüs DNA'sının tamamıyla birlikte transfeksiyon çalışmaları yapılabilir.

7) Muhtemel proteinlerle DNA dizileri arasındaki ilişki, kromatin immünopresipitasyon (ChIP) veya benzeri tekniklerle araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Ahlers, L. R., Bastos, R. G., Hiroyasu, A. ve Goodman, A. G., 2016. Invertebrate Iridescent Virus 6, a DNA Virus, Stimulates a Mammalian Innate Immune Response through RIG-I-Like Receptors, PLoS One, 11,11, e0166088.
- Alberts, B. ve Herrick, G., 1971. Methods in Enzymology, [11] DNA-cellulose chromatography, 21, Academic Press, 198-217.
- Andersson, R. ve Sandelin, A., 2019. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements, Nature Reviews Genetics.
- Ariel, E., Steckler, N. K., Subramaniam, K., Olesen, N. J. ve Waltzek, T. B., 2016. Genomic Sequencing of Ranaviruses Isolated from Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Atlantic Cod (*Gadus morhua*), Genome Announc, 4,6.
- Ariel, E., Subramaniam, K., Imnoi, K., Sriwanayos, P., Ahasan, M. S., Olesen, N. J., Amedeo, M., Toffan, A. ve Waltzek, T. B., 2017. Genomic Sequencing of Ranaviruses Isolated from Edible Frogs (*Pelophylax esculentus*), Genome Announc, 5,38.
- Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M., Bahr, W., Frischauf, A. M. ve Marquardt, M., 1975. Covalent attachment of DNA to agarose. Improved synthesis and use in affinity chromatography, Eur J Biochem, 54,2, 411-418.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W. ve Noble, W. S., 2009. MEME Suite: tools for motif discovery and searching, Nucleic Acids Research, 37, 2, 202-208.
- Balange-Orange, N. ve Devauchelle, G., 1982. Lipid composition of an iridescent virus type 6 (CIV), Arch Virol, 73,3-4, 363-367.
- Barray, S. ve Devauchelle, G., 1985. Protein synthesis in cells infected by chilo iridescent virus (iridovirus, type 6), Arch Virol, 86,3-4, 315-326.
- Bennett-Lovsey, R., Hart, S. E., Shirai, H. ve Mizuguchi, K., 2002. The SWIB and the MDM2 domains are homologous and share a common fold, Bioinformatics, 18,4, 626-630.
- Bernard, H.-U., 2013. Regulatory elements in the viral genome, Virology, 445,1, 197-204.
- Bilimoria, S., 2009. Use Of Iridoptin To Induce Toxicity In Insects.
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M. G., Suzan-Monti, M., La Scola, B., Koonin, E. V. ve Raoult, D., 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms, Proc Natl Acad Sci U S A, 106,51, 21848-21853.
- Braunwald, J., Tripiier, F. ve Kirn, A., 1979. Comparison of the Properties of Enveloped and Naked Frog Virus 3 (FV 3) Particles, 45.

- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W., Vodovar, N., Ince, I. A., Blanc, H., Vlak, J. M., Saleh, M. C. ve van Rij, R. P., 2012. The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery, Proc Natl Acad Sci U S A, 109,51, 3604-3613.
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Venselaar, H. ve van Rij, R. P., 2014. A dsRNA-binding protein of a complex invertebrate DNA virus suppresses the *Drosophila* RNAi response, Nucleic Acids Research, 42,19, 12237-12248.
- Broyles, S. S. ve Knutson, B. A., 2010. Poxvirus transcription, Future Virology, 5,5, 639-650.
- Buchatsky, L. P., 1977. An iridovirus from larvae of *Culiseta annulata* and *Culex territans*, Acta Virol, 21,1, 85-86.
- Carreras, C. W. ve Santi, D. V., 1995. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase, Annu Rev Biochem, 64, 721-762.
- Carthew, R. W., Chodosh, L. A. ve Sharp, P. A., 1985. An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter, Cell, 43, 2, 1, 439-448.
- Cerutti, M., Cerutti, P. ve Devauchelle, G., 1989. Infectivity of vesicles prepared from chilo iridescent virus inner membrane: evidence for recombination between associated DNA fragments, Virus Res, 12,4, 299-313.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1980. Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an invertebrate virus (iridovirus type 6 or CIV), Arch Virol, 63,3-4, 297-303.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1985. Characterization and localization of CIV polypeptides, Virology, 145,1, 123-131.
- Cerutti, M. ve Devauchelle, G., 1990. Molecular Biology of Iridoviruses, Protein Composition of Chilo Iridescent Virus, G. Darai editor, Springer US, Boston, MA, 81-111.
- Chen, L. M., Wang, F., Song, W. ve Hew, C. L., 2006. Temporal and differential gene expression of Singapore grouper iridovirus, J Gen Virol, 87, 10, 2907-2915.
- Chen, X. Y., Wen, C. M., Wu, J. L., Su, Y. C. ve Hong, J. R., 2016. Giant seaperch iridovirus (GSIV) induces mitochondria-mediated cell death that is suppressed by bongkreikic acid and cycloheximide in a fish cell line, Virus Res, 213, 37-45.
- Chen, Z., Gui, J., Gao, X., Pei, C., Hong, Y. ve Zhang, Q., 2013. Genome architecture changes and major gene variations of *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV), Vet Res, 44, 101.
- Chinchar, V. G., Hick, P., Ince, I. A., Jancovich, J. K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q. Y. ve Ictv Report, C., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae, J Gen Virol, 98,5, 890-891.
- Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T. ve Williams, T., 2009. Family Iridoviridae: poor viral relations no longer, Curr Top Microbiol Immunol, 328, 123-170.

- Chitnis, N. S., Paul, E. R., Lawrence, P. K., Henderson, C. W., Ganapathy, S., Taylor, P. V., Viridi, K. S., D'Costa, S. M., May, A. R. ve Bilimoria, S. L., 2011. A virion-associated protein kinase induces apoptosis, J Virol, 85,24, 13144-13152.
- Chodosh, L. A., Carthew, R. W. ve Sharp, P. A., 1986. A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor, Mol Cell Biol, 6,12, 4723-4733.
- Claytor, S. C., Subramaniam, K., Landrau-Giovannetti, N., Chinchar, V. G., Gray, M. J., Miller, D. L., Mavian, C., Salemi, M., Wisely, S. ve Waltzek, T. B., 2017. Ranavirus phylogenomics: Signatures of recombination and inversions among bullfrog ranaculture isolates, Virology, 511, 330-343.
- Colson, P., De Lamballerie, X., Yutin, N., Asgari, S., Bigot, Y., Bideshi, D. K., Cheng, X. W., Federici, B. A., Van Etten, J. L., Koonin, E. V., La Scola, B. ve Raoult, D., 2013. "Megavirales", a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses, Arch Virol, 158,12, 2517-2521.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C. F. ve Williams, T., 2001. A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6, J Virol Methods, 98,2, 109-118.
- D'Costa, S. M., Vigerust, D. J., Perales-Hull, M. R., Lodhi, S. A., Viravathana, P. ve Bilimoria, S. L., 2012. First complete and productive cell culture model for members of the genus Iridovirus, Arch Virol, 157,11, 2171-2178.
- D'Costa, S. M., Yao, H. ve Bilimoria, S. L., 2001. Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells, Arch Virol, 146,11, 2165-2178.
- D'Costa, S. M., Yao, H. J. ve Bilimoria, S. L., 2004. Transcriptional mapping in Chilo iridescent virus infections, Arch Virol, 149,4, 723-742.
- Dame, R. T., 2005. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin, Mol Microbiol, 56,4, 858-870.
- Darcy-Tripier, F., Nermut, M. V., Braunwald, J. ve Williams, L. D., 1984. The organization of frog virus 3 as revealed by freeze-etching, Virology, 138,2, 287-299.
- de Groof, A., Guelen, L., Deijs, M., van der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., van Grinsven, L., Simmelink, B., Biermann, Y., Grisez, L., van Lent, J., de Ronde, A., Chang, S. F., Schrier, C. ve van der Hoek, L., 2015. A Novel Virus Causes Scale Drop Disease in Lates calcarifer, PLoS Pathog, 11,8, e1005074.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Becnel, J. J., Moser, B. A., Kutish, G. F. ve Rock, D. L., 2006. Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus), J Virol, 80,17, 8439-8449.
- Demirbağ Z., Nalçacıoğlu R., Katı H., Demir İ., Sezen K. ve Ertürk O., 2008. "Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele", Ed. Zihni Demirbağ, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Dizman, Y. A., Demirbag, Z., Ince, I. A. ve Nalcacioglu, R., 2012. Transcriptomic analysis of Chilo iridescent virus immediate early promoter, Virus Res, 167,2, 353-357.

- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., Han, M. S., Cha, S. J., Park, M. S., Park, M. A., Kim, Y. C., Kim, J. W. ve Park, J. W., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus, Virology, 325,2, 351-363.
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C. ve Brunetti, C. R., 2007. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes, Virol J, 4, 11.
- Eaton, H. E., Ring, B. A. ve Brunetti, C. R., 2010. The Genomic Diversity and Phylogenetic Relationship in the Family Iridoviridae, Viruses, 2,7, 1458-1475.
- Elliott, R. M. ve Kelly, D. C., 1980. Frog virus 3 replication: induction and intracellular distribution of polypeptides in infected cells, J Virol, 33,1, 28-51.
- Epstein, B. ve Storfer, A., 2015. Comparative Genomics of an Emerging Amphibian Virus, G3 (Bethesda), 6,1, 15-27.
- Fried, M. ve Crothers, D. M., 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis, Nucleic Acids Res, 9,23, 6505-6525.
- Fried, M. G. ve Crothers, D. M., 1984. Kinetics and mechanism in the reaction of gene regulatory proteins with DNA, J Mol Biol, 172,3, 263-282.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A Chilo Iridescent Virus (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera : Pyralidae), Applied Entomology and Zoology, 1,2, 69-72.
- Garner, M. M. ve Revzin, A., 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system, Nucleic Acids Res, 9,13, 3047-3060.
- Geertz, M. ve Maerkl, S. J., 2010. Experimental strategies for studying transcription factor-DNA binding specificities, Brief Funct Genomics, 9,5-6, 362-373.
- Gendrault, J. L., Steffan, A. M., Bingen, A. ve Kirn, A., 1981. Penetration and uncoating of frog virus 3 (FV3) in cultured rat Kupffer cells, Virology, 112,2, 375-384.
- Goorha, R. ve Dixit, P., 1984. A temperature-sensitive (TS) mutant of frog virus 3 (FV3) is defective in second-stage DNA replication, Virology, 136,1, 186-195.
- Grayfer, L., Edholm, E.-S., De Jesús Andino, F., Chinchar, V. G. ve Robert, J., 2015. *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates, Ranavirus Host Immunity and Immune Evasion*, M. J. Gray ve V. G. Chinchar editors, Springer International Publishing, Cham, 141-170.
- Harford, J. B. ve Morris, D. R., 1997. *mRNA metabolism & post-transcriptional gene regulation*, John Wiley & Sons.
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. ve Chan, S. M., 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus, Virology, 291,1, 126-139.

- He, J. G., Lu, L., Deng, M., He, H. H., Weng, S. P., Wang, X. H., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. ve Chan, S. M., 2002. Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog, Virology, 292,2, 185-197.
- Henderson, C. W., Johnson, C. L., Lodhi, S. A. ve Bilimoria, S. L., 2001. Replication of Chilo iridescent virus in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay, Arch Virol, 146,4, 767-775.
- Hendrickson, W. ve Schleif, R. F., 1984. Regulation of the Escherichia coli L-arabinose operon studied by gel electrophoresis DNA binding assay, J Mol Biol, 178,3, 611-628.
- Hick, P. M., Subramaniam, K., Thompson, P., Whittington, R. J. ve Waltzek, T. B., 2016. Complete Genome Sequence of a Bohle iridovirus Isolate from Ornate Burrowing Frogs (*Limnodynastes ornatus*) in Australia, Genome Announc, 4,4.
- Hillel, Z. ve Wu, C. W., 1978. Photochemical cross-linking studies on the interaction of Escherichia coli RNA polymerase with T7 DNA, Biochemistry, 17,15, 2954-2961.
- Holmgren, A., 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems, J Biol Chem, 264,24, 13963-13966.
- Holopainen, R., Subramaniam, K., Steckler, N. K., Claytor, S. C., Ariel, E. ve Waltzek, T. B., 2016. Genome Sequence of a Ranavirus Isolated from Pike-Perch Sander *lucioperca*, Genome Announc, 4,6.
- Huang, Y., Huang, X., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z., Cui, H., Cao, J., Zhao, Y., Wang, X., Jiang, Y. ve Qin, Q., 2009. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae, BMC Genomics, 10, 224.
- Huang, Y., Li, S., Zhao, Q., Pei, G., An, X., Guo, X., Zhou, H., Zhang, Z., Zhang, J. ve Tong, Y., 2015. Isolation and characterization of a novel invertebrate iridovirus from adult *Anopheles minimus* (AMIV) in China, J Invertebr Pathol, 127, 1-5.
- Iftode, C., Daniely, Y. ve Borowiec, J. A., 1999. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB, Crit Rev Biochem Mol Biol, 34,3, 141-180.
- Ince, I. A., Boeren, S., van Oers, M. M. ve Vlak, J. M., 2015. Temporal proteomic analysis and label-free quantification of viral proteins of an invertebrate iridovirus, J Gen Virol, 96, 1, 196-205.
- Ince, I. A., Boeren, S. A., van Oers, M. M., Vervoort, J. J. ve Vlak, J. M., 2010. Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405,1, 253-258.
- Ince, I. A., Ozcan, K., Vlak, J. M. ve van Oers, M. M., 2013. Temporal classification and mapping of non-polyadenylated transcripts of an invertebrate iridovirus, J Gen Virol, 94, 1, 187-192.
- Ince, I. A., Ozcan, O., Ilter-Akulke, A. Z., Scully, E. D. ve Ozgen, A., 2018. Invertebrate Iridoviruses: A Glance over the Last Decade, Viruses, 10,4.
- Ince, I. A., Westenberg, M., Vlak, J. M., Demirbag, Z., Nalcacioglu, R. ve van Oers, M. M., 2008. Open reading frame 193R of Chilo iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP), Virology, 376,1, 124-131.

- Jakob, N. J., Muller, K., Bahr, U. ve Darai, G., 2001. Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus, Virology, 286,1, 182-196.
- Jancovich, J. K., Bremont, M., Touchman, J. W. ve Jacobs, B. L., 2010. Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family Iridoviridae), J Virol, 84,6, 2636-2647.
- Jancovich, J. K., Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. ve Zhang, Q. Y., 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Family *Iridoviridae*, A. Press editor, E. L. Andrew M.Q. King, Michael J. Adams and Eric B. Carstens editor, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 193-210.
- Jancovich, J. K., Davidson, E. W., Parameswaran, N., Mao, J., Chinchar, V. G., Collins, J. P., Jacobs, B. L. ve Storfer, A., 2005. Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread, Mol Ecol, 14,1, 213-224.
- Jancovich, J. K., Mao, J., Chinchar, V. G., Wyatt, C., Case, S. T., Kumar, S., Valente, G., Subramanian, S., Davidson, E. W., Collins, J. P. ve Jacobs, B. L., 2003. Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America, Virology, 316,1, 90-103.
- Jancovich, J. K., Qin, Q., Zhang, Q.-Y. ve Chinchar, V. G., 2015. Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates, Ranavirus Replication: Molecular, Cellular, and Immunological Events, M. J. Gray ve V. G. Chinchar editors, Springer International Publishing, Cham, 105-139.
- Karin, M., 1990. Too many transcription factors: positive and negative interactions, New Biol, 2,2, 126-131.
- Kasher, M. S., Pintel, D. ve Ward, D. C., 1986. Rapid enrichment of HeLa transcription factors IIIB and IIIC by using affinity chromatography based on avidin-biotin interactions, Mol Cell Biol, 6,9, 3117-3127.
- Kolovos, P., Knoch, T. A., Grosveld, F. G., Cook, P. R. ve Papantonis, A., 2012. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function, Epigenetics & chromatin, 5,1, 1-1.
- Kurita, J. ve Nakajima, K., 2012. Megalocytiviruses, Viruses, 4,4, 521-538.
- Kurjogi, M. M., Sanakal, R. D. ve Kaliwal, B. B., 2012. Identification and analysis of putative promoter motifs in bovine herpes virus, Bioinformatics, 8,23, 1167-1170.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227,5259, 680-685.
- Latchman, D. S., 1993. Transcription factors: an overview, Int J Exp Pathol, 74,5, 417-422.
- Leblond-Francillard, M., Dreyfus, M. ve Rougeon, F., 1987. Isolation of DNA-protein complexes based on streptavidin and biotin interaction, Eur J Biochem, 166,2, 351-355.
- Lei, X. Y., Ou, T., Zhu, R. L. ve Zhang, Q. Y., 2012. Sequencing and analysis of the complete genome of Rana grylio virus (RGV), Arch Virol, 157,8, 1559-1564.

- Li, J. J. ve Herskowitz, I., 1993. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system, Science, 262,5141, 1870-1874.
- Liu, Y., Tran, B. N., Wang, F., Ounjai, P., Wu, J. ve Hew, C. L., 2016. Visualization of Assembly Intermediates and Budding Vacuoles of Singapore Grouper Iridovirus in Grouper Embryonic Cells, Sci Rep, 6, 18696.
- Lopez-Bueno, A., Mavian, C., Labella, A. M., Castro, D., Borrego, J. J., Alcami, A. ve Alejo, A., 2016. Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream, J Virol, 90,19, 8768-8779.
- Low, M. G., 1989. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins, Faseb j, 3,5, 1600-1608.
- Lua, D. T., Yasuike, M., Hirono, I. ve Aoki, T., 2005. Transcription program of red sea bream iridovirus as revealed by DNA microarrays, Journal of virology, 79,24, 15151-15164.
- Lu, L., Zhou, S. Y., Chen, C., Weng, S. P., Chan, S. M. ve He, J. G., 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, Virology, 339,1, 81-100.
- Majji, S., Thodima, V., Sample, R., Whitley, D., Deng, Y., Mao, J. ve Chinchar, V. G., 2009. Transcriptome analysis of Frog virus 3, the type species of the genus Ranavirus, family Iridoviridae, Virology, 391,2, 293-303.
- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T. ve Sudarsanam, S., 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man, Trends Biochem Sci, 27,10, 514-520.
- Marina, F. C., Arredondo-Jiménez, I. J., Castillo, A. ve Williams, T., 1999. Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito, Oecologia, 119,3, 383-388.
- Markovitz, A., 1972. Ultraviolet light-induced stable complexes of DNA and DNA polymerase, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis, 281,4, 522-534.
- Marks, H., Ren, X. Y., Sandbrink, H., van Hulst, M. C. ve Vlak, J. M., 2006. In silico identification of putative promoter motifs of White Spot Syndrome Virus, BMC Bioinformatics, 7, 309.
- Mavian, C., Lopez-Bueno, A., Balseiro, A., Casais, R., Alcami, A. ve Alejo, A., 2012. The genome sequence of the emerging common midwife toad virus identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses, J Virol, 86,7, 3617-3625.
- Mavian, C., Lopez-Bueno, A., Fernandez Somalo, M. P., Alcami, A. ve Alejo, A., 2012. Complete genome sequence of the European sheatfish virus, J Virol, 86,11, 6365-6366.
- Morrison, E. A., Garner, S., Echaubard, P., Lesbarreres, D., Kyle, C. J. ve Brunetti, C. R., 2014. Complete genome analysis of a frog virus 3 (FV3) isolate and sequence comparison with isolates of differing levels of virulence, Virol J, 11, 46.
- Myers, L. C. ve Kornberg, R. D., 2000. Mediator of transcriptional regulation, Annu Rev Biochem, 69, 729-749.

- Nakajima, K. ve Kunita, J., 2005. [Red sea bream iridoviral disease], Uirusu, 55,1, 115-125.
- Nalcacioglu, R., Ince, I. A., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2007. The Chilo iridescent virus DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif, J Gen Virol, 88,Pt 9, 2488-2494.
- Nalcacioglu, R., Marks, H., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2003. Promoter analysis of the Chilo iridescent virus DNA polymerase and major capsid protein genes, Virology, 317,2, 321-329.
- Nalcacioglu, R., Muratoglu, H., Yesilyurt, A., van Oers, M. M., Vlak, J. M. ve Demirbag, Z., 2016. Enhanced insecticidal activity of Chilo iridescent virus expressing an insect specific neurotoxin, J Invertebr Pathol, 138, 104-111.
- Odom, D. T., 2011. Identification of Transcription Factor-DNA Interactions In Vivo, Subcell Biochem, 52, 175-191.
- Oliveira, G. P., Andrade, A. C. D. S. P., Rodrigues, R. A. L., Arantes, T. S., Boratto, P. V. M., Silva, L. K. D. S., Dornas, F. P., Trindade, G. d. S., Drumond, B. P., La Scola, B., Kroon, E. G. ve Abrahão, J. S., 2017. Promoter Motifs in NCLDVs: An Evolutionary Perspective, Viruses, 9,1, 16.
- Oliveira, G. P., Lima, M. T., Arantes, T. S., Assis, F. L., Rodrigues, R. A. L., da Fonseca, F. G., Bonjardim, C. A., Kroon, E. G., Colson, P., La Scola, B. ve Abrahao, J. S., 2017. The Investigation of Promoter Sequences of Marseilleviruses Highlights a Remarkable Abundance of the AAATATTT Motif in Intergenic Regions, J Virol, 91,21.
- Ozgen, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z., Vlak, J. M., van Oers, M. M. ve Nalcacioglu, R., 2014. Construction and characterization of a recombinant invertebrate iridovirus, Virus Res, 189, 286-292.
- Ozsahin, E., van Oers, M. M., Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z., 2018. Protein-protein interactions among the structural proteins of Chilo iridescent virus, J Gen Virol, 99,6, 851-859.
- Pallister, J., Goldie, S., Coupar, B. ve Hyatt, A., 2005. Promoter activity in the 5' flanking regions of the Bohle iridovirus ICP 18, ICP 46 and major capsid protein genes, Arch Virol, 150,9, 1911-1919.
- Paul, E. R., Chitnis, N. S., Henderson, C. W., Kaul, R. J., D'Costa, S. M. ve Bilimoria, S. L., 2007. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract, Arch Virol, 152,7, 1353-1364.
- Piegu, B., Asgari, S., Bideshi, D., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2015. Evolutionary relationships of iridoviruses and divergence of ascoviruses from invertebrate iridoviruses in the superfamily Megavirales, Mol Phylogenet Evol, 84, 44-52.
- Piegu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2013. Complete genome sequence of invertebrate iridescent virus 22 isolated from a blackfly larva, J Gen Virol, 94, 9, 2112-2116.
- Piegu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014a. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV30 isolated from the corn earworm, Helicoverpa zea, J Invertebr Pathol, 116, 43-47.

- Piegu, B., Guizard, S., Spears, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014b. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV-25 isolated from a blackfly larva, Arch Virol, 159,5, 1181-1185.
- Piegu, B., Guizard, S., Yeping, T., Cruaud, C., Asgari, S., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014. Genome sequence of a crustacean iridovirus, IIV31, isolated from the pill bug, *Armadillidium vulgare*, J Gen Virol, 95, 7, 1585-1590.
- Piegu, B., Guizard, S., Yeping, T., Cruaud, C., Couloux, A., Bideshi, D. K., Federici, B. A. ve Bigot, Y., 2014. Complete genome sequence of invertebrate iridovirus IIV22A, a variant of IIV22, isolated originally from a blackfly larva, Stand Genomic Sci, 9,3, 940-947.
- Ohlemeyer, S., Holopainen, R., Tapiovaara, H., Bergmann, S. M. ve Schutze, H., 2011. Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV, Dis Aquat Organ, 96,3, 195-207.
- Qiu, L., Chen, M. M., Wang, R. Y., Wan, X. Y., Li, C., Zhang, Q. L., Dong, X., Yang, B., Xiang, J. H. ve Huang, J., 2018. Complete genome sequence of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) isolated from white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Arch Virol, 163,3, 781-785.
- Reed, L. J. ve Muench, H., 1938. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints¹², American Journal of Epidemiology, 27, 3, 493-497.
- Rothenburg, S., Chinchar, V. G. ve Dever, T. E., 2011. Characterization of a ranavirus inhibitor of the antiviral protein kinase PKR, BMC Microbiol, 11, 56.
- Sample, R., Bryan, L., Long, S., Majji, S., Hoskins, G., Sinning, A., Olivier, J. ve Chinchar, V. G., 2007. Inhibition of iridovirus protein synthesis and virus replication by antisense morpholino oligonucleotides targeted to the major capsid protein, the 18 kDa immediate-early protein, and a viral homolog of RNA polymerase II, Virology, 358,2, 311-320.
- Schnitzler, P., Soltau, J. B., Fischer, M., Reisner, H., Scholz, J., Delius, H. ve Darai, G., 1987. Molecular cloning and physical mapping of the genome of insect iridescent virus type 6: further evidence for circular permutation of the viral genome, Virology, 160,1, 66-74.
- Shi, C. Y., Jia, K. T., Yang, B. ve Huang, J., 2010. Complete genome sequence of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China, Virol J, 7, 159.
- Singh, H., LeBowitz, J. H., Baldwin, A. S., Jr. ve Sharp, P. A., 1988. Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA, Cell, 52,3, 415-423.
- Somvanshi, P., Singh, V. ve Seth, P. K., 2008. Identification and analysis of putative promoter motifs in Flavivirus genome, Bioinformatics, 3,4, 162-167.
- Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F. ve Hew, C. L., 2004. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis, J Virol, 78,22, 12576-12590.

- Sonntag, K. C., Schnitzler, P., Janssen, W. ve Darai, G., 1994. Identification of the primary structure and the coding capacity of the genome of insect iridescent virus type 6 between the genome coordinates 0.310 and 0.347 (7990 bp), Intervirology, 37,5, 287-297.
- Spiegelman, B. M. ve Heinrich, R., 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators, Cell, 119,2, 157-167.
- Staudt, L. M., Clerc, R. G., Singh, H., LeBowitz, J. H., Sharp, P. A. ve Baltimore, D., 1988. Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif, Science, 241,4865, 577-580.
- Stohr, A. C., Lopez-Bueno, A., Blahak, S., Caeiro, M. F., Rosa, G. M., Alves de Matos, A. P., Martel, A., Alejo, A. ve Marschang, R. E., 2015. Phylogeny and differentiation of reptilian and amphibian ranaviruses detected in Europe, PLoS One, 10,2, e0118633.
- Stout, T. J., Foster, P. G. ve Matthews, D. J., 2004. High-throughput structural biology in drug discovery: protein kinases, Curr Pharm Des, 10,10, 1069-1082.
- Subramaniam, K., Toffan, A., Cappellozza, E., Steckler, N. K., Olesen, N. J., Ariel, E. ve Waltzek, T. B., 2016. Genomic Sequence of a Ranavirus Isolated from Short-Finned Eel (*Anguilla australis*), Genome Announc, 4,4.
- Suhre, K., Audic, S. ve Claverie, J. M., 2005. Mimivirus gene promoters exhibit an unprecedented conservation among all eukaryotes, Proc Natl Acad Sci U S A, 102,41, 14689-14693.
- Szilagyi, A. ve Skolnick, J., 2006. Efficient prediction of nucleic acid binding function from low-resolution protein structures, J Mol Biol, 358,3, 922-933.
- Tajbakhsh, S., Lee, P. E., Watson, D. C. ve Seligy, V. L., 1990. Molecular cloning, characterization, and expression of the *Tipula* iridescent virus capsid gene, Journal of virology, 64,1, 125-136.
- Tan, W. G., Barkman, T. J., Gregory Chinchar, V. ve Essani, K., 2004. Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus Ranavirus (family Iridoviridae), Virology, 323,1, 70-84.
- Teng, Y., Hou, Z., Gong, J., Liu, H., Xie, X., Zhang, L., Chen, X. ve Qin, Q. W., 2008. Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, Virology, 377,1, 39-48.
- Tidona, C. A. ve Darai, G., 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus, Virology, 230,2, 207-216.
- Tidona, C. A., Schnitzler, P., Kehm, R. ve Darai, G., 1998. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution?, Virus Genes, 16,1, 59-66.
- Travali, S., Ku, D. H., Rizzo, M. G., Ottavio, L., Baserga, R. ve Calabretta, B., 1989. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen, J Biol Chem, 264,13, 7466-7472.

- Tsai, C. T., Ting, J. W., Wu, M. H., Wu, M. F., Guo, I. C. ve Chang, C. Y., 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses, J Virol, 79,4, 2010-2023.
- van Beurden, S. J., Hughes, J., Saucedo, B., Rijks, J., Kik, M., Haenen, O. L., Engelsma, M. Y., Grone, A., Verheije, M. H. ve Wilkie, G., 2014. Complete genome sequence of a common midwife toad virus-like ranavirus associated with mass mortalities in wild amphibians in the Netherlands, Genome Announc, 2,6.
- ViralZone. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Available online: www.expasy.org/viralzone, 19 Kasım 2018.
- Wagner, G. W., Webb, S. R., Paschke, J. D. ve Campbell, W. R., 1975. Production and characterization of the cores of the "R" strain of mosquito iridescent virus, Virology, 64,2, 430-437.
- Wang, M. M. ve Reed, R. R., 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast, Nature, 364,6433, 121-126.
- Wang, S., Huang, X., Huang, Y., Hao, X., Xu, H., Cai, M., Wang, H. ve Qin, Q., 2014. Entry of a novel marine DNA virus, Singapore grouper iridovirus, into host cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis in a pH-dependent manner, J Virol, 88,22, 13047-13063.
- Watson, J. D., Watson, J. D., Myers, R. M., Caudy, A. A., D, W. J., Witkowski, J. A., Richard M. Myers, J. W. J. D. W. A. A. C. ve Myers, U. R. M., 2007. Recombinant DNA: Genes and Genomes: A Short Course, W. H. Freeman.
- Whelan, S., 2013. Viral replication strategies, Fields virology, 2, 2160.
- Williams, T., 1996. The iridoviruses, Adv Virus Res, 46, 345-412.
- Williams, T., 1998. Invertebrate Iridescent Viruses.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V. G., 2005. A decade of advances in iridovirus research, Adv Virus Res, 65, 173-248.
- Williams, T. ve Ward, V., 2010. Insect Virology, Iridoviruses, S. Assgari ve K. Johnson editors, Caister Academic Press, UK, 123-152.
- Willis, D. B. ve Granoff, A., 1985. trans activation of an immediate-early frog virus 3 promoter by a virion protein, Journal of virology, 56,2, 495-501.
- Willis, D. B., Goorha, R. ve Granoff, A., 1979. Nongenetic reactivation of frog virus 3 DNA, Virology, 98,2, 476-479.
- Willis, D. B., 1987. DNA sequences required for trans-activation of an immediate-early frog virus 3 gene, Virology, 161,1, 1-7.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M. ve Milbrandt, J., 1991. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast, Science, 252,5010, 1296-1300.
- Wong, C. K., Young, V. L., Kleffmann, T. ve Ward, V. K., 2011. Genomic and proteomic analysis of invertebrate iridovirus type 9, J Virol, 85,15, 7900-7911.

- Wu, C., Wilson, S., Walker, B., Dawid, I., Paisley, T., Zimarino, V. ve Ueda, H., 1987. Purification and properties of *Drosophila* heat shock activator protein, Science, 238,4831, 1247-1253.
- Xia, L.-Q., Chen, J.-L., Zhang, H.-L., Cai, J., Zhou, S. ve Lu, Y.-S., 2019. Identification of virion-associated transcriptional transactivator (VATT) of SGIV ICP46 promoter and their binding site on promoter, Virology Journal, 16,1, 110.
- Yang, X., Lin, L., Zhang, X., Ji, Y., Lv, J., Zhu, Y., Yin, Y., Sun, Y. ve Han, X., 2008. Identification of a novel repressor element in the cyclo-oxygenase-2 promoter and its nuclear binding protein, Clin Exp Pharmacol Physiol, 35,10, 1204-1208.
- Yan, X., Olson, N. H., Van Etten, J. L., Bergoin, M., Rossmann, M. G. ve Baker, T. S., 2000. Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses, Nat Struct Biol, 7,2, 101-103.
- Yan, X., Yu, Z., Zhang, P., Battisti, A. J., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Bajaj, C., Bergoin, M., Rossmann, M. G. ve Baker, T. S., 2009. The capsid proteins of a large, icosahedral dsDNA virus, J Mol Biol, 385,4, 1287-1299.
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B. ve Huang, S. Y., 2017. HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy, Nucleic Acids Res, 45,W1, W365-w373.
- Yesilyurt, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z. ve Nalcacioglu, R., 2019. Chilo iridescent virus encodes two functional metalloproteases, Arch Virol, 164,3, 657-665.
- Zhang, Q. Y., Xiao, F., Xie, J., Li, Z. Q. ve Gui, J. F., 2004. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China, J Virol, 78,13, 6982-6994.

ÖZGEÇMİŞ

01.03.1989 tarihinde Trabzon'un Yomra ilçesinde doğdu. Eğitim hayatına Oymalıtepe İlköğretim Okulu'nda başladıktan sonra, lise eğitimini Özdil Çok Programlı Lisesi'nin sayısal bilimler alanında 2006 yılında tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Üniversite bünyesinde bulunan Yabancı Diller Yüksekokulu'nda bir yıl boyunca İngilizce dil eğitimi aldıktan sonra, 2011 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2011-2014 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Yüksek Lisansını tamamladı ve burada 2014'te doktora eğitimine başladı. Aralık 2017-Mayıs 2018 tarihleri arasında TÜBİTAK-2214 Yurt Dışı Araştırma Burs programından yararlanarak 6 aylığına Hollanda'da Wageningen Üniversitesi, Viroloji Laboratuvarında doktora çalışmaları için bulundu. Doktora eğitimine halen devam etmektedir.

Yayınları:

Makaleler:

Demir, İ., Gençler, D., Yanar, O., **Yesilyurt, A.**, Nalcacioglu, R. (2019). Characterization of a novel baculovirus isolate from *Malacosoma neustria* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lasiocampidae) in Samsun and its pathogenicity in different hosts. *Turkish Journal of Entomology*, 43 (4), 429-440. DOI: 10.16970/entoted.539140

Yesilyurt, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z. ve Nalcacioglu, R., 2019. Chilo iridescent virus encodes two functional metalloproteases, *Archives of Virology*, 164,3, 657-665.

Nalcacioglu, R., Muratoglu, H., **Yesilyurt, A.**, van Oers, M. M., Vlask, J. M., & Demirbag, Z. (2016). Enhanced insecticidal activity of Chilo iridescent virus expressing an insect specific neurotoxin. *J Invertebr Pathol*, 138, 104- 111.

Bildiriler:

Yesilyurt, A., Demirbag, Z., van Oers, M. M. ve Nalcacioglu, R. Transcriptional control of invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) genes. Eurasian Congress on Molecular Biotechnology. 19-21 Eylül 2019, Trabzon, TÜRKİYE.

Yesilyurt A., Ozsahin E., Demirbag Z., Sezen K., Demir İ., Nalcacioglu R. Identification of the Transactivator Proteins of Chilo Iridescent Virus (CIV) Immediate Early Genes. European Biotechnology Congress, 25-27 Mayıs 2017, Dubrovnik/HIRVATİSTAN.

Yesilyurt A., Muratoglu H., Demirbag Z., Nalcacioglu R. Chilo Iridescent Virüs (CIV)'e Ait Çinko-bağlı Matriks Metalloproteinaz Genlerinin Fonksiyonel Analizi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran 2014, ESKİŞEHİR.

Yesilyurt A., Muratoglu H., Demirbag Z., Nalcacioglu R. Functional analysis of *Chilo* iridescent virus zinc-binding matrix metalloproteinase genes, 4. International Entomopathogens and Microbial Control Symposium, Eylül 2013, ARTVİN.

Yesilyurt A., Muratoglu H., Demirbag Z., Nalcacioglu R., "Functional Analysis Of Chilo Iridescent Virus Zinc- Binding Matrix Metalloproteinase Gene, Insect Pathogens And Entomoparasitic Nematodes", IOBC Insect pathogens and entomoparasitic nematodes, , 16-20 Haziran 2013, ZAGREP, HIRVATİSTAN.