

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) GİRİŞ FÜZYON KOMPLEKSİ
GENLERİNİN SUSTURULMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda AĞIRMAN

EKİM 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) GİRİŞ FÜZYON KOMPLEKSİ
GENLERİNİN SUSTURULMASI

SEVDA AĞIRMAN

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 / 09 / 25

Tezin Savunma Tarihi : 22 / 10 / 25

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU
ORCID : - - -

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında
Sevda AĞIRMAN Tarafından Hazırlanan**

***AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) GİRİŞ FÜZYON
KOMPLEKSİ GENLERİNİN SUSTURULMASI***

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 02 / 10 / 2025 gün ve 2122 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU

.....

Üye : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

.....

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Giriş Füzyon Kompleksi Genlerinin Susturulması” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: FBA-2024-11020) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programına teşekkür ediyorum.

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrencisi olarak 2021 yılında başladığımda tez danışmanlığımı üstlenen Sayın Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU’na hem tez çalışmalarının planlanıp değerlendirmesinde hem de engin bilgi ve deneyimleriyle akademik yaşantıma desteğiyle yanımda olması nedeniyle teşekkürü borç bilirim.

Tez konumun seçiminde ve geliştirilmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tez savunmamda jüri üyesi olan Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK’a ve yayınlanmamış bilgilerini paylaşan Sayın Dr. Cihan İNAN’a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca deneysel çalışmalarına gerekli alt yapıları sunan laboratuvar imkânlarından yararlandığım Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına ve çalışmalarım boyunca destek olan çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Tez süresince her konuda yanımda olan ve destek veren arkadaşlarıma ve aileme özellikle annem Tenzile AĞIRMAN ve babam Fahrettin AĞIRMAN’a minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Sevda AĞIRMAN

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Giriş Füzyon Kompleksi Genlerinin Susturulması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 22/10/2025

Sevda AĞIRMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Poksvirüsler.....	2
1.1.1. Poksvirüslerin Genel Özellikleri.....	3
1.1.2. Poksvirüslerin Morfolojik Yapısı.....	4
1.1.3. Poksvirüslerin Genom Yapısı	6
1.1.4. Poksvirüslerin Enfeksiyon Döngüsü	8
1.1.5. Poksvirüslerin Filogenisi.....	10
1.2. Virüslerin Hücreye Girişi	12
1.3. VACV’de Hücreye Giriş	14
1.3.1. VACV’de Giriş Füzyon Kompleksi.....	20
1.4. Entomopoksvirüsler.....	27
1.5. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	29
1.6. RNA Susturması.....	30
1.6.1. RNAi Bileşenleri.....	32
1.6.2. RNAi Mekanizması.....	40
1.7. Çalışmanın Amacı	44
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	45
2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Virüslerin Çoğaltılması	45
2.2. EPDA Metodu ile Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	46
2.3. RNA Susturması Yöntemiyle Hedef Genlerin İfadelerinin Engellenmesi.....	47
2.3.1. AMEV EFC Genlerine Özgü Primerlerin Tasarlanması.....	47
2.3.2. PCR Reaksiyonları için Genomik DNA İzolasyonu	49

2.3.3. EFC Genlerinin Çoğaltılması.....	50
2.3.4. dsRNA'ların Ouşturulması	52
2.3.5. dsRNA'ların Hücrelere Transfeksiyonu	53
2.4. dsRNA Muamelesinin Virüs Üretimi Üzerindeki Etkisi.....	56
3. BULGULAR.....	57
3.1. Virüs Üretimi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	57
3.2. RNA susturması Yöntemiyle Hedef Genlerin Engellenmesi	57
3.2.1 PCR Reaksiyonları için Hedef Genlerin Çoğaltılması.....	57
3.2.2 Çoğaltılan genlerin dsRNA'lara Dönüştürülmesi	58
3.2.3 dsRNA'ların Hücrelere Transfeksiyonu	59
3.3. dsRNA Muamelesinin Virüs Üretimi Üzerine Etkisi.....	61
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇLAR.....	70
6. ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) GİRİŞ FÜZYON
KOMPLEKSİ GENLERİNİN SUSTURULMASI

Sevda AĞIRMAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU
2025, 89 Sayfa

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV), omurgasızları enfekte ettiği için omurgalıları enfekte eden poksvirüslerin moleküler mekanizmalarını aydınlatmak için temel bir araştırma materyali haline gelmiştir. AMEV, ayrıca ifade vektörü, gen terapi vektörü ve tarımsal açıdan önemli zararlılar için mikrobiyolojik kontrol ajanı olarak kullanım potansiyeline sahip önemli böcek virüslerindendir.

Vaksinya virüslerin hücreye giriş-füzyon kompleksi (EFC) 11 viral proteinden oluşurken AMEV'de sadece 9 gen ürününün EFC'yi oluşturduğu önerilmiştir. Bu çalışmada amaç AMEV EFC genlerini susturarak bu genlerin yeni virüs üretimi üzerindeki etkilerini araştırmaktır. RNA susturması (RNAi) yöntemi kullanılarak, AMEV EFC genlerine özgü uzun çift zincirli RNA (dsRNA) üretimi yapıldı. Transfeksiyon-enfeksiyon sonuçlarına göre, RNAi uygulamasında üretilen yeni virüs miktarı GFP ışımasıyla tespit edildi ve birçok gen için virüs miktarında azalma belirlendi. Virüs miktarındaki azalma, tek başına uygulanan dsAMV186-AmΔsph/gfp için 64,98 kat ve dsAMV232-AmΔsph/gfp için 32,93 kat olurken, birlikte uygulanan dsAMV217/dsAMV243-AmΔsph/gfp için 12,68 kat ve dsAMV232/dsAMV243-AmΔsph/gfp için 12,35 kat olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV), RNA susturması (RNAi), Giriş-füzyon kompleksi (EFC), Yeşil floresan protein (GFP), Uzun çift zincirli RNA (dsRNA)

SUMMARY

SILENCING OF THE ENTRY FUSION COMPLEX GENES OF *AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* (AMEV)

Sevda AĞIRMAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Hacer MURATOĞLU
2025, 89 Pages

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) has become an important research model for elucidating the molecular mechanisms of vertebrate-infecting poxviruses, as it naturally infects invertebrates. In addition, AMEV is a significant insect virus with potential applications as an expression vector, a gene therapy vector, and a microbiological control agent against agriculturally important pests.

Whereas the cell entry-fusion complex (EFC) of vaccinia virus is composed of 11 viral proteins, it has been proposed that only 9 genes products constitute the EFC in AMEV. The aim of this study was to investigate the effects of silencing AMEV EFC genes on the production of new viruses. Using RNA interference (RNAi), long double-stranded RNAs (dsRNAs) specific to AMEV EFC genes were synthesized. According to the transfection-infection results, the titer of newly produced virus in the RNAi application was detected by GFP fluorescence, and a reduction of virüs titer was determined for many genes. The decrease in virus titer was detected as 64.98-fold for ds*AMV186*-AmΔ*sph/gfp* and 32.93-fold for ds*AMV232*-AmΔ*sph/gfp* applied alone, while it was detected as 12.68-fold for ds*AMV217*/ds*AMV243*-AmΔ*sph/gfp* and 12.35-fold for ds*AMV232*/ds*AMV243*-AmΔ*sph/gfp* applied together.

Keywords: *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV), RNA interference (RNAi), Entry-fusion complex (EFC), Green florescent protein (GFP), Long double-stranded RNA (dsRNA)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. VACV de enfektif form oluşum aşamaları.....	5
Şekil 2. Poksvirüslerde ekstraselüler zarflı viriyon ve intraselüler olgun viriyonun yapısı	6
Şekil 3. VARV genomunun yapısal özellikleri	7
Şekil 4. Poksvirüs genomunun şematik gösterimi	8
Şekil 5. Poksvirüslerin enfeksiyon döngüsü	10
Şekil 6. Poxviridae familyası içindeki filogenik ilişkiler	11
Şekil 7. Enfeksiyöz poksvirüslerin iki ana formu.....	15
Şekil 8. Poksvirüslerin enfeksiyöz formlarının giriş yollarının şeması	17
Şekil 9. Poksvirüs viriyonunun yapısı ve yapısal proteinleri.....	18
Şekil 10. VACV EEV girişinin elektron mikroskopisi ile belirlenmesi	19
Şekil 11. EFC bileşenlerinin etkileşimleri	22
Şekil 12. VACV EFC protein bileşenleri.....	23
Şekil 13. Giriş-füzyon kompleksi (EFC) proteinlerinin yapıları ve kompleksin bir modeli	26
Şekil 14. Entomopoksvirüslerin sınıflandırılması	27
Şekil 15. Dicer enziminin yapısı.....	33
Şekil 16. RISC ve diğer susturma komplekslerinin oluşumu	35
Şekil 17. İnsan Argonat 2 (AGO2) proteininin alan organizasyonu.....	36
Şekil 18. Ökaryotik AGO kompleksi ve sRNA'ya bağlanması	37
Şekil 19. siRNA'nın yapısı	38
Şekil 20. siRNA ve miRNA'nın gen susturma mekanizmaları	39
Şekil 21. RNA susturmasının efektör basamağı.....	42
Şekil 22. PCR ile DNA kalıplarına T7 promotörlerinin eklenmesi	50
Şekil 23. Ticari kit kullanılarak dsRNA üretim ve saflaştırma protokolü	52
Şekil 24. AMEV EFC proteinlerinin sentezinden sorumlu genlerin RNA interferansı çalışma şeması	54
Şekil 25. AMEV Giriş Füzyon Kompleksi proteinlerinin sentezinden sorumlu genlerin PCR ürünleri	58
Şekil 26. AMEV Giriş Füzyon Kompleksi genlerine özgü dsRNA'larının agaroz jel görüntüsü	58

Şekil 27.	Enfeksiyon-transfeksiyonun tekli uygulamalarının floresan mikroskopik görüntüsü	60
Şekil 28.	Enfeksiyon-transfeksiyonun ikili uygulamalarının floresan mikroskopik görüntüsü	61
Şekil 29.	Tekli ve ikili şekilde dsRNA'ların enfeksiyon-transfeksiyon sonuçlarının EPDA ile virüs miktarının belirlenmesi.....	63
Şekil 30.	VACV ve AMEV EFC proteinlerini üreten genlerin şematik diyagramı	65



TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. siRNA ve miRNA'ların farkları	38
Tablo 2. Gene özgü primerler ve sırası	48
Tablo 3. T7 promotör dizisi içeren gene özgü primerler ve sırası.	49
Tablo 4. PCR reaksiyonu bileşenleri ve kullanılan miktarı	51
Tablo 5. Tekli uygulama için kullanılan A ve B solüsyonlarının hazırlanması.....	55
Tablo 6. İkili uygulama için kullanılan A ve B solüsyonlarının hazırlanması	55
Tablo 7. dsRNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları	59
Tablo 8. Enfeksiyon-transfeksiyon sonrası <i>AmΔsph/gfp</i> üretim sonuçları	62
Tablo 9. VACV ve AMEV EFC proteinlerini üreten genler	64

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGO	: Argonat Proteini
AMEV	: <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
<i>AmΔsph/gfp</i>	: Sferoidin Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
Bp	: Baz Çifti
CEV	: Hücreyle İlişkili Zarflı (Cell-Associated Enveloped Virion)
CIV	: <i>Chilo iridescent virus</i>
CPXV	: İnek Çiçeği Virüsü
dH ₂ O	: Damıtılmış Su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
<i>Drosophila</i> sp.	: Meyve Sineği
dsDNA	: Çift Sarmallı DNA
dsRNA	: Çift Sarmallı RNA
dsRNA	: Çift Zincirli RNA
EEV	: Hücre Dışı Zarflı Viriyon (Extracellular Enveloped Virion)
EFC	: Giriş Füzyon Kompleksi
EPDA	: Son Nokta Seyreltme Deneyi (End Point Dilution Assay)
EPV	: Entomopoksvirüs
EV	: Hücre Dışı Viriyon (Envelope Virion)
FBS	: Fetüs Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)
GAG	: Glikozaminoglikan
GFP	: Yeşil Floresan Protein
<i>gfp</i>	: Yeşil Floresan Proteini Kodlayan Gen
ICTV	: Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi
IEV	: Hücre İçi Zarflı Virüs (Intracellular Envelope Virion)
IMV	: Hücre İçi Olgun Virüs (Intracellular Mature Virüs)
IPTG	: İzopiripil Beta-D-tiyogalaktozid
ITR	: Ters Terminal Tekrarlar
kb	: Kilo Baz Çifti
kbp	: Kilo Baz Çifti

kDa	: Kilo Dalton
kriyo-EM	: Dondurmalı Elektron Mikroskobu
LD652	: <i>Lymantria dispar</i> 'dan Türetilen Böcek Hücre Kültürü
<i>Lymantria dispar</i>	: Çingene Güvesi
M	: Molar
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
MOI	: Hücre Başına Düşen Enfeksiyon Ünitesi (Multiplicity of Infection)
mRNA	: Mesajcı RNA
MV	: Olgun Viriyon (Mature Virion)
NCLDV	: Nükleo-Sitoplazmik Büyük DNA Virüsleri
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu (Phosphate Saline Buffer)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pfu	: Plak Oluşturan Ünite
RFLP	: DNA Fragman Analizleri
RISC	: RNA-induced silencing complex (RNA aracılı susturma kompleksi)
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA Susturması
RNaz	: RNA'yı Kesen Enzim
rpm	: Dakikadaki Dönme Sayısı (Round Per Minute)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Tomografi ve Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	: Küçük Girişimci RNA
sRNA	: Küçük RNA'lar
ssRNA	: Tek Zincirli RNA
TM	: Transmembran
VACV	: Vaksinya Virüs
VACV-WR	: Vaksinya Virüs WR suşu

VARV	: Variola Virüs
WV	: Zarflı Viriyon (Wrapped Virion)
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre



1. GENEL BİLGİLER

Poksvirüsler *Poxviridae* ailesine ait virüslerdir. Konak hücrenin sitoplazmasında çoğalan hem omurgalıları hem de omurgasızları enfekte edebilen, zarf yapısına sahip büyük çift sarmallı DNA virüsleridir (Moss, 2013). Replikasyonlarını konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleştirdikleri için hücreye giriş, gen ekspresyonu, genom replikasyonu, virion oluşumu ve konak savunma mekanizmalarına karşı direnç gibi süreçleri yöneten enzimler ve çeşitli proteinleri kendi genomlarında kodlar (Moss, 2016).

Poxviridae ailesi, *Chordopoxvirinae* ve *Entomopoxvirinae* olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (Bawden vd., 2000). *Entomopoxvirinae* üyeleri başka bir deyişle Entomopoksvirüsler (EPV'ler), günümüzde konak aralığı, virion morfolojisi ve enfekte ettikleri böcek takımlarına göre sınıflandırılmaktadır (Thézé vd., 2013). *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV), *Lepidoptera* takımını enfekte etmektedir (Bawden vd., 2000; Murphy, 1995). AMEV'nin Ld652 ve EAA-BTI gibi böcek hücre hatlarında yüksek verimlilikle çoğaltılabilmesi ve genetik manipülasyona açık olması, onu virolojik araştırmalar için uygun bir model sistem haline getirmektedir (Becker vd., 2004). AMEV, *Estigmene acrea* ve *Lymantria dispar* gibi tarımsal öneme sahip zararlı türleri enfekte edebilme yeteneğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde, belirli tarım zararlılarına karşı potansiyel bir mikrobiyal biyokontrol ajanı olarak değerlendirilebilmektedir (Özşahin vd., 2015). Bu doğrultuda, AMEV genomu üzerinde yürütülen genetik mühendisliği çalışmaları, bir yandan bu virüslerin biyoteknolojik uygulamalardaki potansiyelini artırırken, diğer yandan henüz işlevi bilinmeyen genlerin karakterizasyonuna da katkı sağlamaktadır (İnan vd., 2018).

RNA susturması (RNAi), tüm ökaryotik organizmalarda yaygın şekilde bulunan ve evrimsel olarak korunmuş bir gen susturma mekanizmasıdır (Fire vd., 1998). RNAi birçok organizmanın yabancı genetik materyale (RNA veya DNA) maruz kaldığında, bu dizilerin konak genomuna entegre olmasını ya da hücresel işlevleri bozmasını engellemek amacıyla yüksek özgüllükte savunma mekanizmaları geliştirdiği bir süreçtir (Mello ve Conte, 2004).

Poksvirüslerin hücreye bir giriş füzyon kompleksi (EFC) oluşturarak girer (Moss, 2012). Poksvirüs mutantlarının analizleri sonucunda, virüs girişinde ve zar füzyonunda görev alan ve poksvirüsler arasında homologları bulunan 11 viral protein tanımlanmıştır.

AMEV’de, VACV EFC’lerine benzer özellikte yalnızca dokuz protein tespit edilmiş ve bu genlerin AMEV EFC’sinin oluşumunda doğrudan rol oynadığı öne sürülmektedir. Bu proteinlerin *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) ile benzer olanları sırasıyla AMV118–A6L, AMV249–A21L, AMV186–A28L, AMV243–F9L, AMV035–G9, AMV127–H2R, AMV 232–J5L, AMV217–L1R ve AMV083–L5R olarak belirtilmiştir. Bu proteinlerin, AMEV’in konak hücreye giriş mekanizmasında kritik roller üstlendiği düşünülmektedir.

1.1. Poksvirüsler

Poxviridae ailesi, iki alt familyaya (*Entomopoxvirinae* ve *Chordopoxvirinae*) ayrılmakta ve toplamda 22 virüs cinsi içerecek şekilde sınıflandırılmaktadır (Sun vd., 2025). *Chordopoxvirinae* alt familyaya ait bazı türler insanları ve evcil hayvanları enfekte edebilmektedir. Bunlar arasında, yalnızca insanları enfekte ettiği bilinen ve çiçek hastalığının etkeni olan Variola Virüs (VARV), en dikkat çekenidir. Tarihsel çiçek hastalığı salgınları, insanlık üzerinde derin etkiler bırakmıştır ve Edward Jenner’in çiçek hastalığına karşı aşılamaı keşfetmesi ve bu yöntemin yaygınlaştırılması ise modern Batı tıbbının gelişiminde kritik bir dönüm noktası olarak kabul edilmiştir (Hughes vd., 2010). Günümüzde kullanılan çiçek aşısı, Vaksinya Virüse (VACV) dayansa da bu virüs Jenner’in ilk aşılamaı kullandığı varsayılan İnek Çiçeğı Virüsü (CPXV) ile genetik olarak önemli farklılıklar gösterir. Jenner gerçekten CPXV’yi kullanmışsa, VACV’nin aşı kültürlerinde bu virüsün yerini nasıl ve ne zaman aldığı belirsizliğini korumaktadır. VACV, çiçek hastalığını sonlandırmak amacıyla aşı olarak kullanılmıştır ve moleküler ve hücresel araştırmalarda en temsili üye olma özelliğini sürdürmektedir (Sun vd., 2025). Her ne kadar Variola Virüs (VARV) 1980 yılında tamamen ortadan kaldırılmış olsa da potansiyel bir biyoterör ajanı olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle VARV’nin oluşturduğu tehdit VACV kaynaklı rekombinant virüslere karşı ilgiyi artırmıştır. Böylece, VACV kaynaklı rekombinant çiçek virüslerinin geliştirilmesi, VACV’nin belirli patojenlere ait koruyucu antijenleri ifade edebilme ve bu patojenlere karşı bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyelini güçlendirmesine ve bu patojene yönelik enfeksiyon ve patogeneiz çalışmalarının devam etmesine sebep olmuştur (Artenstein ve Grabenstein, 2008; Hughes vd., 2010; Sun vd., 2025).

Poksvirüslerde viriyon çapı yaklaşık 200–300 nm olup, tuğla veya ovoid şekilli morfolojiye sahiptir (Smith vd., 2002). Bunlar, zarfla çevrili, büyük ve kompleks yapılı çift sarmallı DNA virüsleridir ve sitoplazmada replikasyon yetenekleri ile diğer DNA virüslerinden ayrılırlar (Moss, 2013). Replikasyon döngüsünde konak hücre çekirdeğine ihtiyaç duymadan, tamamen sitoplazmada gerçekleşen transkripsiyon ve DNA replikasyonu dikkat çeker. Bu süreç, virüsün kendi DNA-bağımlı RNA polimerazı, transkripsiyon faktörleri ve replikasyon enzimleri gibi geniş bir gen takımına sahip olmasını gerektirir (Condit vd., 2006; Moss, 2013). Ayrıca, poksvirüsler konak bağışıklık sisteminden kaçışta son derece etkili olan çok sayıda immünomodülatör proteini kodlar ve bu durum hem patogenez hem de aşı geliştirme açısından onları önemli bir araştırma modeli haline getirmektedir (Seet vd., 2003).

1.1.1. Poksvirüslerin Genel Özellikleri

Viral yaşam döngüsünün en azından bir bölümünün konak hücre sitoplazmasında gerçekleşmesi, poksvirüslerin, ökaryotik büyük DNA virüslerini kapsayan ve evrimsel olarak ilişkili bir grup olarak kabul edilen Nükleo-Sitoplazmik Büyük DNA Virüsleri (NCLDV) kladının tüm üyeleriyle paylaştığı ortak bir özelliktir (Iyer vd., 2001, 2006).

Poksvirüsler zarf yapısına sahip geniş bir DNA virüsü ailesini oluşturur. Çoğu DNA virüsünden farklı olarak, replikasyonlarını konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleştiren bu virüsler; hücreye giriş, gen ekspresyonu, genom replikasyonu, viriyon oluşumu ve konak savunma mekanizmalarına karşı direnç gibi süreçleri yöneten enzimler ve çeşitli proteinleri kendi genomlarında kodlar. (Moss, 2016).

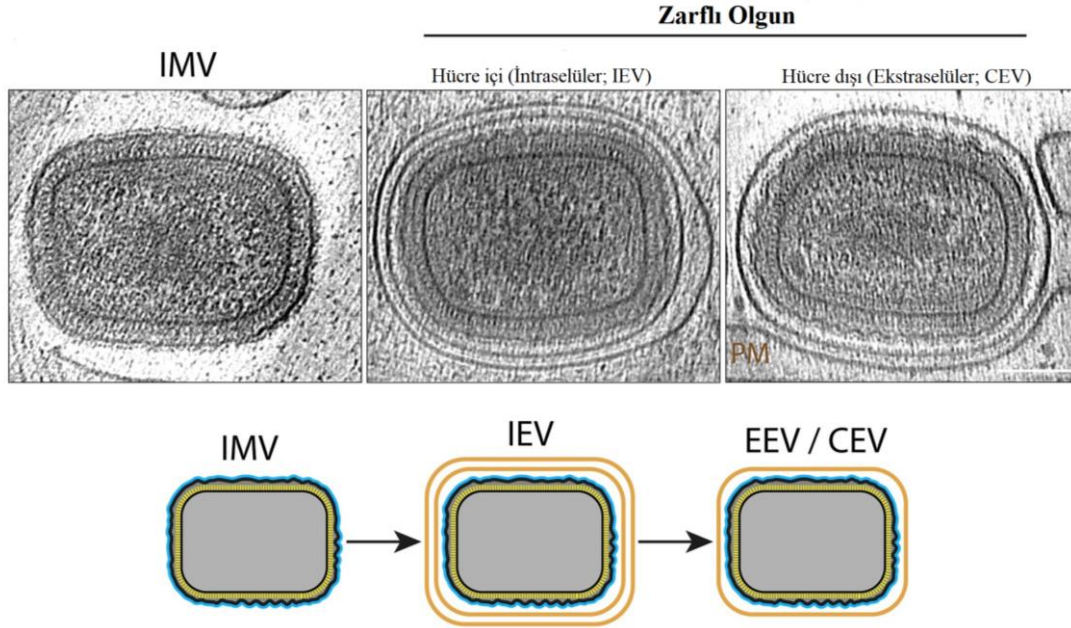
Poksvirüslerin tip türü olan VACV, yaklaşık 197 kbp uzunluğunda ve 200'den fazla tanımlanmış açık okuma çerçevesine (ORF) sahip büyük bir genom içerir. Poksvirüs gen ekspresyonu; erken, ara ve geç dönem olmak üzere aşamalı bir şekilde gerçekleşir ve her aşama özgün transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Erken genler, viral DNA replikasyonundan önce, viral girişi takiben virüs özünde transkribe edilir ve bu süreçte virüs tarafından kodlanan erken transkripsiyon faktörleri, DNA-bağımlı RNA polimerazlar ve viral çekirdeğe paketlenmiş diğer RNA işleme proteinleri görev alır. Erken gen ürünleri, DNA polimeraz, diğer DNA replikasyon yardımcıları ve ara transkripsiyon faktörlerini içermektedir. Viral DNA'nın birikimi ve ara transkripsiyon faktörlerinin varlığı, ara genlerin ekspresyonunu başlatır ve bu genler ise geç dönem transkripsiyon faktörlerinin sentezini

sağlar. Ara transkripsiyon faktörlerinin sentezi, erken transkripsiyon faktörleri, viral RNA polimeraz ve işleme proteinleri ile birlikte geç genlerin etkin transkripsiyonunu uyarır. Ayrıca, erken transkripsiyon faktörleri ve RNA işleme bileşenlerinin viriyonlara paketlenmiş olması, yeni enfeksiyon döngüsünde erken genlerin hızlıca ifade edilmesini mümkün kılar (Deng vd., 2025).

1.1.2. Poksvirüslerin Morfolojik Yapısı

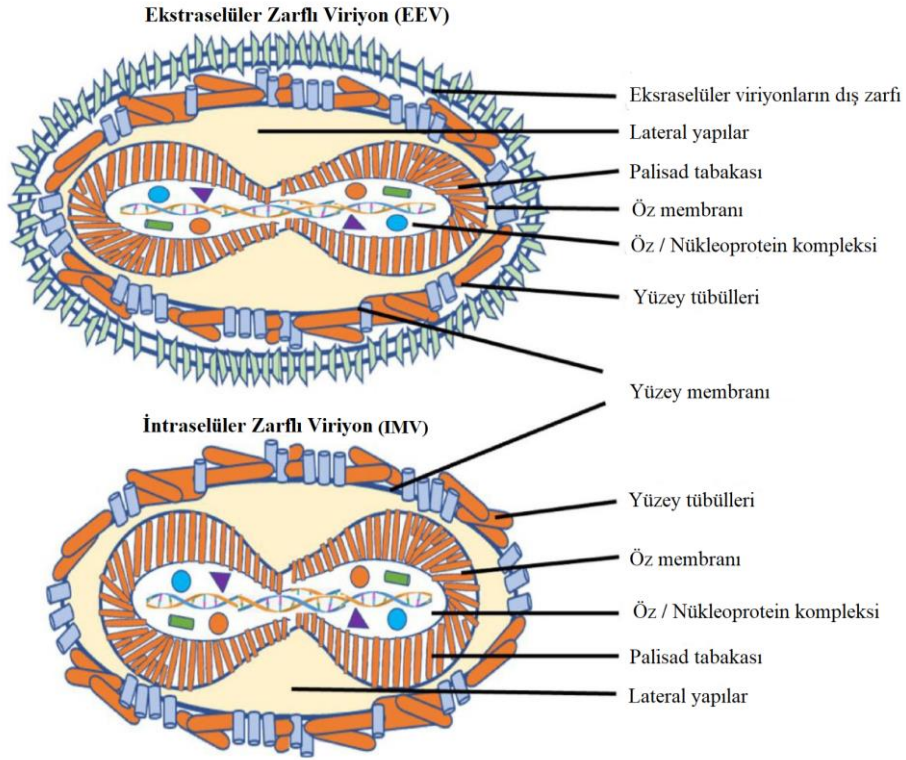
Poksvirüslerin morfolojik yapısı, karakteristik özellikler sergileyen oldukça özgün ve kompleks bir mimariye sahiptir. Poksvirüslerin nükleoprotein kompleksi silindirik bir yapı sergileyebilir ve uzun eksen boyunca en az iki kez katlanarak karakteristik bir “Z” formu oluşturabilir (McInnes vd., 2023). Viriyonlar, genel olarak belirgin bir pleomorfizm göstermelerine rağmen, çoğunlukla yaklaşık 220–450 nm uzunluğunda, 140–260 nm genişliğinde ve 140–260 nm kalınlığında tuğla benzeri bir morfolojiye sahiptir. Viriyonların yüzeyi, 10–40 nm çapında tübüler veya küresel alt birimlerden oluşan lipoprotein yapısında bir zarf ile çevrilidir. Bazı durumlarda ise viriyonlar oval biçimde yaklaşık 250–300 nm uzunluğunda ve 160–190 nm çapında gözlenebilir ve bu formda olanların yüzey zarfında, 10–20 nm çapında düzenli spiral filamentöz yapılar tespit edilmiştir (McInnes vd., 2023).

Poksvirüsler, konak hücrelerinde replikasyon süreçleri sırasında iki başlıca enfektif form olan hücre içi olgun viriyon (MV; mature virion) ya da diğer adıyla hücre içi olgun virüs (IMV; intracellular mature virus) ve hücre dışı zarflı viriyon (EEV; extracellular enveloped virion) üretirler (McInnes vd., 2023; Moss, 2013). Bazı MV’ler, trans-Golgi ağı veya endozomlardan türeyen çift katlı hücre içi zarlara sarılarak zarflı viriyonlar (WV; wrapped virion) ya da hücre içi zarflı virüs (IEV; intracellular envelope virion) formuna dönüşebilir. Bu form, hücre zarıyla füzyona girerek dış zarfı kaybeder ve hücre dışı viriyon (EV; envelope virion) haline gelir (Şekil 1) (McInnes vd., 2023). EV’ler, zarf yapısına özgü proteinler nedeniyle MV’den antijenik olarak ayrılır. Hücre yüzeyine bağlandıklarında hücreyle ilişkili zarflı virüs (CEV; cell-associated enveloped virion), hücre dışı ortama salındıklarında ise hücre dışı zarflı virüs (EEV) olarak adlandırılırlar (McInnes vd., 2023).



şekil 1. VACV de enfektif form oluşum aşamaları (Hernandez-Gonzalez vd., 2023).

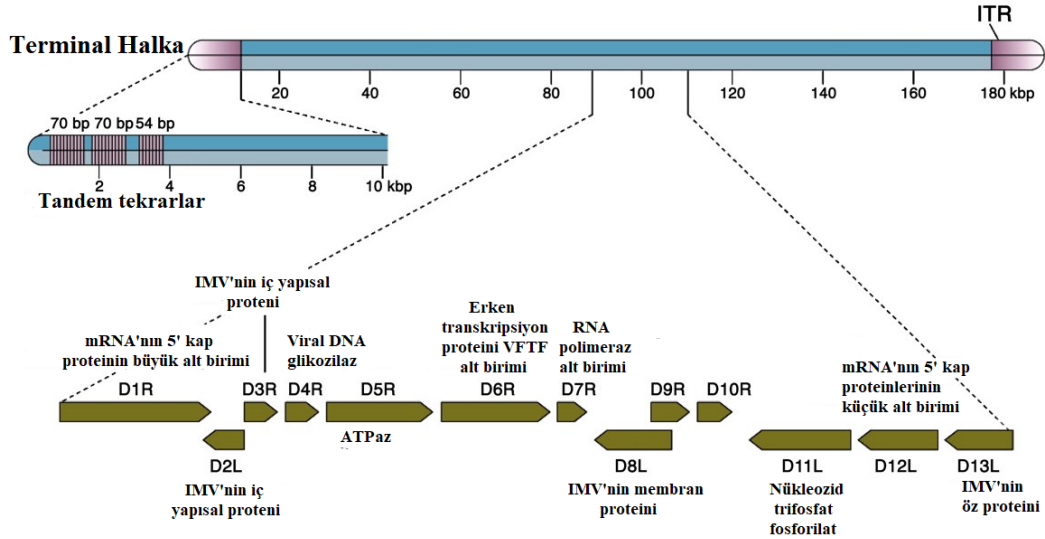
IMV, tek katlı bir lipid membranla çevrilmiş olup hücre içinde olgunlaşır ve genellikle hücre lizisi sonucu serbest kalır. Buna karşın, EEV, IMV'nin üzerine ek bir dış lipid zarf kazanarak ekzositoz yoluyla hücre dışına çıkar ve konaklar arasında yayılımda kritik bir rol oynar (Moss, 2013). EEV'nin sahip olduğu bu ek zarflı yapı, virüsün konak bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırır ve virüsün doku yayılımını artırır (Smith vd., 2002). EV yapısında bulunan zarflı yapı dışında her iki viriyon formunda da yüzeyde tübüler yapılar, palisad tabakası, lateral yapılar gibi ortak yapılar bulunur (şekil 2). Bunlar, viral yapısal kararlılığı sağlar ve enfeksiyonun erken aşamalarında işlev gören enzimleri içerir (Srinivasan Rajsri ve Rao, 2022). IMV, ek zarf içermemesi nedeniyle çevresel koşullara karşı daha dirençlidir ve enfeksiyonun başlangıcında bulaşmada n plandadır. Bu yapısal ve fonksiyonel farklılıklar, poksvirüslerin konak içi çoğalmasını ve konaklar arası yayılımını optimize ederek virüsün enfektivitesini ve patojenitesini artırır (Yu vd., 2025).



Şekil 2. Poksvirüslerde ekstraselüler zarflı viriyon ve intraselüler olgun viriyonun yapısı (Srinivasan Rajsri ve Rao, 2022).

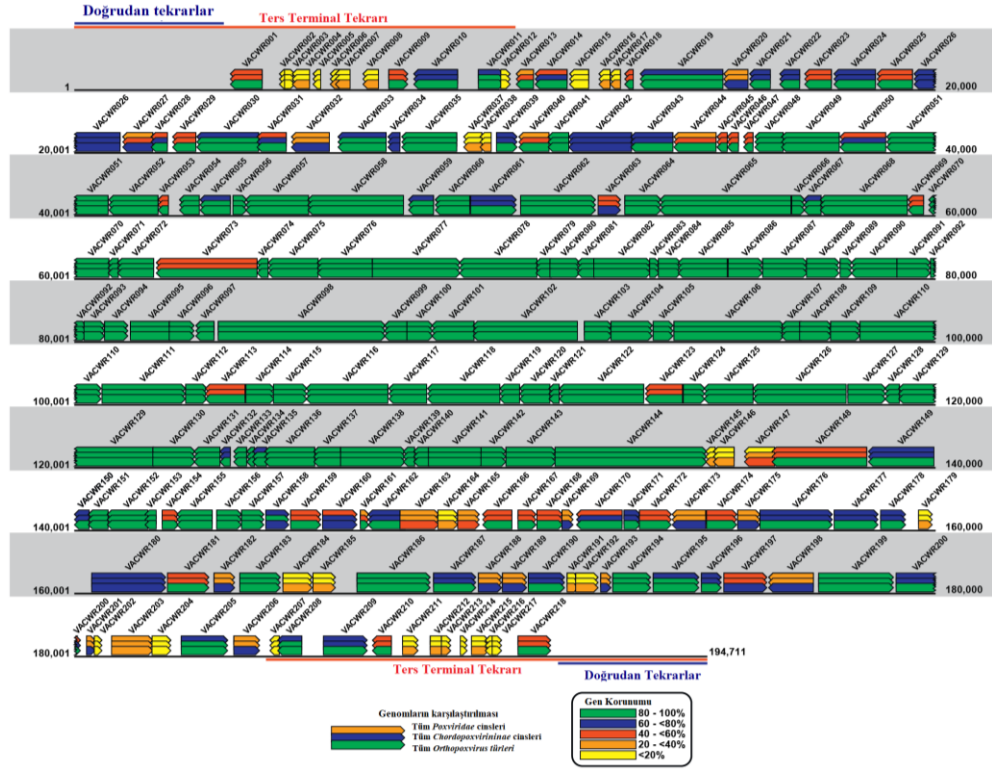
1.1.3. Poksvirüslerin Genom Yapısı

Farklı poksvirüs türlerinin genom büyüklüğü 130 kb ile 360 kb arasında değişkenlik göstermekte olup, bu durum, diğer büyük çift sarmallı DNA virüsü ailelerinde de yaygın olarak gözlemlenen bir özelliktir (Moss ve Shisler, 2001). Poksvirüs genomu, değişken uzunluklara sahip (<0,1–12,4 kb) uçlarında ters terminal tekrarlar (ITR'ler) içeren, doğrusal bir çift sarmallı DNA (dsDNA) molekülüdür. Genom uçları, kovalent olarak bağlanmış ekstra-helikal bazlardan oluşan karakteristik saç tokası (hairpin) yapıları sayesinde kapalıdır (Şekil 3). Bu yapılar, ters çevrilmiş tamamlayıcı dizilerden oluşarak, kusurlu şekilde eşleşmiş iki izomerik “flip-flop” DNA formunun oluşmasına neden olur (Manuka vd., 2025). Genomun organizasyonu fonksiyonel açıdan da düzenlidir: Replikasyon için gerekli olan yüksek oranda korunmuş genler (örneğin polimerazlar, yapısal proteinler ve çeşitli enzimler) genomun merkezi bölgelerinde yer alırken, immünmodülasyon, anti-apoptoz gibi konak etkileşimlerine aracılık eden, daha az korunmuş ve zorunlu olmayan genler terminal bölgelerde konumlanmıştır (Şekil 3) (Baroudy vd., 1982; McInnes vd., 2023).



Şekil 3. VARV genomunun yapısal özellikleri (Harrison vd., 2004; Manuka vd., 2025). Belirli proteinleri kodlayan gen bölgeleri ile birlikte, tam uzunlukta doğrusal dsDNA genomu şematik olarak gösterilmektedir.

Poksvirüslerin genom organizasyonuna güzel bir örnek olan Vaksinya Virüs WR (VACV-WR) suşunun genomunda bulunan bireysel genler, Şekil 4'te renkli dikdörtgenler ile temsil edilmiştir. Her dikdörtgenin bir ucunda bulunan ok simgesi, ilgili genin DNA üzerindeki transkripsiyon yönünü göstermektedir. Şekilde bazı genlerin renkli dikdörtgenleri birbirleriyle örtüşür biçimde sunulmuştur ve bu örtüşmeler, söz konusu genlerin farklı poksvirüs türleri arasındaki evrimsel korunum seviyesini görsel olarak ifade etmektedir. Korunum seviyesi, bir genin poksvirüs ailesi içindeki dağılımını ve benzerlik derecesini yansıtarak, genin farklı türlerde bulunma yaygınlığı hakkında bilgi sağlar. Örneğin, bazı genler poksvirüs ailesinin tamamında geniş bir şekilde korunurken, diğerleri yalnızca belirli taksonomik alt gruplarda ya da özellikle ortopoksvirüsler (Orthopoxvirus) arasında sınırlı olarak mevcuttur. Korunumun kategorik sınıflandırması, genlerin genel poksvirüsler arasında yaygınlığına, sadece kordopoksvirüsler (omurgalı poksvirüsler) içinde bulunmasına ya da yalnızca ortopoksvirüsler grubuna özgü olmasına göre yapılır (McInnes vd., 2023).



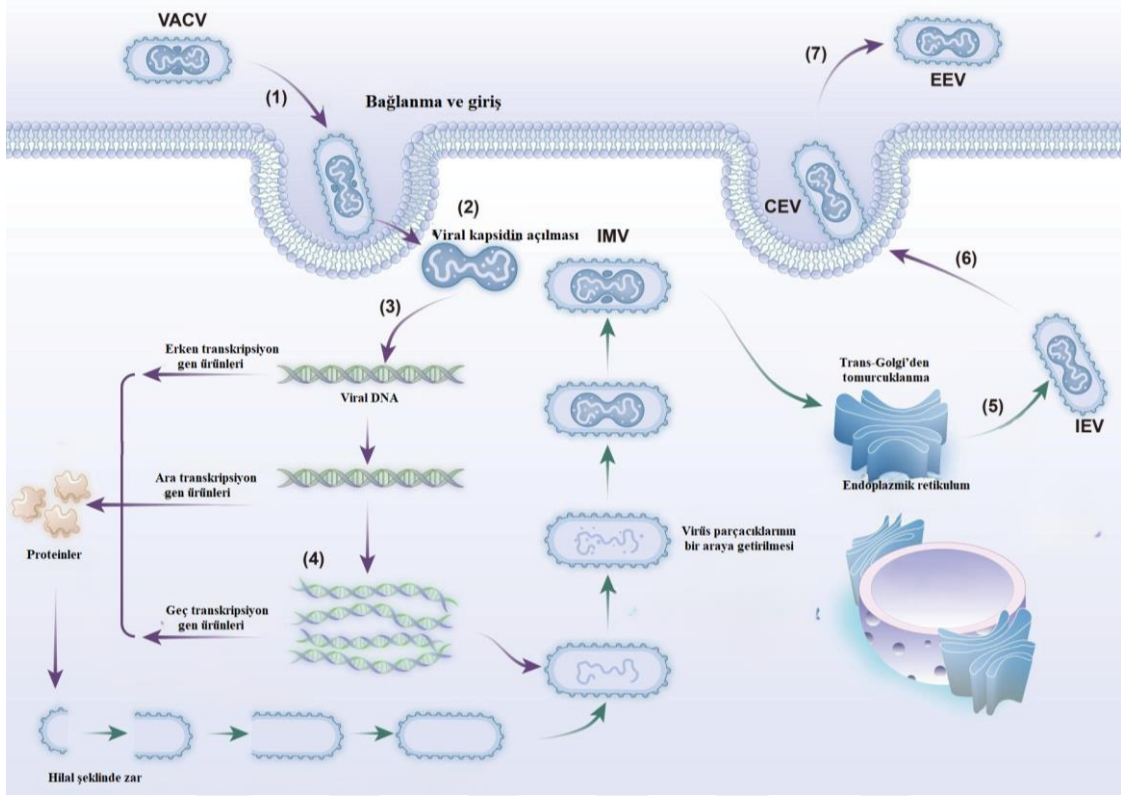
Şekil 4. Poksvirüs genomunun şematik gösterimi (McInnes vd., 2023). VACV-WR (AY243312) genomu, terminal saç tokaları, ITR'ler ve ITR'ler içinde yer alan doğrudan tekrarlar içeren doğrusal dsDNA molekülüdür. Şemadaki renkli dikdörtgenler her bir WR genini ve üzerlerindeki oklar transkripsiyon yönünü göstermektedir. VACWR etiketi, GenBank için kayıtlı lokus adını temsil eder. Renkli örtüşmeler genlerin tüm poksvirüslerde, kordopoksvirüslerde ve ortopoksvirüslerdeki korunum seviyesini belirtir. Çubuklar ise ilgili taksonlardaki gen korunum oranına göre renk kodlamasıyla sunulmuştur.

1.1.4. Poksvirüslerin Enfeksiyon Döngüsü

Poksvirüslerin konak hücreye giriş süreci, viriyonların konak hücre yüzeyine bağlanmasını ve ardından viral özün sitoplazmaya taşınmasını sağlayan bir füzyon/giriş mekanizmasının gerçekleşmesini içeren iki aşamalı bir süreçtir (Moss, 2006). Poksvirüslerin bağlanma fazı, viriyon ile konak hücre yüzeyindeki glikozaminoglikanlar ve laminin gibi yapıların elektrostatik etkileşimleriyle gerçekleşir. Viral zarın konak membranıyla füzyonu, yüksek oranda korunmuş en az bir düzine proteinden oluşan giriş/füzyon kompleksi (EFC) aracılığıyla sağlanır. Ek zara sahip olması nedeniyle EV, MV'den yapısal olarak farklıdır. Ancak EV zarfı bağlanma sonrası hızla parçalandığından, giriş/füzyon mekanizmasının her iki formu da benzer şekilde işlediği düşünülmektedir (McInnes vd., 2023).

DNA genomunun replikasyonunun, ağırlıklı olarak viral kaynaklı enzimlerin etkisiyle yürütüldüğü düşünülmektedir (Greseth ve Traktman, 2022). Poksvirüslerin replikasyonu, tamamen enfekte konak hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir (Forterre, 2005; Moss, 2013). Poksvirüsler, konak hücreye viral ve hücrel zarların doğrudan füzyonu veya endositik alım olmak üzere iki ana mekanizma ile giriş yapmaktadır. Bu giriş basamağını takiben virüs, endosomal bölmelerden sitoplazmaya salınır (Moss, 2016; Schmidt vd., 2012). Bu sistem, DNA replikasyonu için gerekli enzimleri, ara transkripsiyon aşamasında görev alan faktörleri ve virüsleri konak savunma sisteminden koruyan çok sayıda proteinini kodlayan erken dönem mRNA'larının hızlı sentezini sağlar (Yu vd., 2025). Hücreye giriş sonrası viral öz korunurken, yanal cisimler parçalanarak mikrotübül ağı aracılığıyla hücrede perinükleer bölgeye taşınır. Burada viral öz morfolojik değişime uğrar ve erken transkripsiyon başlar. Viral DNA'ya bağımlı RNA polimeraz tarafından sentezlenen erken mRNA'lar, sitoplazmaya salınarak poliribozomlarda ifade edilir. Bunu, viral öz duvarının parçalanmasıyla DNA genomunun serbestleşme ve endoplazmik retikulum kökenli zarların erken viral proteinlerle birleşerek replikasyon öncesi merkezleri oluşturduğu soyulma süreci izler. DNA sentezi ilerledikçe bu merkezler genişleyerek sitoplazmada "viral fabrikalara" dönüşür (Greseth ve Traktman, 2022; Sun vd., 2025). DNA replikasyonu ve ara ile geç dönem gen ekspresyonunun ardından viral genomlar olgunlaşmamış viriyonlara paketlenir ve olgunlaşarak IMV'ye dönüşür (Roberts ve Smith, 2008). MV'ler, hücre lizisiyle serbest bırakılabilir (Roberts ve Smith, 2008) veya bir kısmı, trans-Golgi ağı ya da erken endozom kökenli çift katmanlı zarlara sahip IEV'ye farklılaşır (McInnes vd., 2023). IEV'ler mikrotübül ağı aracılığıyla taşınma ile plazma zarına ulaşır ve burada füzyonla hücre dışı CEV ve EEV formlarını oluşturarak bu formların salımını sağlar (Şekil 5) (McInnes vd., 2023).

Doğal enfeksiyonlar sırasında poksvirüs yayılımı, büyük olasılıkla enfekte konaklarda bulunan zarflı viriyon formları (EV, IEV ve CEV) veya enfekte hücrelerin mobilitesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. *in vitro* modellerde gösterildiği üzere, enfekte hücreler, henüz olgun enfeksiyöz viriyonlar üretmeden önce bile süperenfektif viriyonları hücre dışına yönlendirebilmekte ve bu viriyonlar, aktin polimerizasyonu aracılığıyla oluşan hücrel çıkıntılar (aktin kuyrukları veya aktin roketleri) boyunca hareket ederek komşu duyarlı hücrelere doğrudan aktarılabilir. Bu mekanizma, virüsün hücreden hücreye bulaşmasını hızlandırmakta ve konak savunma sistemlerinden kaçışına katkıda bulunmaktadır (McInnes vd., 2023).

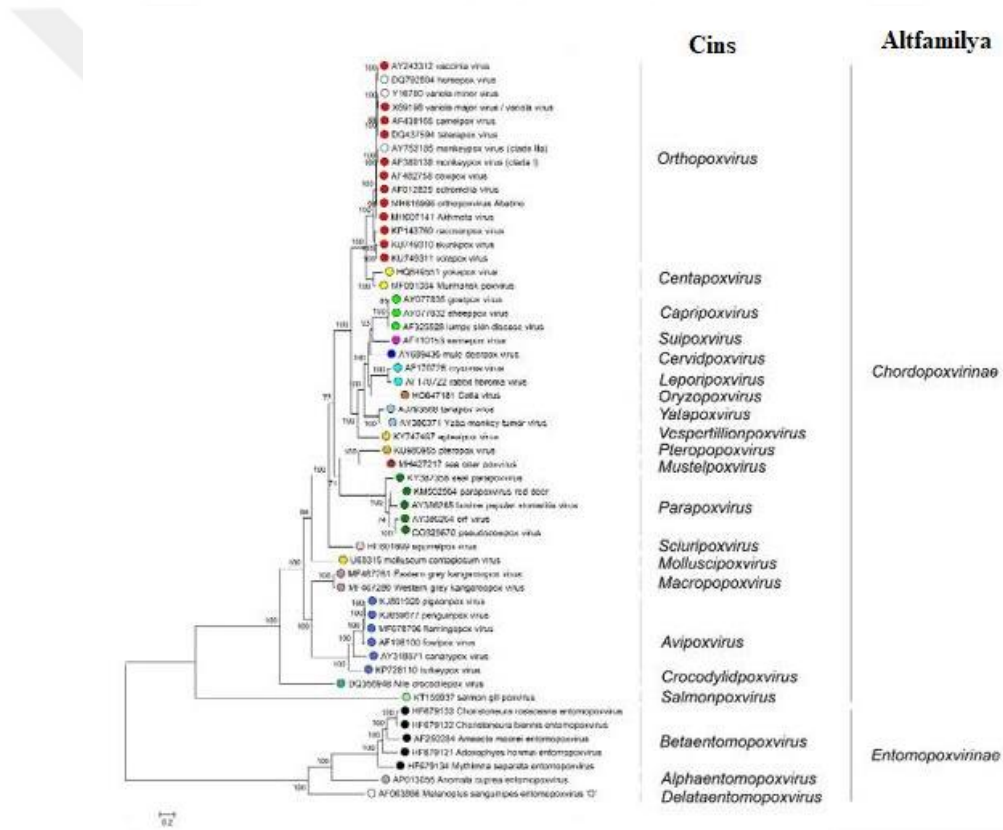


Şekil 5. Poksvirüslerin enfeksiyon döngüsü (Sun vd., 2025). 1. Viral giriş, membran füzyonu veya endositozla gerçekleşir. 2. Çekirdek membranı kaldırılarak sitoplazmaya salınır. 3. Erken genler, viral dsDNA sentezini sağlayan yapısal olmayan proteinleri üretir. 4. Ara genlerin ekspresyonu, IMV üretimi için enzim ve yapısal proteinleri sağlar. 5. IMV'ler Golgi'ye gidip zarflanarak IEV'ye dönüşür. 6. IEV'ler hücre yüzeyine taşınır, plazma membranıyla birleşerek CEV oluşturur. 7. CEV'ler salınarak EEV'ye dönüşür.

1.1.5. Poksvirüslerin Filogenisi

Poxviridae familyasındaki filogenetik ilişkiler incelendiğinde, *Poxviridae* ailesi üyelerinin bazı cinsleri arasında küçük farklılıklar bulunmasına rağmen karakteristik bir viriyon morfolojisini ortak olarak paylaştığı gözlenmektedir. Serolojik testler, nükleik asit hibridizasyonları ve restriksiyon enzimlerine bağlı DNA fragman analizleri (RFLP) gibi yöntemler genellikle cins içi düzeyde sınıflandırmalarda kullanılmaktadır. Aile, temel olarak konakların omurgalı olup olmasına göre iki alt aileye ayrılmıştır. Alt aile düzeyindeki bu ayırım, konak yelpazesi, neden olunan hastalıklar, *in vitro* biyolojik özellikler, cinsler arası antijenik çapraz reaktivitenin sınırlılığı ve belirli genlerin filogenetik analizleri temel alınarak yapılmaktadır. Genomik sekans verileri, geleneksel taksonomik sınıflandırmaları büyük ölçüde desteklemektedir. Bununla birlikte, bazı kuş poksvirüsleri arasında gözlenen

genetik çeşitlilik düzeyinin, mevcut sınıflandırmada tek bir cins kapsamında değerlendirilmesinden daha yüksek olduğu filogenetik ağaç yapısında açıkça görülmektedir (Şekil 6). Poksvirüslerin filogenetik rekonstrüksiyonu, özellikle aile düzeyindeki karşılaştırmalarda, nükleotid dizilerinden ziyade amino asit çoklu dizilimlerinin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu tercih, farklı cinslere ait genomlar arasında gözlenen belirgin nükleotid bileşimi farklarından kaynaklanmaktadır. Örneğin, genomik GC içeriği, *Betaentomopoxvirus* cinsindeki türlerde yaklaşık %18 iken, *Molluscipoxvirus* ve *Sciuripoxvirus* cinslerine ait türlerde bu oran sırasıyla %65 ve %66'ya kadar çıkmaktadır (Lefkowitz vd., 2006; McInnes vd., 2023).



Şekil 6. *Poxviridae* familyası içindeki filogenetik ilişkiler (McInnes vd., 2023). *Poxviridae* familyasına ait temsili virüs türleri, filogenetik analizlere dayalı olarak elde edilen yerleşimlerine göre gösterilmektedir. Omurgalı konakları enfekte eden *Chordopoxvirinae* alt familyası ile omurgasız konakları enfekte eden *Entomopoxvirinae* alt familyasına ait cinsler ayrı ayrı sunulmuştur. Her tür, ilgili virüs izolatının adı ile tanımlanmış ve tam genomik nükleotid dizisine ait GenBank erişim numarasıyla etiketlenmiş örnek bir izolat aracılığıyla temsil edilmiştir.

1.2. Virüslerin Hücreye Girişi

Virüslerin hücreye girişine dair yapılan ilk çalışmalarda elektron mikroskobu kullanılmıştır. Ancak büyük ölçüde dondurmalı elektron mikroskobu (kriyo-EM), tomografi ve taramalı elektron mikroskobunda (SEM) yapılan çalışmalar, girişe dair ilk detaylı çalışmaları oluşturmaktadır (Lucas vd., 2008; Plitzko vd., 2009). Virüsler, konak hücreye giriş sürecinde çeşitli mekanizmalar kullanarak (Sobhy, 2017) hücresel bariyerleri aşar ve genetik materyalleri ile gerekli yapısal ve enzimatik bileşenlerini replikasyonun gerçekleşeceği bölgeye iletir. Bu süreç, enfeksiyon döngüsünün ilk basamağını oluşturarak viral genomun çoğalmasını ve yeni virüs partiküllerinin oluşumunu mümkün kılar (Poranen vd., 2002). Bu giriş mekanizmaları virüse ve konağa özgü olabileceği gibi özgün olmayan giriş yolları da bulunmaktadır. Virüs girişi, viriyonların kendilerine özgü hücrenin yüzeyine bağlanması ve bunu takiben viral nükleik asidin virüse özgü hücrenin sitoplazmasına veya çekirdeğine ulaşmasını içermektedir. Virüsler, genellikle hücreye endositoz yoluyla girmektedir (Kalia ve Jameel, 2011).

Virüs enfeksiyonu için ilk adım pokvirüslerde de olduğu gibi viral tutunmadır. Viral tutunmanın ardından reseptörlerle bağlanma ve konak hücreye giriş gerçekleşir (Kalia ve Jameel, 2011). Hücresel reseptörler, virüsler arasında ve hedef hücre tipine göre farklılık gösteren protein yapılarıdır. Aynı aileden virüsler farklı reseptörlere bağlanabilirken, farklı ailelerden virüsler ortak reseptörleri kullanabilir. Reseptörlerin varlığı, virüsün doku ve tür özgüllüğünü belirlerken, bazı bağlanma faktörleri de endositozu aktif olarak teşvik edebilir (Skehel ve Wiley, 2000).

Bazı hücresel glikanlar ve membran lipidleri, viral girişte gerekli olup virüsün hücre yüzeyinde kararlılığını sağlar ve giriş engellerinin aşılmasına katkıda bulunur. Viral proteinler ile hücresel reseptörler arasındaki etkileşimler, yapısal sinyal yollarını aktifleştirerek plazma membranında konformasyonel değişiklikleri tetikler, endositozu uyarır ve membranda gözenek oluşumunu sağlayarak giriş sürecini başlatır (Sobhy, 2017). Endozomal ağ, hücresel özelliklere sahip farklı konumlarda bulunan organellerden oluşması sayesinde çoklu işlevlere sahiptir ve böylece endozom oluşmaktadır. Oluşan endozomlarda boşluk içi pH kademeli olarak düşerken, vezikül oluşumu, perinükleer bölgeye taşınma, Rab protein değişimi, fosfotidil inositolfosfat dönüşümü ve lizozomal protein ile hidrolazların kazanılması gibi süreçlerin ardından lizozomlarla birleşme gerçekleşir (Helenius, 2018). Endositoza alternatif olarak, bazı virüsler, zarfın konak hücre zarıyla doğrudan füzyonu ile

hücreye girer. Hücre tipi, yüzey reseptörleri ve diğer hücresel özellikler, hangi giriş mekanizmasının aktif olacağını belirler. Plazma membranı dinamikleri, membran trafiği, sinyal iletimi ve endozom olgunlaşması gibi hücresel süreçler, viral giriş yolunun seçimini etkiler (Mercer vd., 2010). Ancak genel olarak virüsler konak hücreye girmek için, füzyon, hücre-hücre füzyonu ve endositoz olmak üzere üç ana yol izlemektedirler.

Füzyon yoluyla hücre girişi, genellikle zarflı virüsler tarafından gerçekleştirilir. Zarflı virüsler, çift katlı lipid zarf ile çevrili olup, zarf üzerinde viral kaynaklı bir veya birden fazla glikoprotein (füzojen) bulunur. Bu glikoproteinler, hücre ile etkileşimin başlamasını sağlar ve virüs girişini tetikler (Chernomordik ve Kozlov, 2003). Zarflı virüslerin viral zar ile konak hücre membranı arasındaki füzyon süreci, virüsün hücreye bağlanması için zorunlu olup viral proteinlerin etkileşimiyle gözenek oluşumunu tetikler ve virüs zarı dışarıda kalarak zarfsız viriyon oluşur. Bu aşamada virüs, özgünlüğünü kaybederek hücre içine giriş sağlar, viriyonun genetik materyali ya endozomda yer alır ya da doğrudan sitoplazmaya aktarılır ve enfeksiyon genellikle endositoz mekanizmasıyla devam eder (Más ve Melero, 2013; Sobhy, 2017).

Bazı virüsler, enfeksiyonu yaymak için doğrudan hücreden hücreye geçiş yapar ve bu süreç hücre-hücre füzyonu olarak adlandırılır. Virüsler, hedef hücre zarlarına bağlanmak ve içeri girmek için özgün reseptörleri ve viral glikoproteinleri kullanır. Bu bağlanmanın çeşitli yolları vardır:

- a. Enfekte hücrelerde bulunan bulaşıcı viral materyalin, viral çekirdekler aracılığıyla hücreler arası zar membranlarının füzyonunu takiben henüz enfekte olmamış yeni hedef hücrelere aktarımı ile gerçekleşebilir.
- b. Viriyonlar, sıkı bağlantı noktalarına sahip hücreler arasında geçiş yapabilir.
- c. Viriyonlar, sinir sinapsları boyunca hareket ederek enfeksiyonun yayılımını devam ettirebilir.
- d. Bazı virüsler (Poksvirüsler), aktin ve tubulin gibi hücresel iskelet elemanlarını kullanarak hücreden hücreye yayılabilir.
- e. HIV gibi retrovirüsler aktin içeren yapıların yıkımı ile yayılımını destekler.
- f. Membran nanotüpleri yıkılarak virüslerin hücre-hücre füzyonu sağlanarak yayılım desteklenir.
- g. Virolojik sinapslar denilen özel bağlantılar aracılığıyla hücreler arasında füzyon gerçekleşebilir. Böylece virüslerin hücreler arası aktarımı kolaylaşır (Sattentau, 2008).

Çoğu virüs hücreye endositoz yoluyla girdiği için, bazı virüsler genetik materyallerini doğrudan plazma zarı füzyonuyla hücre içine aktarır. İnhibitörlerle yapılan hücre girişi ve *in vitro* füzyon çalışmaları, bazı zarflı virüs ailelerinde endositozun zorunlu olduğunu ve zarf proteinlerinin düşük pH etkisiyle füzyon aktivitesini gerçekleştirdiğini göstermiştir (Helenius vd., 1980; White vd., 1981). Virüsler, farklı moleküler ve oluşum mekanizmalarına sahip çeşitli endositik yollar kullanarak hücreye giriş yapar. Bu yollar hem hücre yüzeyinde etkin işlev gösterir hem de virüslerin konağın bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlar ve viral parçacık türleri ile süreçte rol oynayan moleküllere göre değişiklik göstermektedir (Kalia ve Jameel, 2011; Sobhy, 2017). Klatrin aracılı endositoz, klatrin proteiniyle kaplı invajinasyonlar oluşturarak grip virüsü, herpes simpleks virüsü (HSV), HIV-1, adenovirüs ve çocuk felci virüsü gibi birçok virüsün hücreye girişini sağlar. Kaveolar endositoz yolu ise, kaveolin proteiniyle zenginleşmiş çukurlar aracılığıyla özellikle SV40 ve echovirüs gibi polyomavirüslerin ana giriş portalı olarak işlev görür. Klatrin ve kaveolin bağımsız yollar ise, bu iki proteini içermeyen invajinasyonlar yoluyla virüsleri hücre içine alır. Ancak bu yolların kargo özgülüğü ve moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Makropinositoz ise, hücre zarının büyük invajinasyonları aracılığıyla vaksinya virüs ve adenovirüs gibi virüslerin girişinde rol oynar. Bu endositik yolların her biri, virüsleri farklı hücresel hedeflere taşıma kapasitesine sahiptir (Kalia ve Jameel, 2011)

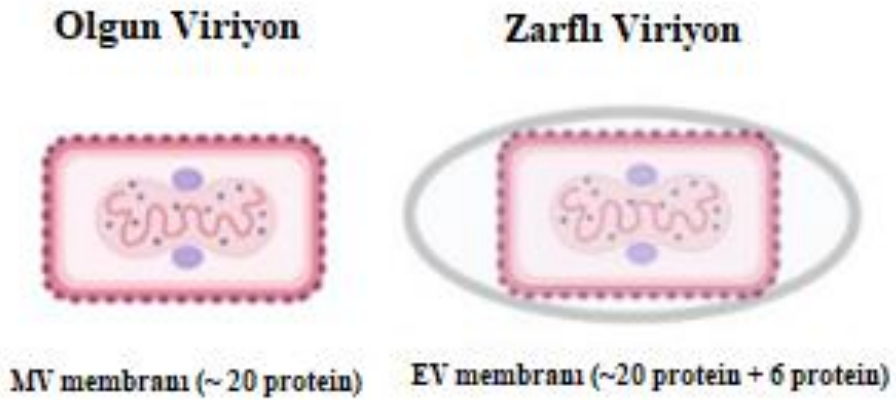
1.3. VACV'de Hücreye Giriş

Birçok virüs nükleoprotein çekirdeğinin sitoplazmaya girişine izin veren bir hücresel membran ile birleşen bir dış lipoprotein zarf içerir (White vd., 2008). Viral füzyon yolu genellikle, moleküler mekanizmalar farklılık gösterse de hücresel membranların füzyonu sırasında meydana gelene benzer şekilde membran pozisyonu, hemifüzyon ve gözenek oluşumunu içerir (Chernomordik ve Kozlov, 2005). Çoğu virüsün girişi için bir veya iki protein ve herpes virüsler için üç veya dört protein gerekliken (White vd., 2008) VACV'de çoklu proteinlerin birleşimi olan giriş füzyon kompleksi (EFC) gerekmektedir.

Poksvirüsler, büyük boyutlu, zarflı DNA virüslerinden oluşan bir aile olup, genetik olarak ilişkili omurgalı veya omurgasız hücrelerin sitoplazması içerisinde çoğalan virüsleri kapsamaktadır (Moss, 2013). Poksvirüsler içerisinde en kapsamlı şekilde incelenmiş olanlar, *Orthopoxvirus* cinsine ait türlerdir. Bu cinse dâhil olan virüsler arasında, doğada ortadan kaldırılmış çiçek hastalığının etkeni *Variola virus* (şu anda Brezilya'da endemik), modern

çiçek hastalığı aşısı olarak kullanılan *Vaccinia virus* (VACV) ve orijinal çiçek hastalığı aşısında kullanılan *Cowpox virus* (CPXV) yer almaktadır. Ayrıca, insanlarda çiçek hastalığına benzer klinik tabloya yol açan ve Afrika'ya özgü olan *Monkeypox virus* (MPXV) da bu cinsin üyeleri arasındadır. Poksvirüsler hakkında mevcut bilgilerin büyük bir kısmı, VACV üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar sayesinde elde edilmiştir (Moss, 2006).

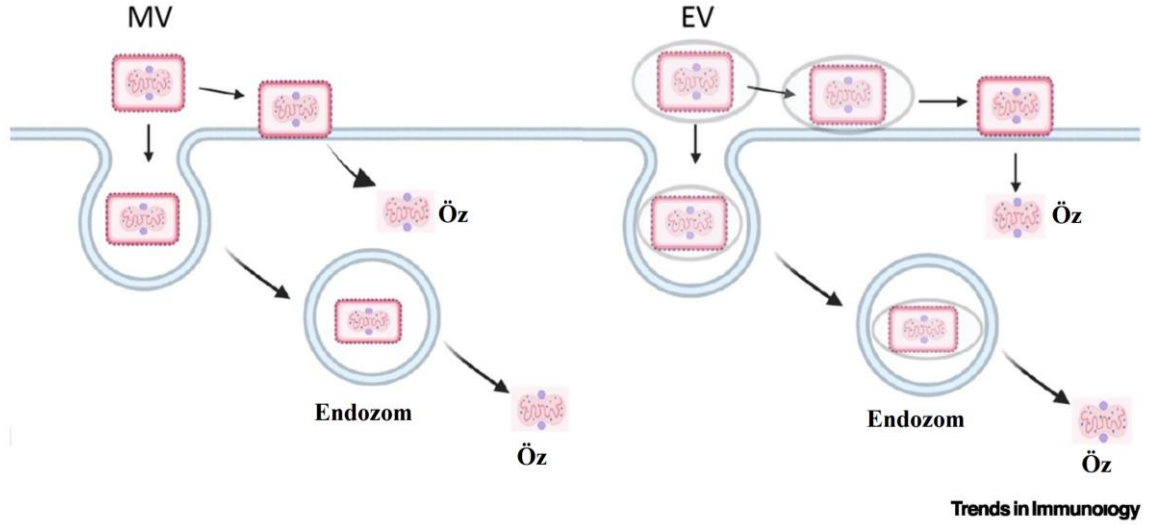
VACV MV, fiçi biçiminde bir iç nükleoprotein çekirdek ile bu çekirdeği çevreleyen “lateral body” olarak adlandırılan protein yapılar ve tek bir lipoprotein çift katmandan oluşur (Cyrklaff vd., 2005; Dales ve Siminovitch, 1961; Hollinshead vd., 1999). Saflaştırılmış MV’lerde en az 80 viral protein bulunmakta olup bunların yaklaşık 20’si membranla ilişkilidir (Chung vd., 2006; Resch vd., 2007; Yoder vd., 2006). MV membranı, endoplazmik retikulum zarının viral proteinlerle modifikasyonu sonucu oluşmaktadır (Moss, 2015). Bazı MV’ler, morfogenezin geç aşamalarında endosomal ya da trans-golgi zarları aracılığıyla ekstra bir zar kazanarak EV’yi oluşturur. EV’ler, MV’ye ek olarak en az altı özgün viral protein ve ek bir zara sahiptir (Şekil 7) (Moss, 2012). MV’ler daha kararlı olup hayvanlar arasında bulaşmada rol oynarken, EV’ler kırılğan yapılarıyla hücreden hücreye yayılımında ve antikor nötralizasyonuna dirençte etkilidir (Moss, 2016). EV’ler hücre yüzeyinde aktin içeren çıkıntılarla ilişkili kalabilir veya çevre sıvısına salınabilir. Böylece, VACV suşlarının çoğunda ilk yol baskındır ve hücreler arası yayılımın temel mekanizmasını oluşturur (Blasco ve Moss, 1991). Yapısal olarak MV, çift zincirli DNA genomu içeren viral öz, iki lateral bölge ve en az 20 protein barındıran tek lipoprotein membrandan oluşurken, EV bu yapıya ek olarak altı protein ve bir dış zara sahiptir (Moss, 2012; Schmidt vd., 2011)



Şekil 7. Enfeksiyöz poksvirüslerin iki ana formu (Moss, 2012). MV tek lipit membranlı yaklaşık 20 protein ve EV altı ek protein içeren dış membranlı iki formdadır.

Poksvirüslerin EV membranının, yukarıda söz edildiği gibi endoplazmik retikulum zarının viral proteinlerle modifikasyonu sonucu oluştuğu öne sürülmektedir. MV ve EV yüzey proteinlerindeki farklılıklar, farklı reseptörler aracılığıyla konağa bağlanmayı ve konak seçiciliğini belirler (Moss, 2015). MV membranına gömülü füzyon proteinleri, virüsün plazma veya endozomal membran aracılığıyla hücreye girişini mümkün kılar (Yu vd., 2025). Füzyon öncesinde EV'nin dış zarı, hücre yüzeyindeki glikozaminoglikanlarla etkileşim (Law vd., 2006) ya da endozomlardaki düşük pH'ın füzyon proteinlerini açığa çıkarması (Ichihashi, 1996) sonucu bozulur (Şekil 8) (Yu vd., 2025). Biyokimyasal, floresan ve mikroskopik veriler, füzyonun yalnızca MV membranı ile plazma membranı arasında gerçekleştiğini ortaya koymuştur. MV'ler, yapısal kararlılıkları sayesinde enfeksiyonun konaklar arasında taşınmasında önemli rol oynarken EV'ler, ek membranı ve özgün yüzey proteinleriyle hücreler arası yayılımı destekler ve antikor nötralizasyonuna karşı MV'lere kıyasla daha yüksek direnç gösterir (Moss, 2016).

VACV'nin replikasyon döngüsü, viriyonların duyarlı bir hücreye bağlanması ve bu hücreye girmesiyle başlamaktadır (Moss, 2006). VACV'nin MV ve EV olarak iki yapısal formu olduğundan bahsedilmiştir. Bu iki yapısal form nedeniyle VACV'nin hücreye girişi, karmaşıktır (Moss, 2006). Virüsün hücre yüzeyine bağlanmasının ardından EFC, öncelikle viral ve konak zarlara ait dış yaprakçıkların birleşmesini içeren hemifüzyonu, bunu takiben gözenek oluşumunu ve viral çekirdeğin sitoplazmaya aktarılmasını gerçekleştirir (Laliberte vd., 2011; Yu vd., 2025). Bu giriş olayı, plazma membranında ya da endozomlar içinde meydana gelebilir (Şekil 8). Düşük pH ile tetiklenen giriş aktivasyonu, füzyonu baskılayıcı rol üstlenen A26 proteininin ayrışmasını gerektirir (Chang vd., 2019).



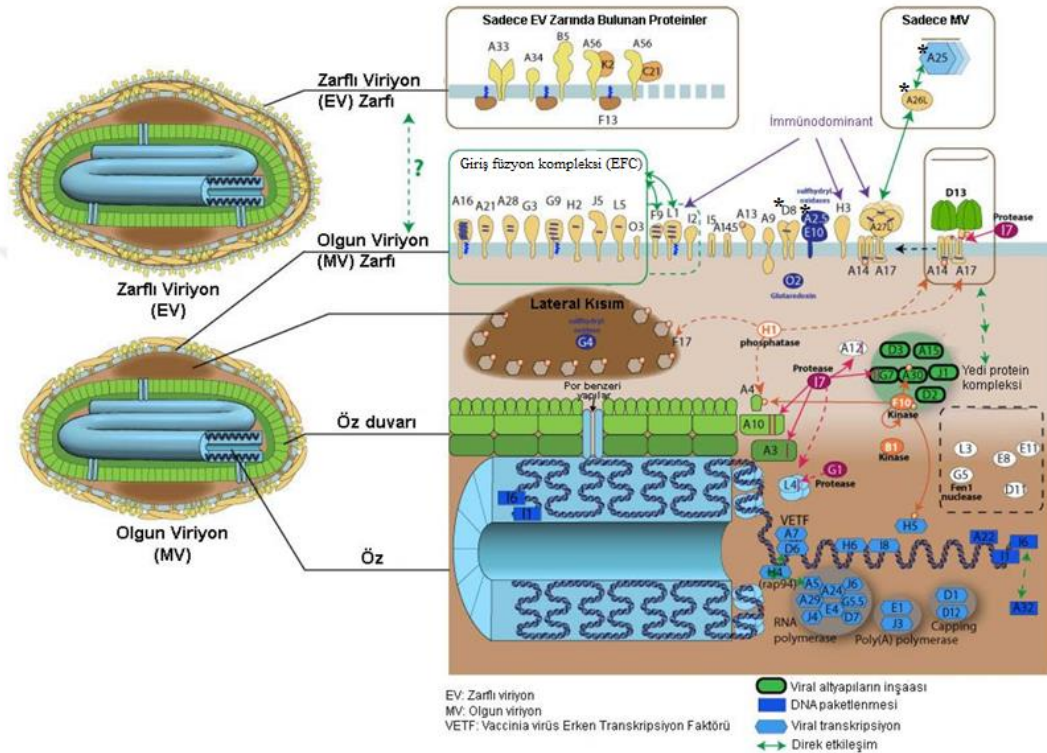
Şekil 8. Poksvirüslerin enfeksiyöz formlarının giriş yollarının şeması (Yu vd., 2025). MV'nin ve EV'nin hücreye girişi plazma ya da endozomal membran üzerinden gerçekleşir. MV membranına entegre EFC, bu zarlarla füzyonu mümkün kılar. EV'lerde ise dış membran, iç MV membranının kaynaşabilmesi için hücre yüzeyinde veya endozomda bozulur.

VACV'nin konak hücrelere bağlanması sırasında, MV enfektif formunun hücre yüzeyine bağlanmasına en az dört viral protein aracılık etmektedir. VACV'de viral bağlanma A26, A27, D8 ve H3 proteinlerinin GAG'lar veya lamininler ile etkileşimiyle gerçekleşir (Yu vd., 2025). A26, hücre yüzeyi lamininine bağlanan 58 kDa'lık bir proteindir (Chiu vd., 2007), ayrıca A16 ve G9'a bağlanarak asit duyarlı bir füzyon baskılayıcı işlevi görür (Chang vd., 2012) ve A27 aracılığıyla MV membranına sabitlenir (Chang vd., 2019) (Şekil 9).

A27, GAG'lara bağlanan, trimer/hekzamer formda bulunan 12 kDa'lık çok işlevli bir proteindir, asidik koşullarda A26'nın toplanmasını kolaylaştırarak füzyonu düzenler (Chang vd., 2013). Anti-A27 antikorları GAG bağlanma bölgesi yakınından bağlanarak virüsü nötralize eder (Kaeffer vd., 2016). A27, asidik koşullar altında EFC'nin kararlılığını korumak amacıyla A26'nın birikimini kolaylaştırarak viral füzyonun düzenlenmesine katkıda bulunur. A27'ye karşı geliştirilen antikorlar birden fazla epitopu hedefler. Bu antikorlardan bir grup, GAG bağlanma bölgesine yakın konumlanarak A27'nin adezyon işlevini engelleyebilecek şekilde bağlanır ve böylece virüsü kompleman aracılı mekanizmalarla nötralize eder (Kaeffer vd., 2016; Yu vd., 2025).

D8, kondroitin sülfata bağlanan 32 kDa'lık bir glikoprotein olup replikasyon için gerekli değildir ancak yokluğunda virülans azalır (Hsiao vd., 1999; Matho vd., 2014).

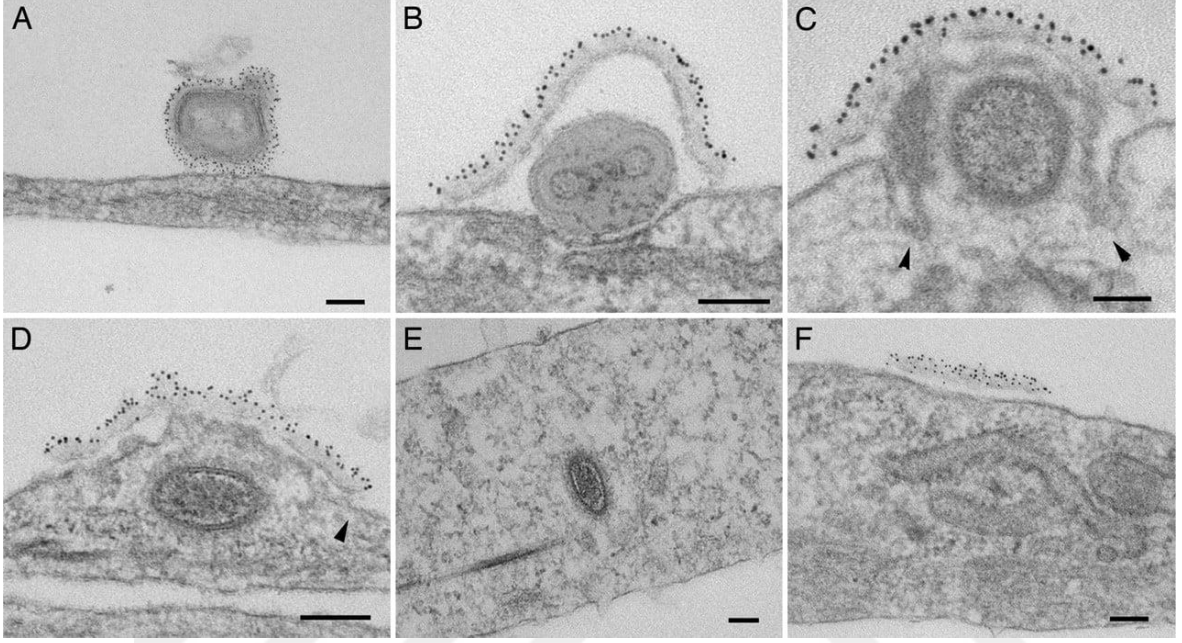
H3, heparana bağlanan ve viriyon morfogenezi için gerekli olan korunan 37 kDa'lık bir proteindir (da Fonseca vd., 2000; Lin vd., 2000). Güçlü nötralizan antikor yanıtı indükler ve kısmi koruma sağlar (Davies vd., 2005; Khlusevich vd., 2022). A27 ve H3 proteinlerini üreten genlerin silinmesi, VACV'nin enfeksiyon kabiliyetini ciddi şekilde azaltmaktadır. Ancak bu proteinlerin tek başına etkisizleştirilmesi, virüsün hücreye girişini tamamen engellemez (Chang vd., 2013). Viral bağlanmadan sorumlu 4 proteinden yalnızca H3 bütün poksvirüslerde korunmuştur (Moss, 2012).



Şekil 9. Poksvirüs viriyonunun yapısı ve yapısal proteinleri (De Castro vd., 2024). Harf ve rakamlar proteinleri kodlayan açık okuma zincirlerin kodlarını göstermektedir.

EV'lerin karmaşık yapısı ve dış zarının bozunmasını takiben hücreye girişi nedeniyle hücrelere bağlanması hakkında çok az şey bilinmektedir (Vanderplasschen ve Smith, 1997). Yapılan çalışmalarda elektron mikrografları, EV hücre yüzeyine temas ettiğinde dış membranının ayrıldığını göstermekte ve bu yapının füzyon yeteneğine sahip olmadığını ortaya koymaktadır (Law vd., 2006). Dış EV zarı, iç yüzeyinde palmitoillenmiş, dış yüzeyinde ise glikozillenmiş ve glikozillenmemiş proteinler içeren çift katmanlı bir yapıdır (Şekil 10) (Yu vd., 2025). Hücreye tutunma ve takiben replikasyonun gerçekleşebilmesi için

ilk olarak EV dış membranından yani zarfında ayrılması gerekmektedir. Zarfın bozunması için iki durum mevcuttur: ilki düşük pH'ta zarfın bozunması ve bunu takiben MV proteinlerinin konak hücrenin yüzey elamanlarına tutunmasını içerir (Law vd., 2006; Roberts vd., 2009).



Şekil 10. VACV EEV girişinin elektron mikroskopisi ile belirlenmesi (Roberts vd., 2009). 7A. Buz üzerinde hücrelere bağlanan EEV'ler, anti-B5 monoklonal antikor ile işaretli dış zarf sayesinde IMV'lerden ayırt edilmiştir. 7B. 37 °C'de (bazılarında 4 °C) dış zarf hücre temas noktasında bozulmuş ve IMV ortaya çıkmıştır. 7B–D. Dış zarf plazma membranı ile kaynaşmamış, IMV üzerinde dışarıda kalmıştır. 7C, 7D. IMV zarfı plazma membranı ile füzyona girmiştir. 7D–F. Füzyon sonrası IMV zarfı düzleşmiş, ana girişten uzaklaşmış ve EEV zarfı hücre dışında kalmıştır.

EV'de bulunan ilave 6 proteinden (Şekil 9) (A33, A34, A56, B5, F13 ve K2) biri olan VACV A33, hücreden hücreye yayılım için gereklidir. Bu protein aynı zamanda 21 kDa ağırlığında glikozile ve fosforile korunmuş bir proteindir (Wolffe vd., 2001; Doceul vd., 2010). Tamamlayıcı eşliğinde A33'ün EV membranını parçalayarak MV'yi anti-L1 antikorlarına karşı ortaya çıkarabilir (Lustig vd., 2004). Diğer ilave protein VACV A34, 20 kDa'lık, tek transmembran (TM) alanı (18–35 aa) ve B5 ile etkileşen uzun ekto alanı (36–168 aa) olan bir proteindir (Monticelli vd., 2019). A34, ekzositoz sonrası EV'lerin hücre yüzeyinde tutulması (Blasco vd., 1993), hücrelere bağlanma (Monticelli vd., 2019) ve giriş öncesi EV membranının parçalanması (Law vd., 2006) gibi birden fazla işlevi yerine getirir. VACV A56, proteinin N-ucu yakınında immünoglobulin benzeri bir alan içeren yoğun

glikozillenmiş tip I TM proteindir (DeHaven vd., 2011). Replikasyon için gerekli değildir. Ancak düzenleyici etkileri fark edilmiştir (Yu vd., 2025). A56'nın K2 ile kompleks oluşturduğu, bu kompleksin heterodimer yapıda olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu heterodimerin süperenfeksiyonu ve sinsityum oluşumunu engellemek için EFC alt komplekslerinden A16-G9 proteinleriyle etkileşime girerek virüs yayılımını artırabildiği gözlemlenmiştir (Wagenaar vd., 2008). Ayrıca A56 tamamlayıcı kontrol proteini olan C21 ile etkileşime girer ve bu etkileşim C21'in enfekte hücrenin yüzeyine yerleşmesini sağlar (DeHaven vd., 2011b; Albarnaz vd., 2018). Bu yerleşim, C21'in virüsün bağışıklık sisteminden kaçışını gerçekleştirme görevini yerine getirmesini sağlar (Kotwal vd., 1990). B5'in kısa korunmuş tekrarları (SCR) içeren büyük bir hücre dışı alana sahip tip I membran proteini olduğu tahmin edilmektedir. B5'e karşı antikorlar, fare modellerinde EV'leri nötralize ederek VACV enfeksiyonuna koruyucu etki sağlar (Lustig vd., 2005; Galmiche vd., 1999). B5 antikorlarının EV'leri nötralize etmedeki etkisi, büyük ölçüde canlı aşıdan elde edilen antiserum tarafından sağlanmaktadır (Bell vd., 2004; Pütz vd., 2006). İnsan anti-B5 monoklonal antikorları nötralizasyon için büyük ölçüde tamamlayıcıya ve izotipe bağımlıdır (Benhnia vd., 2009). VACV F13, 42 kDa palmitoillenmiş, EV membran oluşumu için gerekli, fosfolipaz aktivitesine sahip bir proteindir ve iç membranda bulunduğu için koruyucu antikorların hedefi olma olasılığı düşüktür (Baek vd., 1997; Blasco ve Moss, 1991; Yu vd., 2025). Son olarak VACV K2 ise TM alanı bulunmayan 42 kDa'lık bir proteindir ve A56 ile etkileşerek EV yüzeyinde tutulur (Turner ve Moyer, 2008). Anti-K2 antikorlarının EV'ler üzerindeki etkisine dair herhangi bir rapor mevcut değildir (Yu vd., 2025).

1.3.1. VACV'de Giriş Füzyon Kompleksi

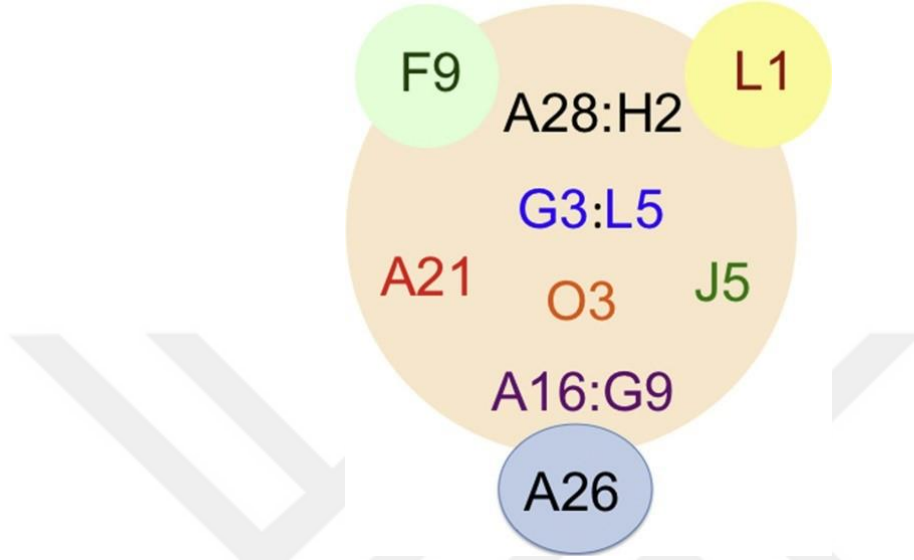
Çoğu virüs, viral ve hücre zarlarının füzyonunu gerçekleştirmek için yalnızca bir veya iki proteinden yararlanırken, poksvirüsler MV zarında gömülü EFC oluşturan 11 temel proteini kullanarak virüs girişinin bağlanma sonrası adımını düzenlemektedir (Şekil 8) (Moss, 2016; Yu vd., 2025). Poksvirüs ailesinin tip türü olan VACV üzerinde yapılan çalışmalar, EFC'yi oluşturan 11 korunmuş proteini ortaya koymuştur (Senkevich ve Moss, 2005b). Bu proteinlerin bireysel olarak işlevlerinin ortadan kaldırılması, diğer EFC bileşenlerini içeren yapısal olarak normal viriyonların oluşmasına rağmen, kompleksin kararlılığını bozmakta ve viral giriş mekanizmasının tamamen veya büyük ölçüde engellenmesine neden olmaktadır (Tak vd., 2021).

EFC proteinleri birbirlerinden eşsiz özelliklere sahiptir. EFC proteinleri, 4–43 kDa arasında değişen düşük moleküler kütleleri, N- veya C-ucunda konumlanmış TM bölgeleri, poksvirüslerin sitoplazmik redoks sistemi tarafından katalizlenen molekül içi disülfür bağları ve ayrılabilir sinyal peptidi ile glikozilasyonun bulunmaması gibi ortak yapısal özelliklerle tanımlanır (Senkevich vd., 2002; Yu vd., 2025).

EFC proteinlerinin saflaştırma çalışmaları ilk olarak indirgeyici ajanlar ve iyonik olmayan deterjanlar kullanılarak yapılmaya çalışılmıştır ancak bunların bu şekilde çıkarılmasının zor olduğu anlaşılmıştır. Bunun nedeninin de bazı proteinlerin membranın altında bulunan proteinlerle etkileşim halinde olması olduğu düşünülmektedir (Moss, 2016). Her bir EFC bileşeni, diğer herhangi bir bileşene karşı geliştirilen antikorlar kullanılarak enfekte hücre zarlarından immünoafinite yöntemiyle saflaştırılabilir ve bu süreç, bir veya birden fazla kompleksin varlığını ortaya koyar (Moss, 2016). VACV genomu üzerinde bu bileşenlerin her biri için ayrı ayrı aranmasıyla tespit edilen bileşenler için koşullu mutantlar tasarlanarak EFC proteinlerinin ekspresyonları baskılanmış ve varlıkları keşfedilmiştir (Moss, 2016; Senkevich vd., 2004; Townsley vd., 2005b). Daha sonra bahsedileceği gibi, L1 ve F9 ek bileşenleri ise tanımlanan ilk EFC proteinleriyle fiziksel etkileşimlerine dayanarak kütle spektrometrisi ile tespit edilmişlerdir (Senkevich vd., 2005b). Elde edilen veriler ışığında L1 ve F9 dışındaki EFC proteinlerinin ekspresyonunun baskılanması sonucunda EFC'nin işlevini tam olarak yapamadığı, enfeksiyonun görülür şekilde azaldığı fark edilmiştir. Bu da yapısal ağıın bozulduğu ve kompleksin bir araya gelemediğini yalnızca alt komplekslerin bir arada bulunduğunu ima etmektedir. Bu bulgular, L1 ve F9'un periferik olarak bağlandığını ve geriye kalan dokuz proteinin EFC'nin çekirdek yapısını oluşturduğunu düşündürmektedir (Şekil 11) (Moss, 2016).

EFC'yi oluşturan proteinlerin etkileşimleri ve oluşturdıkları düşünülen alt kompleksler; A28-H2 (Nelson vd., 2008a), G3-L5 (Wolfe ve Moss, 2011) ve A16-G9 (Wagenaar vd., 2008) şeklindedir (Şekil 11). A28-H2 alt kompleksi, H2 proteininde yer alan iki sistein arasındaki korunmuş LGYSG dizisi ile etkileşim göstermektedir. Bu motifte gerçekleşen mutasyonlar, A28 proteini ile olan etkileşimi ortadan kaldırmaktadır (Moss, 2016). A16-G9 alt kompleksinin, nötr pH koşullarında A56-K2 kompleksi ile etkileşime girdiği saptanmış olup, bu etkileşimin süperenfeksiyon ile hücre-hücre füzyonunu engellediği gösterilmiştir (Wagenaar vd., 2008). Buna ek olarak, A16-G9 alt kompleksinin, MV yüzeyinde bulunan viral A26 proteini ile etkileşime girdiği ve hücreye bağlanma sonrasında nötr pH koşullarında gerçekleşen füzyonu baskıladığı belirlenmiştir (Chang vd.,

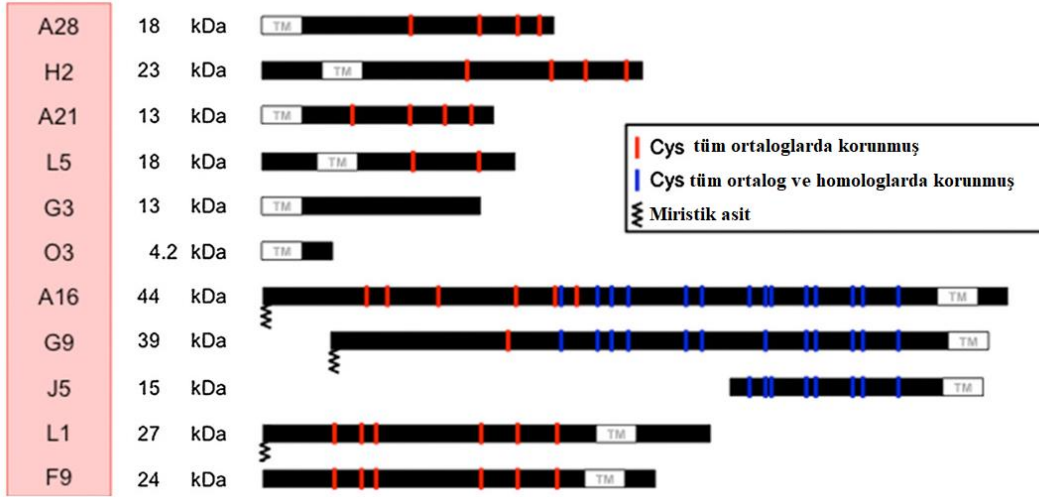
2012). EFC proteinleri arasında L1 ve A28'in, nötralize antikorların hedefleri oldukları bildirilmiştir (Nelson vd., 2008a; Wolffe vd., 1995). A28 proteininin H2 proteini ile olan etkileşimi ise immünojenitesini artıran bir faktör olarak tanımlanmıştır (Shinoda vd., 2010).



Şekil 11. EFC bileşenlerinin etkileşimleri (Moss, 2016).

A21, A28, G3, H2 ve O3 proteinleri N-ucunda TM bölgesine sahipken, A16, F9, G9, J5, L1 ve L5 ise C-ucunda TM bölgeleri taşır. EFC proteinlerinin ayrılabilir bir sinyal peptidine sahip olmaması ve normal koşullarda glikozillenmemiş olmaları onların MV membranına taşınma mekanizmasıyla ilgili soruları gündeme getirmektedir. Ayrıca A16, G9 ve L1'in miristoillenmiş olarak bulunduğu görülmüştür (Şekil 12) (Moss, 2016; Senkevich vd., 2002).

A16, G9 ve J5 olmak üzere üçü, gen duplikasyonları sonucu ortaya çıkmış, ancak düşük dizi benzerliğine sahip homolog proteinlerdir. EFC proteinlerinin 9 tanesi, sitoplazmada bulunan virüs kaynaklı üç tiyol oksidoredüktaz enzimi tarafından katalizlenen molekül içi disülfür bağları oluşturan korunmuş sistein birimlerine sahiptir (Şekil 12) (Senkevich vd., 2002). Ayrıca, 11 EFC proteininin tüm poksvirüslerde korunmuş olması, evrimsel açıdan dikkate değer bir bağa işaret etmektedir (Moss, 2016).



Şekil 12. VACV EFC protein bileşenleri (Moss, 2016). VACV EFC kompleksini oluşturan 11 proteine ait TM bölgelerinin, disülfür bağlarının ve miristil gruplarını mevcudiyeti ve yerleşimi gösterilmektedir.

EFC proteinlerinden 10'unun ve bunlardan bazılarının oluşturduğu heterodimerlerin üç boyutlu yapıları çözümlenmiştir (Şekil 11). O3, tek bir TM bölgesine sahip olması, 35 amino asitlik küçük bir protein olması, belirli çözücülerde çözünememesi ve zor kristalize olması nedeniyle üç boyutlu yapısı oluşturulamayan tek EFC proteini olarak kabul edilmektedir. Yapısı çözümlenen proteinlerin katlanma motifleri özgündür ve yalnızca çiçek virüsleri ve bunlarla ilişkili virüslerde tanımlanmıştır. EFC'nin doğal formda bir holokompleks yapıda olduğu düşünülmektedir ve bugüne kadar bütün halde izole edilememiş ve alt birimlerin mekansal organizasyonu henüz belirlenememiştir. Önceki biyokimyasal analizler, kompleksin kararlı bir çekirdek yapısının oluşumu için gerekli bileşenlere dayanarak EFC proteinlerini öz (A16, A21, A28, H2, J5, L5, G3, G9 ve O3) ve çevresel (L1 ve F9) olarak alt gruplara ayırmıştır (Yu vd., 2025).

EFC bileşenleri bireysel olarak incelendiğinde, O3 proteininin, EFC'nin en küçük proteini olduğu ve yalnızca 35 aa'dan oluştuğu belirlenmiştir (Satheshkumar ve Moss, 2009). En küçük protein olmasına rağmen O3, VACV'de EFC'nin vazgeçilmez bir bileşenidir ve muhtemelen TM bölgesi aracılığıyla diğer bileşenlerle etkileşim göstermektedir (Schin vd., 2021). O3 proteinin yokluğu, diğer EFC proteinlerinin bozulmasına veya virüs partiküllerine katılımının engellenmesine yol açmaz ancak O3 eksikliği olan örneklerde EFC'nin oluştuğu ana kompleks olarak işlevini yapamadığı bu nedenle eksik olan O3'ün hücre girişinde rol aldığı anlaşılmıştır. Bu nedenle O3 eksikliği olan virüs parçacıklarının hücre girişinin önlendiği düşünülmektedir (Satheshkumar ve Moss, 2009). O3 delesyonu mutantı hazırlanan bir çalışmada yapılan plak deneyinde ilk pasajlarda

nerdeyse hiç plak görülmezken yapılan sonraki pasajlarda plakların görüldüğü yani EFC kompleksinin oluştuğu düşünülmüştür. Yapılan analizler sonucunda ise L5 ve F9 proteinlerinde çerçeve kayması gerçekleştiği görülmüştür. Bu çerçeve kaymasının virüs üzerinde adaptif bir mutasyona neden olarak virülansı artırdığı fark edilmiştir. Sonuç olarak O3'ün hidrofobik alanının işlev için yeterli olduğu ve bu nedenle EFC proteinlerinin TM alanlarıyla etkileşime girerek kompleksi bir arada tuttuğu düşünülmektedir. L5 ve F9'da gerçekleşen mutasyonların hidrofobik alanlarda bulunması, bu mutasyonların diğer proteinlerin TM alanlarıyla etkileşime girdiğini ve kısmen de olsa O3'ün yerini aldığını göstermiştir (Tak vd., 2021).

L1, miristoillenmiş bir N-ucu glisin birimine, üç intramoleküler disülfür bağı ve C-ucunda TM bölgesine sahip, 250 amino asit uzunluğunda bir membran proteindir. Ektodomaininin kristal yapısı, miristoil grubunu barındırabilecek hidrofobik bir cep oluşturan α -heliks ve β -iplikçiklerinden oluşmaktadır. Miristoil grubunun salınımının membran füzyonunu kolaylaştırabileceği öne sürülmektedir (Su vd., 2005). Oluşan bu hidrofobik cepteki mutasyonların viral aktiviteyi bozduğu fark edilmiştir. L1'in antikorlarla baskılanması enfektiviteyi neredeyse yok sayacak şekilde azalttığı bu nedenle kompleksin oluşmasından doğrudan sorumlu olmadığı düşünülmüştür (Su vd., 2007).

F9, 23,8 kDa moleküler kütleye sahip L1 proteini ile dizi ve yapısal düzeyde benzerlik gösteren, bir proteindir. Bu benzerlik, her iki proteinin atasal bir çiçek virüsünde gen kopyalanması yoluyla ortaya çıktığını düşündürmektedir (Diesterbeck vd., 2018). L1 gibi F9'un da C-ucunda bir TM bölgesi bulunmaktadır ancak L1'den farklı olarak miristoillenmiş değildir. X ışını kristalografisi ile bakıldığında, ektodomaininin 2,1 Å çözünürlüklü kristal yapısı, beş α -heliksin iki çift β -ipliğe karşı paketlenildiğini ortaya koymaktadır. Disülfür bağlarının heliksleri ve β -iplikleri kovalent olarak birbirine bağlamaktadır. F9, miristoil grubunu içeren hidrofobik bir cep içermemesine rağmen L1 ile benzer bir katlanmaya sahiptir (Diesterbeck vd., 2018). F9'a karşı geliştirilen tavşan poliklonal antikorların, *in vitro* koşullarda VACV'yi kısmen nötralize ettiği bildirilmiştir (Brown vd., 2006).

Dizi benzerlikleri temel alındığında, A16, G9 ve J5 proteinlerinin ilkel bir çiçek virüsü içerisinde ortak bir kökenden türediği düşünülmektedir (Yu vd., 2025). Tam uzunlukta ifade edilen A16 ve G9 proteinleri, kararlı bir heterodimer oluşturmaktadır (Wagenaar vd., 2008). Bu heterodimerin ektodomainlerine ait 2,7 Å çözünürlüklü kristal yapı analizi, her iki proteinin de öncelikli olarak α -heliksel bir konformasyon sergilediğini ve beş ana bağlanma bölgesine ayrılmış geniş bir arayüz boyunca hidrofobik etkileşimler ile hidrojen bağları

aracılığıyla bağlandığını göstermektedir (Yang vd., 2023). A16 ve G9'un, viral füzyon düzenleyici protein A56–K2 dimeri ile ve viral A26 proteini ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (Chang vd., 2019; Wagenaar vd., 2008). A16 veya G9'a karşı antikor üretimine dair bir rapor bulunmamaktadır (Yu vd., 2025).

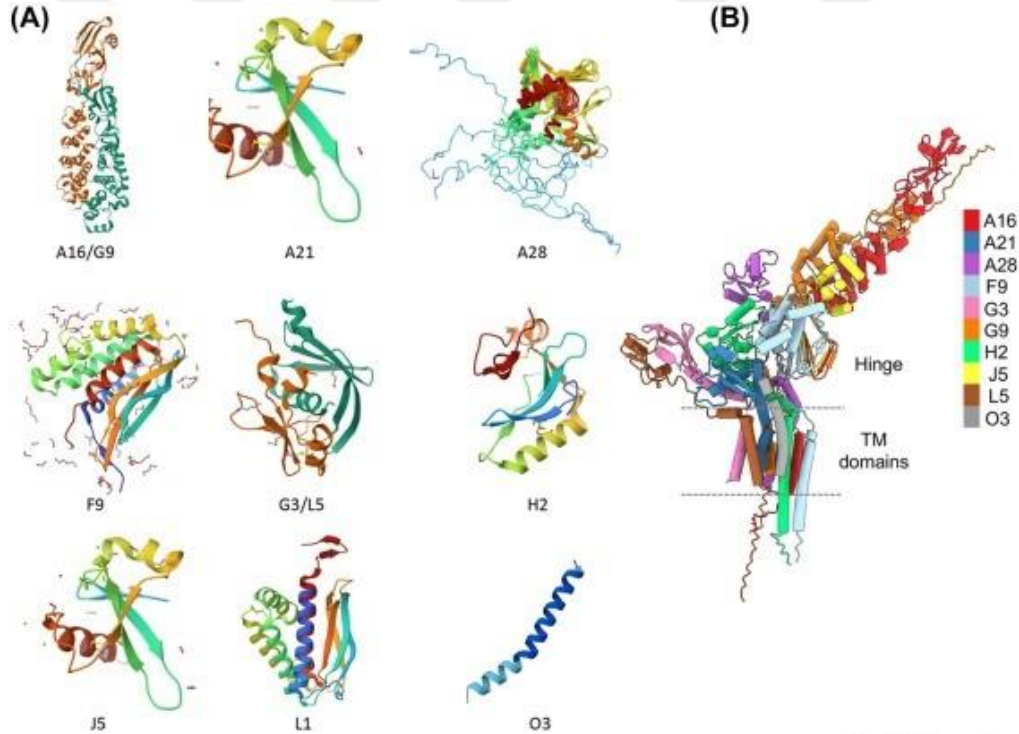
A28, 14 kDa moleküler kütleyle sahip olup H2 proteini ile kararlı bir alt kompleks oluşturmaktadır (Senkevich vd., 2005a). Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi ile belirlenen A28'in 38–146 amino asitlerini içeren kesik formunun çözelti yapısı, β -iplikçiklerinin hidrojen bağlarıyla kararlı hale getirildiği ve α -helikslerin genel yapısal kararlılığa katkı sağladığı bir α – β – α sandviç motifi ortaya koymuştur (Kao vd., 2023b). A28'in moleküler dinamik simülasyonları, H2 proteininin lipit çift tabakasında A28'in 22–55 arasındaki amino asitler ile etkileştiğini ve 59–92 ile 122–127 bölgelerindeki mutasyonların bu etkileşimi bozduğunu ortaya koymuştur (Kao vd., 2023b). A28'e karşı geliştirilen tavşan poliklonal antikorlarının nötralize edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Nelson vd., 2008a). Epitop haritalama çalışmaları, 73–92 amino asit aralığında doğrusal bir nötralizasyon epitopunun bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, H2 proteininin eş zamanlı ekspresyonu, A28 proteininin immünojenitesini artırmaktadır (Shinoda vd., 2010).

H2 proteini 189 aa'dan oluşur, dört sistein birimini içerir ve bu sisteinler, iki intramoleküler disülfür köprüsünün oluşumunu sağlar. Proteinin 1,85 Å çözünürlükte elde edilen kristal yapısı, disülfür bağlarıyla kararlı hale getirilen beş β -iplikçik ve üç α -sarmal yapı içermektedir (Kao vd., 2023a). Yüksek derecede korunan C-ucu (aa 162-182) üzerine yapılan çalışmalar, VACV enfektivitesi ile H2 proteininin A28 ile etkileşiminde kritik rol oynayan LGYSG dizisinin önemini ortaya koymuştur (Nelson, vd., 2008b). H2 proteini eksikliği bulunan VACV MV, membrana bağlanma sonrasında hemifüzyon aşamasına geçememektedir ve bu durum H2'nin füzyon sürecinin erken aşamalarında kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Kao vd., 2023a; Laliberte vd., 2011).

G3 ve L5 proteinlerinin ektodomainlerini içeren kompleksin kristal yapısı 1,81 Å çözünürlükte belirlenmiştir (S. Lin vd., 2023). L5'in yapısal kararlılığı, C75 ve C107 birimleri arasındaki korunan disülfür bağı ile sağlanmaktadır. G3 ve L5 arasında, ortopoksvirüsler arasında yüksek oranda korunan ve arayüz boyunca yerleşmiş sırasıyla 15 ve 18 amino asit birimi tanımlanmıştır. Mevcut literatürde, G3 veya L5 proteinlerine karşı gelişen antikorların nötralize edici potansiyeline dair herhangi bir veri bulunmamaktadır (Yu vd., 2025).

A21 proteini, viral giriş için gerekli olan EFC kompleksinin önemli bir bileşenidir (Townsend vd., 2005b). A21'in 24–117 amino asitlerini kapsayan ektodomaininin 2,3 Å çözünürlüklü kristal yapısı, bükülmüş bir antiparalel β -tabakası tarafından çevrelenen iki α -sarmal içerir ve kararlılığı korunmuş iki disülfür bağı ile sağlanmaktadır (Diesterbeck vd., 2025). AlphaFold2 tabanlı modelleme çalışmaları, A21 proteininin G3/L5 alt kompleksi ile etkileşime girdiğini öne sürmektedir. Bununla birlikte, anti-A21 antikollarının nötralize edici aktivitesi hakkında herhangi bir veri mevcut değildir (Yu vd., 2025).

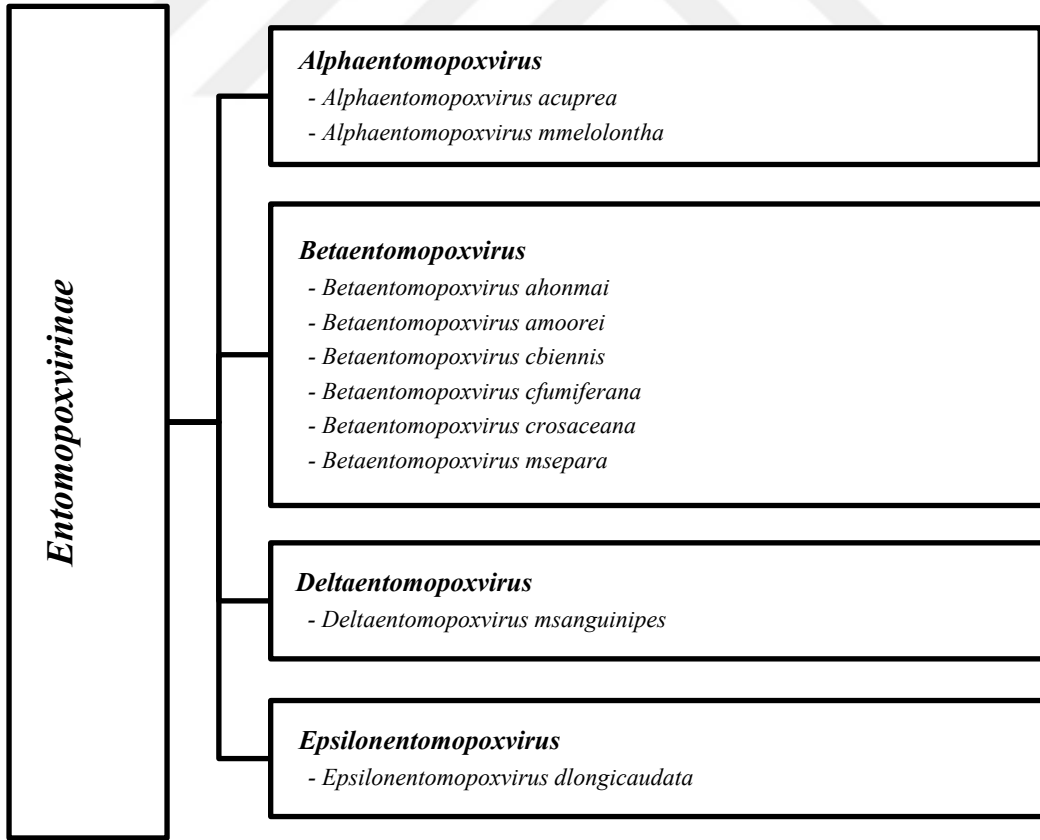
AlphaFold2 kullanılarak (Jumper vd., 2021) 11 proteinden 10'unu içeren bir model oluşturulmuştur (Şekil 13A) ve istisna, modelde F9 ile mekansal çakışma gösterdiği için L1 proteindir. Bu modelde TM bölgeler tabanda kümelenmiş olup, bu konumlanma kompleksin viral membrana tutunmasını sağlamaktadır (Şekil 13B). A16 ile G9, A28 ile H2 ve L5 ile G3'ün dış bölgelerinin öngörülen yakın yerleşimleri, bu çiftlerin kararlı heterodimerler oluşturduğunu ortaya koyan deneysel bulgularla uyumludur. Modelin arayüz analizleri, A16'nın J5 ile güçlü bir etkileşim potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir ancak bu durum deneysel olarak henüz doğrulanmamıştır (Yu vd., 2025)



Şekil 13. Giriş-füzyon kompleksi (EFC) proteinlerinin yapıları ve kompleksin bir modeli (Yu vd., 2025). (A) AlphaFold2 modellemesi ile elde edilen O3 proteini hariç, Protein Veri Bankası'ndan (PDB) temin edilen EFC proteinlerinin yapısal temsilleri. (B) EFC kompleks modeli, AlphaFold sürüm 2.3.2 kullanılarak oluşturulmuş ve ChimeraX yazılımı aracılığıyla görselleştirilmiştir.

1.4. Entomopoksvirüsler

Poxviridae ailesi, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından omurgalıları enfekte eden *Chordopoxvirinae* ve böcekleri enfekte eden *Entomopoxvirinae* olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (ICTC 2023). *Entomopoxvirinae* üyeleri başka bir deyişle Entomopoksvirüsler (EPV'ler), 1960'lı yılların başında ilk kez Vago tarafından tanımlanmıştır (Vago, 1963). EPV'ler, konak aralığı, viriyon morfolojisi, genom bilgisi ve enfekte ettikleri böcek takımlarına göre, ICTV'nin 2023'teki raporuna göre yeniden düzenlenmiş ve önceden mevcut olan *Gammaentomopoxvirus* cinsi bu alt familyadan çıkarılmıştır. Böylece, günümüzde *Alphaentomopoxvirus* (*Melolontha melolontha* EPV; konak Coleoptera), *Betaentomopoxvirus* (*Amsacta moorei* EPV; konak Lepidoptera), *Deltaentomopoxvirus* (*Melanoplus sanguinipes* EPV; konak Orthoptera) ve *Epsilonentomopoxvirus* (*Diachasmimorpha longicaudata* EPV; konak Hymenoptera) olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır (Şekil 14) (ICTC 2023).



Şekil 14. Entomopoksvirüslerin sınıflandırılması.

EPV'lerin, 165-300 nm $\times$ 150-470 nm boyutunda oval ya da tuğla biçimli viriyonlara sahip olduğu ve yaklaşık 165–380 kbp uzunluğunda, doğrusal çift sarmallı bir DNA genomu içerdikleri bilinmektedir (Mitsubishi vd., 2014; Sezen ve Demirbağ, 2005). Daha sonraki çalışmalar, bu virüslerin morfolojik açıdan omurgalıları enfekte eden virüslerle temel özellikleri paylaştıklarını, ancak böceklerle özgü olduklarını göstermiştir. Bu çalışmalar ayrıca, replikasyon döngüsünün sonunda viriyonların protein yapılı bir matriks içerisine gömülmesiyle omurgalı virüslerinden ayrıldıklarını ortaya koymuştur (Hernández-Crespo vd., 2000). “Sferoid” olarak adlandırılan bu yapı, sahip olduğu morfoloji, içerisine yerleşmiş viriyonlar ve ultraviyole ışınları ile yüksek sıcaklığa karşı sağladığı koruma özellikleri ile dikkat çekmektedir (Arif, 1995; Sezen ve Demirbağ, 2005). Sferoid yapısı, EPV'lerin enfeksiyon mekanizmasının araştırıldığı çalışmalarda bulunmuştur. Bu yapı bakülovirüslerdeki gibi virüslerin içine gömüldüğü bir yapı halinde bulunmaktadır (İnan, 2016). Enfekte hücrelerde sferoidlerin hücre sitoplazmasında oval bir şekilde bulunması EPV'lerin en karakteristik özelliklerindendir (Arif ve Kurstak, 1991; Sezen ve Demirbağ, 2005).

EPV'lerin bulaşıcı döngüsü, böcek konak tarafından sferüllerin yutulması, orta bağırsak sıvısının alkali indirgeyici koşulları tarafından çözünmesi ve orta bağırsak lümeninde virionların salınmasıyla başlar. Enfektif partiküller önce böcek orta bağırsak epitel hücrelerinde çoğalır, ardından bağırsak bariyerini geçerek iç dokulara, özellikle de yağ hücrelerine yerleşir (King vd., 1998). Sferoidinin viral replikasyon için gerekli olmadığı gösterilmiş olsa da (Palmer vd., 1995), bu yapı virionları olumsuz çevre koşullarından (örneğin UV bozulması) koruyarak ve böylece iletim etkinliğini iyileştirerek virüsün doğal biyolojik döngüsünde önemli bir rol oynar. Bu açıdan, sferoidinler işlevsel olarak bakülovirüslerin veya sipovirüslerin polihedrinlerine benzer (Hernández-Crespo vd., 2000).

Asya ve Kuzey Amerika’da yürütülen saha çalışmaları neticesinde birden fazla böcek türünün larvalarında EPV'lerin enfeksiyon oluşturabildiği fark edildi. EPV'ler yavaş seyirli patojenlerdir ve salgın hastalıklar aracılığıyla zararlı popülasyonlarının büyüme hızını azaltmada daha uygun oldukları düşünülmektedir. Hızlı ve yavaş öldürme stratejilerinin birlikte uygulanmasının, zararlı kontrolünde etkinliği artırarak kimyasal insektisit ihtiyacını azaltabileceği öne sürülmüştür (Takatsuka vd., 2010). Bu nedenle EPV'lerin öncelikle mikrobiyal biyokontrol ajanı olarak taşıdıkları potansiyel sebebiyle incelenmiştir. Bunun yanı sıra çoğalması için çok sayıda gene ihtiyaç olmaması ve genomunun büyük olması sebebiyle gen ekspresyon vektörü olarak taşıdığı potansiyel ile dikkat çekmiştir. EPV'lerin

konak aralığının korpopoksvirüslere oranla sınırlı olması ve omurgalıları enfekte etmemesi, bunlar üzerinde sınırlı çalışmalar yapılmasının sebebidir. Bu sebep aynı zamanda EPV'lerin neden çalışılması gerektiğini de göstermektedir. Mevcut EPV verilerin yetersizliği birçok çalışmayı engellemektedir. Bu virüslerin biyolojik kontrol ajanı olarak daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için hem viral genom yapıları hakkında hem de virüs konak etkileşimlerine dair daha kapsamlı verilere ihtiyaç duyulmaktadır (Arif, 1995; Osborne vd., 1997).

1.5. *Amsacta moorei entomopoxvirus*

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV), *Betaentomopoxvirus* cinsinin tip türüdür ve adını doğal konağı olan *Amsacta moorei*'den izole edilerek almıştır (Hall ve Hink, 1990). AMEV, sadece Lepidopteranları enfekte etmektedir (Bawden vd., 2000). *Estigmene acrea* (Tuz Bataklığı Güvesi) ve *Lymantria dispar* (Çingene Güvesi) konakları olarak örnek verilebilir (Marlow vd., 1993; Winter vd., 1995). Bu böceklerin tarımsal açıdan zararlı oldukları bilinmektedir.

AMEV enfeksiyonu, böcek konaklarda ekstrasellüler virüs partiküllerinin oral yolla alınmasıyla başlar. Böceğin alkali pH'a sahip orta bağırsağında, virüsün bulunduğu inklüzyon cisimciklerinin çözünmesiyle enfeksiyon süreci tetiklenir. AMEV'nin larvalarda oluşturduğu enfeksiyon, konak gelişim evresine bağlı bir özellik göstermektedir. Bununla birlikte, larvaların yağ dokusu, hemositleri, sinir hücreleri, orta bağırsak epiteli, hipodermis, trakeoblastlar ve kas hücreleri gibi çok sayıda hücre tipi ve doku, viral replikasyona duyarlıdır (Bawden vd., 2000). Enfekte larvalarda ise orta bağırsakta inklüzyon cisimcikleri içinde sferoidin yapıları gömülü olarak bulunmaktadır (Becker vd., 2004). Virüslerin çevreye yayılması, böceğin dışkı atılımı ve larvaların öldükten sonra parçalanması ile gerçekleşmektedir (Williams vd., 2017).

Bawden ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan çalışmalarda AMEV'in tüm genom analizi yapılmıştır. Yapılan çalışmada genomunun 232,392 bp olduğu anlaşılmıştır. Genomunda 294 ORF (açık okuma çerçevesi) içerdiği ve bunlardan 256 ORF'nin fonksiyonel olarak protein kodladığı tespit edilmiştir. Guo ve Yu tarafından yapılan biyoinformatik analiz sonucunda bu ORF'lerin sayısı 256 olarak yeniden güncellenmiştir (Guo ve Yu, 2007).

AMEV, tarımsal açıdan yüksek derecede öneme sahip zararlıları enfekte ettiği için biyopestisit veya aynı zamanda mikrobiyolojik kontrol ajanı olarak böceklerle karşı

kullanılabilirliği ile ve gen terapi ve gen ifade vektörü olarak önemli bir potansiyel biyoteknolojik araç olarak öne çıkmaktadır (Sezen ve Demirbağ, 2005; Özşahin vd., 2015).

Bu virüs, birçok entomopoksvirüsün aksine, *Lymantria dispar* (Ld652) (Winter vd., 1995) ve *Estigmene acrea* (EAA-BTI) (Granados ve Naughton, 1975; Marlow vd., 1993) hücre kültürlerine kolaylıkla adapte olabilmekte ve bu sistemlerde rekombinant virüslerin elde edilmesi görece basit bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Inan vd., 2018). Bu nedenle poksvirüslerin böcek hücre kültüründe patojenitesini ve moleküler özelliklerini araştırmak için AMEV, EPV'ler arasında en çok çalışılan virüstür (Becker vd., 2004).

Vaksinya virüsler üzerinde yapılan çalışmalar ışığında, poksvirüslerin konak hücreye girerken giriş-füzyon kompleksi (EFC) oluşturduğu ve poksvirüslerde homologları bulunan tutunma ve girişte görevli 11 viral proteinin belirlendiği önceki bölümlerde açıklanmıştı. Bir entomopoksvirüs olan AMEV için yapılan DNA dizileme ve biyoinformatik analizler sonucunda, AMEV'de sadece 9 genin ürününün, VACV EFC proteinleriyle biyoinformatik benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Böylece AMEV genomundaki *AMV035*, *AMV083*, *AMV118*, *AMV127*, *AMV186*, *AMV217*, *AMV232*, *AMV243* ve *AMV249* kodlu ORF'lerin ürünlerinin, AMEV'de konağa girişte görevli oldukları ve EFC oluşumunda rol aldıkları önerilmiştir (Thézé vd., 2013). Bu genlerden *AMV035* EFC bileşeni (G9R), *AMV083* EFC bileşeni (L5R), *AMV118* EFC için gerekli olan miristile protein (A16L), *AMV127* EFC temel bileşeni (H2R), *AMV186* EFC IMV MP/virüs girişi (A28L), *AMV217* EFC IMV membran proteini (L1R), *AMV243* EFC S-S bağ oluşumu yolu protein substratı (F9L) ve *AMV249* EFC IMV membran protein (A21L) olarak konak hücreye girişte görevli oldukları düşünülmektedir (Moss, 2012). VACV'den elde edilen bilgilere dayanarak bu dokuz proteinin birleşerek AMEV EFC'yi oluşturduğu düşünülmektedir ancak literatürde AMEV EFC bileşenleri hakkındaki bu bilgi doğrulanmamıştır.

1.6. RNA Susturması

Transkripsiyon sonrası gen susturma olgusu ilk kez 1990 yılında petunyada tanımlanmıştır. Mor pigment sentezinden sorumlu gen promotör kontrolü altında bitkiye aktarıldığında, beklenenin aksine beyaz çiçeklerin olduğu gözlenmiş ve bu durum eş-baskılama (co-supresyon) olarak adlandırılmıştır (Napoli vd., 1990). RNA susturması (RNAi) mekanizması ise ilk kez 1998'de nematod türü *Caenorhabditis elegans* üzerinde ortaya konmuştur. Andrew Fire ve Craig Mello, RNAi'nin keşfi nedeniyle 2006 yılında

Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülüne layık görülmüşlerdir. Araştırmacılar, çift sarmallı RNA'nın hücreye girdikten sonra tamamlayıcı RNA dizilerini özgün biçimde hedefleyerek mRNA yıkımına yol açtığını ortaya koymuşlardır (Fire vd., 1998). Bu bulgu, temel hücresel süreçlerde gen düzenlenmesine ilişkin yeni bir mekanizmayı açıklığa kavuşturmuş ve biyomedikal araştırmalarda küçük müdahaleci RNA (siRNA) uygulamalarına yönelik ilgiyi artırmıştır (Şalva, 2009). Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, bu etkili gen susturma mekanizmasının birçok farklı organizmada başarıyla gösterildiğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında mantarlar (*Neurospora* sp.), bitkiler (*Nicotiana* sp., *Petunia* sp., *Arabidopsis* sp.), omurgasızlar (*Drosophila* sp., *C. elegans*, *Paramecium* sp., *Trypanosoma* sp.) yer almaktadır ve söz konusu mekanizma günümüzde memeli sistemlerine de uygulanabilir hale gelmiştir (Karagüzel vd., 2007). Örneğin memelilerde dizilimlerde yüksek özgüllük gösteren RNAi, hedef genlerin susturulmasına olanak tanıyarak kanser, viral enfeksiyonlar, maküler dejenerasyon ve Huntington hastalığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve gen fonksiyonlarının incelenmesinde önemli bir potansiyel sunmaktadır (Blagbrough ve Zara, 2009).

Canlıların doğal bir savunma mekanizması olan RNAi, çift sarmallı RNA'nın hücreye girmesiyle birlikte, hedef mRNA'ya tamamlayıcı olarak bağlanarak homolog mRNA dizisinin parçalanmasına yol açan bir transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır (Grunweller ve Hartmann, 2005; Leung ve Whittaker, 2005; Milhavet vd., 2003; Şalva, 2009). RNAi, zararlılarda hayati öneme sahip genleri seçici biçimde susturarak zararlı istilalarının kontrolünde yüksek özgüllük, çevresel uyumluluk ve potansiyel olarak kalıcı etki sağlayan yenilikçi bir çözüm sunmaktadır. Bu yöntem, hedef dışı organizmalar üzerindeki olası etkileri en aza indirirken kimyasal pestisit kullanımını azaltmakta ve böylece çevre ile insan sağlığına yönelik riskleri hafifletmektedir. Ayrıca RNAi tabanlı stratejiler, direnç gelişimine karşı daha dayanıklı biyopestisitlerin ve transgenik bitkilerin geliştirilmesine olanak tanımakta bu da sürdürülebilir ve verimliliği yüksek tarımsal üretim sistemlerinin oluşturulmasına katkı sağlamaktadır (Duanmu vd., 2025).

RNAi, gen ekspresyonunu siRNA'ların aracılık ettiği transkripsiyonel gen susturması (TGS) ve posttranskripsiyonel gen susturması (PTGS) olan iki temel mekanizma ile baskılamaktadır. PTGS, siRNA'ların mRNA'yı hedeflemesiyle gerçekleşir ve hem sitoplazmada hem de çekirdekte işlev gösterebilir. RNAi yolak bileşenlerinin, yalnızca transkripsiyon sonrası süreçlerde değil, transkripsiyon öncesi genom düzenlenmesinde de rol oynadığı bilinmektedir. TGS'de ise gen fonksiyonunun uzun süreli baskılanması, siRNA

tarafından yönlendirilen kromatin modifikasyonları aracılığıyla sağlanır. RNA ile indüklenen transkripsiyonel gen susturması sırasında Argonat ve diğer düzenleyici proteinler histonlar üzerinde etkili olarak heterokromatin oluşumunu tetikler; bunun sonucunda transkripsiyon engellenir ve ilgili genlerin ekspresyonu durdurulur (Morris, 2006; Şalva, 2009).

İnsanda yaklaşık 250 genin dsRNA ve miRNA ekspresyonu yaptığı bilinmektedir. RNA susturmasında kritik unsur, hedef mRNA üzerinde doğru 21 nükleotid uzunluğunda bir tamamlayıcı dizinin bulunmasıdır. Bu süreç iki temel aşamada gerçekleşmektedir: İlk aşamada uzun dsRNA molekülleri, 21–23 nükleotid uzunluğunda küçük RNA parçalarına ayrıştırılır. İkinci aşamada ise bu küçük RNA'lar hedef mRNA'yı tanıyarak onun yıkımını sağlar (Karagüzel vd., 2007).

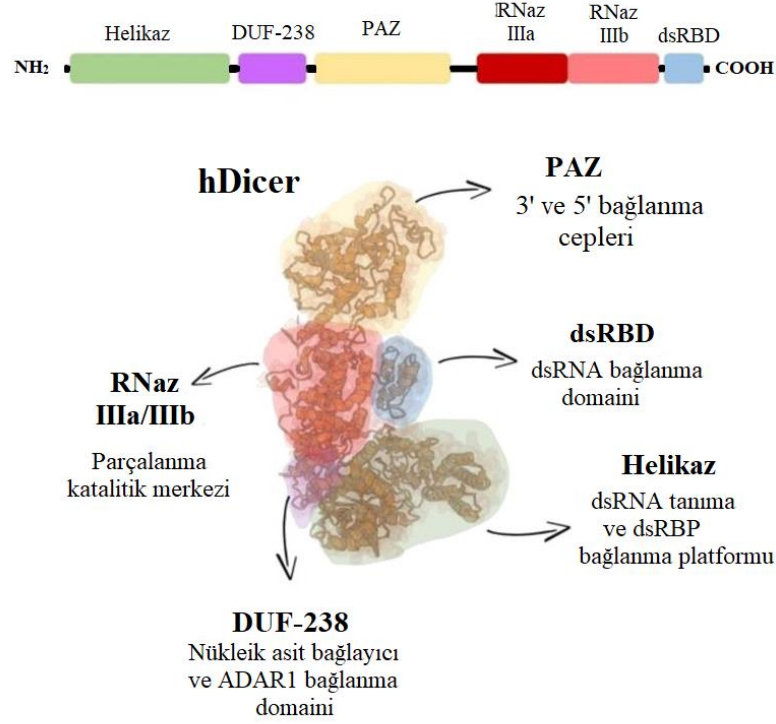
1.6.1. RNAi Bileşenleri

Drosophila sp. (Meyve sineği) üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, RNaz III ailesine ait bir enzim olan Dicer proteininin ve RISC (RNA-Induced Silencing Complex; RNA aracılı susturma kompleksi) olarak adlandırılan nükleaz aktivitesine sahip çoklu protein kompleksinin RNA susturmasında iki temel bileşen olduğunu ortaya koymuştur (Akashi vd., 2001; Elbashir vd., 2001).

a. Dicer Enzimi

dsRNA'nın siRNA'lara parçalanması, ATP'ye bağımlı bir nükleaz tarafından katalizlenir. Bu enzim, RNaz III ailesine ait nükleaz ya da Dicer olarak adlandırılmaktadır. Dicer, RNaz III enzimlerinin dördüncü sınıfına ait, çok alanlı bir endonükleazdır. Omurgalılarda ve *Caenorhabditis elegans*'ta tek bir gen tarafından kodlanırken, diğer türlerde birden fazla paraloğu bulunabilir. Örneğin, *D. melanogaster*'da iki Dicer paraloğu mevcutken, *Arabidopsis thaliana*'da dört paralog tanımlanmıştır (Paturi ve Deshmukh, 2021). İnsanlarda DICER, 14. kromozom üzerinde yer alan ve yaklaşık 72 kbp uzunluğunda 29 ekzon içeren *DICER1* geni tarafından kodlanmaktadır. İnsan DICER proteini (hDICER), 1922 amino asitten oluşmakta (~220 kDa) ve RNaz III ailesinin en büyük ve en karmaşık üyesi olarak kabul edilmektedir (Zhang vd., 2004). Son dönemde Liu ve arkadaşları (2018) tarafından yürütülen bir çalışmada, hDICER proteininin üç boyutlu yapısı kriyo-EM kullanılarak çözülmüştür. Protein yapısının, N-ucunda bir helikaz alanı, DUF283 alanı,

platform-PAZ-bağlayıcı heliks alanı, iki RNaz III alanı (RNaz IIIa ve RNaz IIIb) ve C-ucunda çift sarmallı RNA bağlayıcı alan (dsRBD) içeren L-şeklinde bir molekül olduğu ortaya konmuştur (Şekil 15) (Liu vd., 2018).



Şekil 15. Dicer enziminin yapısı (Burley vd., 2021; Liu vd., 2018; Sehnal vd., 2021; Vergani-Junior vd., 2021).

DICER'in helikaz alanının, yapısal olarak HEL1, HEL2i ve HEL2 alt birimlerinden oluştuğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2018). DExD/H-kutusu (Asp-Glu-x-Asp; Aspartik asit, Glutamik asit, herhangi bir amino asit, Aspartik asit/Histidin) ve RIG-I benzeri alt birimlerin, helikaz ailelerinde korunduğu tespit edilmiştir. DExD/H-kutusu helikazları, RNA veya DNA duplekslerinin çözülmesinden sorumlu iken, RIG-I benzeri helikazlar, bu nükleik asitler üzerinde translokasyonları gerçekleştirir (Byrd, 2012). HEL1, DUF283 ve RNaz IIIb alanlarıyla etkileşerek molekülün "L" şeklindeki uzun ve kısa kollarını birbirine bağlarken, kısa kolun ucunda yer alan HEL2 ise iki alt alan arasında C-şekilli bir düzenleme oluşturur (Liu vd., 2018). Helikaz alanı, dsRNA uç yapılarına bağlı olarak pre-siRNA'ları ve pre-miRNA'ları ayırt etmektedir. *D. melanogaster* ve *C. elegans* Dicer proteini, kut uçlu dsRNA'ları ATP'ye bağımlı bir şekilde keserken, 3' uzantılı pre-miRNA'lar için ATP gerekli değildir (Welker vd., 2011; Sinha vd., 2018). Buna karşılık, omurgalı DICER helikaz alanları

ATP'den bağımsızdır ve substrat ayrımı, pre-miRNA'ların apikal halkasıyla etkileşime dayanır (Zhang, 2002; Vergani-Junior vd., 2021). Ayrıca helikaz alanı, çift sarmallı RNA bağlayıcı proteinlerin (dsRBP) etkileşimi için bir platform işlevi görür (Lee vd., 2006).

DICER proteininin DUF283 alanı, yapısal olarak dsRBP'lere benzemesine rağmen işlevi tam olarak bilinmemektedir. DUF283, dsRNA'ya değil, tek zincirli nükleik asitlere bağlanır ve DNA veya RNA tamamlayıcı zincirleri arasındaki hibridizasyonu kolaylaştırır (Kurzynska-Kokorniak vd., 2016). DUF283'ü silinmiş hDICER, dsRNA'ya bağlanmayı artırsa da kesme verimliliği azalmış ancak yine de pre-miRNA substratlarını yaban tip protein kadar etkili şekilde bağlayıp işleyebilmiştir (Ma vd., 2008).

PAZ (Piwi/Ago/Zwille) alanı, DICER ve AGO proteinlerinde bulunan, tek zincirli nükleik asitlerin bağlanmasında görevli ve oldukça korunmuş bir yapıdır. PAZ, RNA substratlarının 3' uzantısını hidrojen bağlarıyla tutan bir 3' bağlanma cebine ve AGO proteininde ise 5' fosfat ucunu barındıran bir fosfat bağlanma cebine sahiptir (Song vd., 2003; Tian vd., 2014). PAZ alanı eksik hDICER, pre-miRNA veya dsRNA substratlarını işleyemez; ancak kısa tek zincirli RNA ve DNA'lar üzerinde RNaz ve DNaz aktivitesini sürdürebilir. Bu durum, PAZ yokluğunda standart dışı ürünlerin oluşabileceği fikrini düşündürmektedir (Wojnicka vd., 2020).

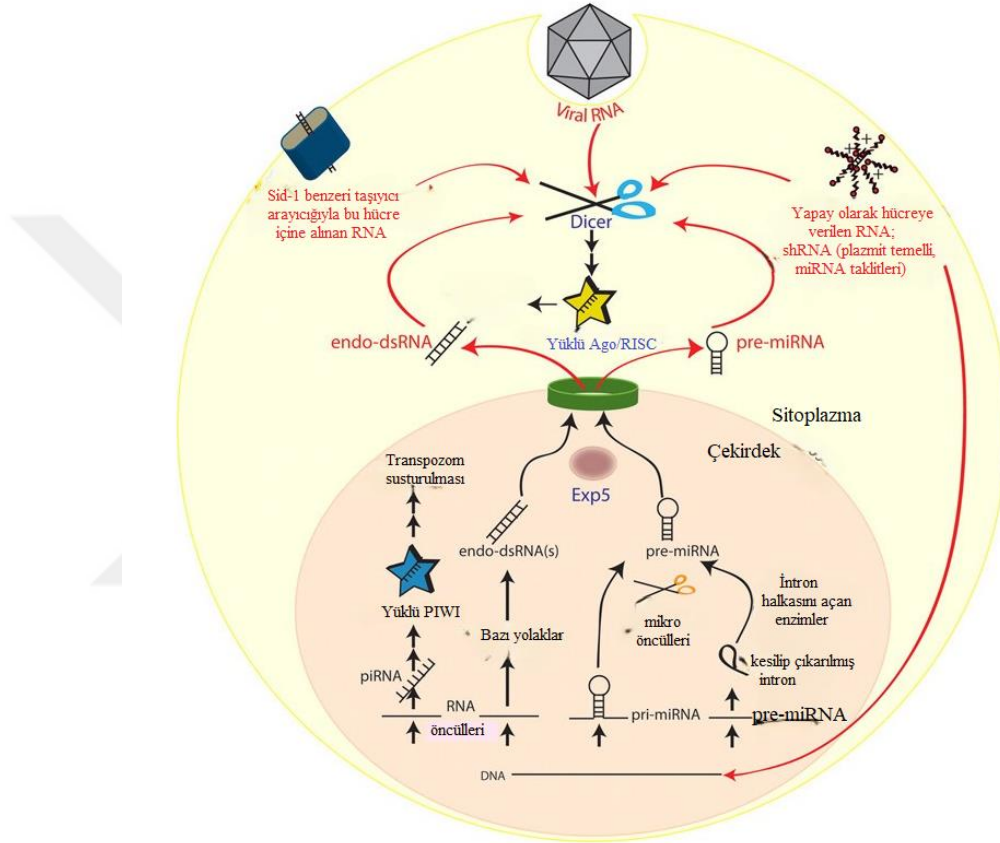
DICER, RNaz IIIa ve RNaz IIIb olmak üzere iki RNaz alanına sahiptir. Bu alanlar dimer oluşturarak katalitik çekirdeği meydana getirir ve dsRNA'yı 18–24 bp uzunluğunda, 2 nükleotidlik 3' uzantılı küçük RNA parçalarına işler (Zhang vd., 2004; MacRae vd., 2006).

dsRBD, karakteristik $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ sekonder yapısına sahip 65–70 amino asitlik bir bağlanma alanıdır ve temel görevi dsRNA'ya bağlanmaktır (Masliah vd., 2012). PAZ alanı yokluğunda RNA bağlanmasını sağlar ve silinmesi, küt uçlu dsRNA işlenmesini azaltarak hDICER'in 3' uzantıya bağımlılığını artırır (Ma vd., 2012; Zhang vd., 2004). Ayrıca dsRBD'deki nükleer lokalizasyon sinyali, DICER'in çekirdekteki standart dışı ürünlerin işlevlerini destekler (Pong ve Gullerova, 2018).

b. RNA Aracılı Susturma Kompleksi

RISC (RNA Aracılı Susturma Kompleksi), yaklaşık 500 kDa büyüklüğünde, nükleaz aktivitesi bulunan çoklu proteinli RNA kompleksidir. Yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzim aktivitesi gösteren bölgeler içerir (Karagüzel vd., 2007). Ökaryotik hücrelerde RISC programlaması, sitoplazmada ortaya çıkan dsRNA ile tetiklenir (Şekil 16).

dsRNA, küçük düzenleyici RNA'lara (20–30 nükleotid) işlenir ve bunlar RISC'i tamamlayıcı RNA hedeflerine yönlendirilir. Yönlendirilen RISC, hedeflenen genleri farklı mekanizmalar ile susturabilir. Bu mekanizmalar ile programlandıktan sonra RISC, hedef genleri protein sentezini baskılayarak, mRNA bozunumu yoluyla veya heterokromatin oluşumu/DNA eliminasyonu ile susturabilir (Pratt ve MacRae, 2009).



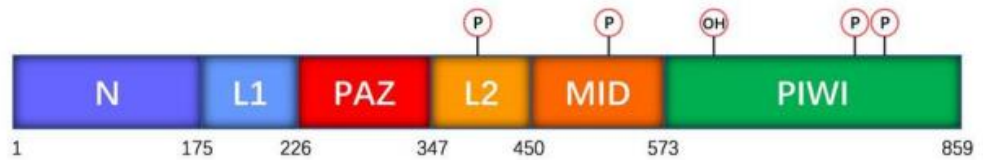
Şekil 16. RISC ve diğer susturma komplekslerinin oluşumu (Pratt ve MacRae, 2009). RISC ve diğer susturma komplekslerinin oluşumu, hücre tipine ve organizmaya bağlı olarak ekzojen veya endojen kaynaklı RNA ile başlar. RNA, siRNA veya plazmit tabanlı kısa saç tokası RNA (shRNA) sistemleriyle yapay olarak da sağlanabilir. Genomdan transkribe edilen RNA'lar, piRNA'larda olduğu gibi çekirdekte tutulabilir veya miRNA'larda olduğu gibi sitoplazmaya aktarılabilir. Sitoplazmada dsRNA, Dicer tarafından işlenir ve Argonat proteinine yüklenir. Kesilecek iplikçik seçimi tamamlandıktan sonra oluşan RISC, hedef genleri susturacak şekilde aktifleşir.

RISC kompleksleri gen ifadesini farklı mekanizmalarla düzenlese de iki temel mekanizma hepsinde ortaktır. İlk mekanizma, küçük düzenleyici RNA'ya (sRNA'ya) bağlanan bir Argonat (AGO) proteini içerirken ikincisinde ise sRNA, Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla RISC'yi hedef transkripte yönlendirir. AGO proteini, sRNA'yı bağlayarak hedef tanınmasını kolaylaştırır. Ayrıca bu proteinin hedef RNA'yı doğrudan kesebildiği ya

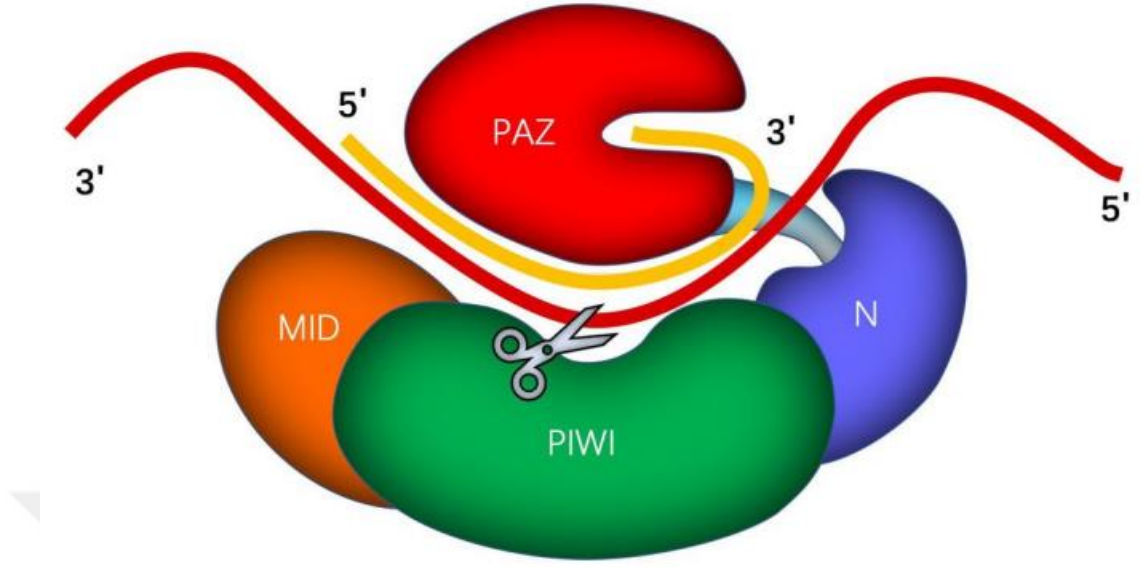
da gen susturma ile ilişkili diğer proteinleri bölgeye entegre edebildiği düşünülmektedir (Pratt ve MacRae, 2009).

Ökaryotik AGO proteinleri, yapısal olarak korunmuş dört alandan oluşmaktadır. Bunlar N-ucu, PAZ, MID ve PIWI alanlarıdır (Şekil 17) (Faehnle ve Joshua-Tor, 2010). Şekil 17 de insanda buluna AGO proteinin yapısı gösterilmektedir. Bu yapıda susturma işleminin kararlılığını sağlayarak aktivitesini artırmak ve sRNA'nın bağlanmasını destekleyen hidroksilasyon ve fosforilasyon bölgeleri işaretlenerek gösterilmiştir. Ago'nun temel yapısı genellikle hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde 700 ile 1200 aauzunluğunda olduğu bilinmektedir. AGO proteinlerinin sRNA temelli gen susturma sistemlerinin esansiyel unsurlarıdır. Söz konusu bu proteinler, miRNA biyogenezi ile mRNA'nın translasyonu ve yıkımını gibi mekanizmaları düzenlemektedir. Ayrıca konağın yabancı nükleik asitlere karşı geliştirdiği savunma mekanizmasında rol oynamanın yanı sıra genom düzenleme yollarına ve üstelik hastalık gelişiminde rol almaktadır (Wei vd., 2022).

N-ucu, MID ve PIWI alanları hilal benzeri bir oluk yapısı meydana getirir ve PAZ bu yapının tepe noktasında yer alır. PAZ, L1 ve L2 bağlayıcı bölgeler aracılığıyla N-ucuna ve MID'e bağlanırken, sRNA bağlandığında yapıda yeniden düzenlemeler gerçekleşir (Mallory ve Vaucheret, 2010). N-ucu bölgesi değişkenlik gösterir ve RNA duplekslerinin çözülmesinde, kesme süreçlerinde ve RISC montajında rol oynar. Yaklaşık 130 aa uzunluğundaki PAZ alanı, sRNA'ların veya siRNA'ların 3' uçlarını tanır ve bağlayarak bozunmaya karşı korur. MID alanı 5' ucundan nükleotidlere bağlanan bir cep yapısı içerirken, PIWI alanı RNaz H-benzeri aktiviteye sahip olup katalitik merkezindeki DEDH/D (Asp-Glu-Asp-His/Asp) motifinin metal iyonlarıyla koordinasyonu sayesinde hedef RNA kesimini gerçekleştirir (Şekil 18). Ancak tüm AGO proteinleri katalitik olarak aktif değildir (Wei vd., 2022; Wu vd., 2020).



Şekil 17. İnsan Argonat 2 (AGO2) proteininin alan organizasyonu (Wei vd., 2022). N, L1, PAZ, L2, MID ve PIWI bölgeleri gösterilmiştir. N: N-terminal domain, L1: Bağlayıcı 1 (linker 1).



Şekil 18. Ökaryotik AGO kompleksi ve siRNA'ya bağlanması (Wei vd., 2022). N ucu, PAZ, MID ve PIWI, AGO proteinlerinin dört alanıdır.

Prokaryotik Argonat (pAGO) proteinleri, filogenetik ağaçtaki konumlarına göre kısa ve uzun olmak üzere iki forma ayrılmaktadır. Uzun formu pAGO'ların ökaryotik AGO'larla benzer alanlara sahip olduğu ancak kısa formu pAGO'ların sadece PIWI ve MID alanlarını içerdiği görülmüştür. Ökaryotik ve prokaryotik AGO'lar da siRNA bağlanması, hedef RNA'nın tanınması, kesilmesi ve salınması gibi katalitik işlevleri yürütmektedir (Müller vd., 2020; Wu vd., 2020). PAZ ve PIWI alanlarının yapısı önce filogenetik dizilim, ardından üç boyutlu analizlerle aydınlatılmıştır (Höck ve Meister, 2008; Meister, 2013).

c. Küçük RNA'lar

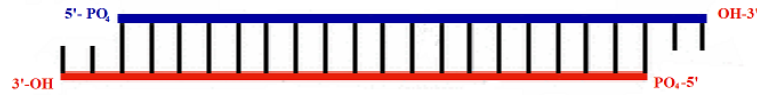
siRNA'lar (siRNA, miRNA, piRNA ve agotronlar), hücre çoğalması, farklılaşması ve homeostazın düzenlenmesinde kritik roller üstlenmektedir. Bu süreçte AGO protein ailesi merkezi bir konuma sahiptir. AGO proteinleri, çekirdekte histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, pre-mRNA'nın alternatif eklenmesi ve çift zincirli DNA onarımı yoluyla kromatin yeniden şekillenmesine katkıda bulunur (Wei vd., 2022).

siRNA'lar ve miRNA'lar, fizikokimyasal özellikleri bakımından benzer olmakla birlikte, farklı biyolojik işlevler üstlenmektedir (Tablo 1). Her ikisi de mRNA'ları hedefleyen kısa RNA dupleksleri iken gen susturma etkisinde mekanizmaları farklıdır (Lam vd., 2015).

Tablo 1. siRNA ve miRNA'ların farkları (Lam vd., 2015)

Özellikler	siRNA	miRNA
Dicer işlenmesinden önce yapısı	Çift sarmallı RNA içerir, 30 ile 100'den fazla nükleotid	70-100 nükleotid içeren, aralara serpiştirilmiş uyumsuzluklar ve saç tokası yapısı içeren öncül miRNA (pre-miRNA)
Yapısı	2 nükleotidlik 3' uzantılı 21-23 nükleotidlik RNA duplexi	2 nükleotidlik 3' uzantılı 19-25 nükleotidlik RNA duplexi
mRNA tamamlayıcılığı	Tamamen	Kısmen tamamlayıcıdır, tipik olarak mRNA'nın 3' translyasyona uğramayan bölgeyi hedef alır
mRNA hedefi sayısı	Bir	Çoklu (aynı anda 100'den fazla olabilir)
Gen düzenleme mekanizması	mRNA'nın endonükleolitik kesilmesi	Translyasyonel baskılama mRNA'nın degradasyonu mRNA'nın endonükleolitik kesilmesi (nadirdir, yalnızca miRNA ile mRNA arasında yüksek düzeyde tamamlayıcılık olduğunda)
Klinik uygulamalar	Terapötik ajan	İlaç hedefi Terapötik ajan Teşhis ve biyobelirteç aracı

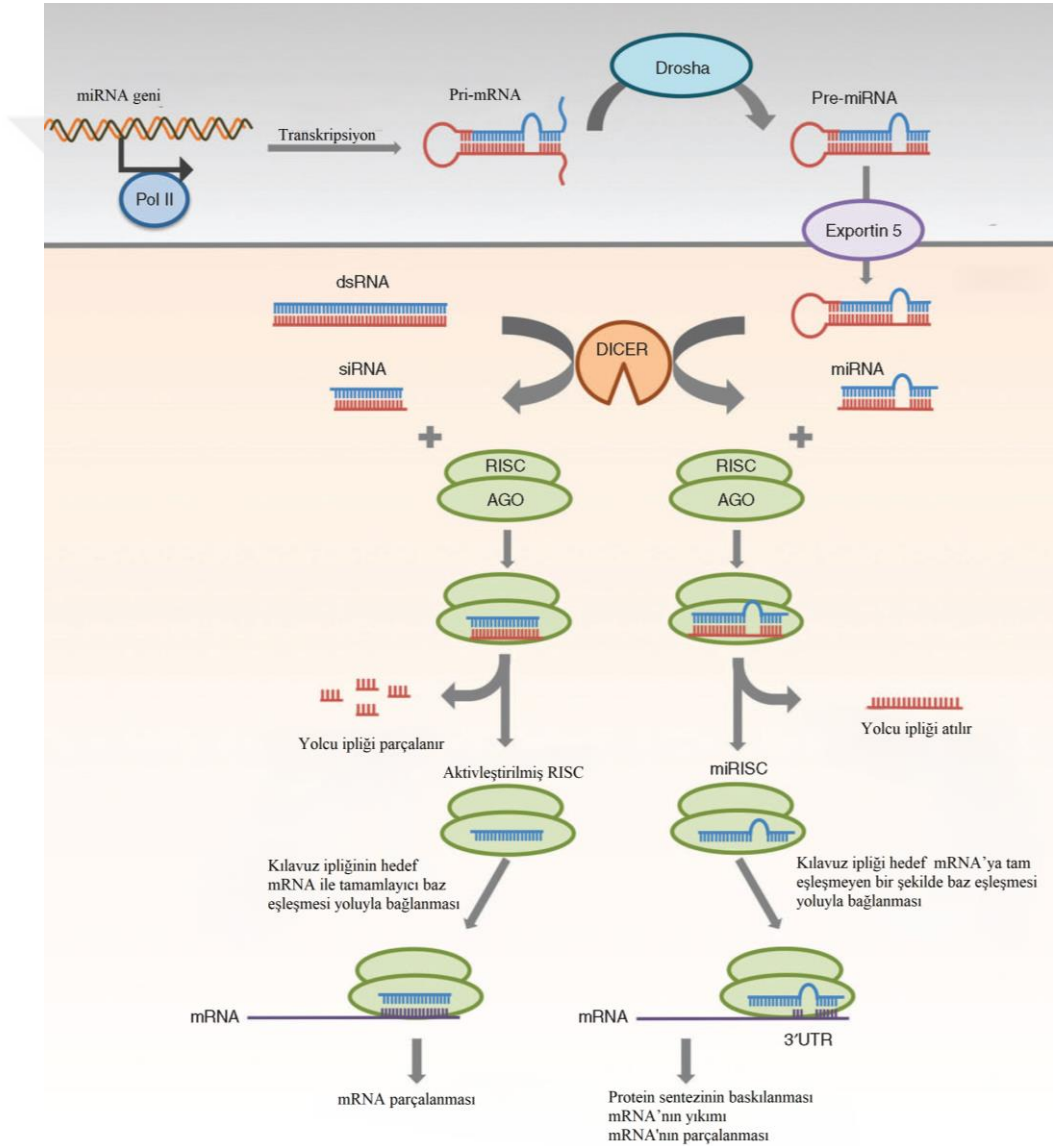
mRNA'nın yıkımı için siRNA'lar rehber görevi görmektedirler (Agrawal vd., 2003). dsRNA'lar 5' fosfat ve 3' hidroksil uçlara sahiptir. Nükleaz aktivitesi bulunan Dicer enzimiyle 3' hidroksil uçlarında 2–3 nükleotidlik uzantılar bulunan 21-23 nükleotid uzunluğunda siRNA'lara parçalanmaktadır (Şekil 19) (Elbashir vd., 2001; Zamore vd., 2000). siRNA'nın bu yapısal özellikleri, RISC kompleksine bağlanması ve RNAi mekanizmasının ilerleyen basamakları açısından kritik öneme sahiptir (Hannon, 2002; Szweykowska-Kulińska vd., 2003). Nitekim antisens zincirin 5' ucunda gerçekleştirilen modifikasyonlar siRNA'nın aktivitesini inhibe ederken, küt uçlu siRNA'lar mekanizmanın sonraki aşamalarında oldukça düşük etkinlik göstermektedir (Szweykowska-Kulińska vd., 2003).



Şekil 19. siRNA'nın yapısı

siRNA'lar, RISC kompleksinin oluşumu için AGO proteinlerine bağlanır (Mallory ve Vaucheret, 2010). Oysa miRNA'lar hedef genin mRNA'larının ekspresyonunu değiştirerek transkripsiyon sonrası gen susturulmasının düzenlenmesinde görev alır. miRNA biyogenezi,

pri-miRNA'ların Drosha tarafından işlenerek taşıma proteini olan Exportin5 proteini aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınması ve Dicer tarafından olgunlaştırılmasıyla gerçekleşir. Bu süreçte oluşan dsRNA, ATP'ye bağımlı şekilde AGO'ya alınır ve N-ucu alanı tarafından kararlı kılınır. Elde edilen dupleksin rehber ipliği seçilerek açılırken, tamamlayıcı iplik "kanonik yolak" durumunda dubleksten uzaklaştırılır (Şekil 20). Bunun dışında gelişen alternatif biyogenez mekanizmaları "kanonik olmayan yollar" olarak tanımlanır (Wu vd., 2020).



Şekil 20. siRNA ve miRNA'nın gen susturma mekanizmaları (Lam vd., 2015). dsRNA ve pri-miRNA spesifik proteinler tarafından modifiye edilerek siRNA ve mRNA'lar dönüştürülür. Bu siRNA'lar RISC kompleksine yüklenir ve RISC kompleksi bileşenleri tarafından hedef zincire bağlanarak mRNA'nın degradasyonuna neden olunur.

siRNA'lar ve miRNA'lar, 5' ucundaki fosfat ve 3' ucundaki uzantılı baz aracılığıyla RISC üzerinde işlev görür. RISC'nin PAZ alanı, ssRNA'nın 3' ucunu tanıyarak bağlanmayı sağlar (Nakanishi vd., 2012). AGO proteinleri, RISC'nin temel bileşenlerindendir ve doğrudan veya dolaylı olarak sRNA'lara ya da Dicer, ısı şok proteinlerine (Hsp70/90) ve GW182 gibi ek proteinlere bağlanabilir (Wu vd., 2020).

piRNA'lar ve agotronlar, siRNA ve miRNA oluşumundan bağımsız bir şekilde işlev göstermektedirler. piRNA biyogenezi Drosha ve Dicer'dan bağımsızdır ve "ping-pong amplifikasyonu" ile yürütülür (Czech ve Hannon, 2016). Bu döngüde antisens pri-piRNA'lar, bu yolağa özgü Zuc nükleazı tarafından ve Uridin nükleotidi meyilli olarak kesilerek pre-piRNA'lar oluşturur. Ardından PIWI proteinlerine yüklenerek kesme-aktif komplekslerini meydana getirir ve transpozon RNA'larını hedef alarak germ hücrelerinde genom bütünlüğünü korur (Wei vd., 2022). Agotronlar ise Dicer ve Drosha'dan bağımsız işleyen, yapısal olarak karmaşık ve yaklaşık 100 nt uzunluğunda AGO'ya yüklenen RNA'lardır. Çoğu memelide bulunurlar ve çekirdek diziye bağlı mekanizmaya göre mRNA ekspresyonunu düzenlerler (Hansen, 2018). Agatronlar, miRNA benzeri düzenleyiciler olarak hareket ederek hedef dışı bağlanmayı azaltma, AGO proteinlerine aşırı kısa RNA'ların girmesine engel olma ve proteazom aracılı degradasyonu önleme gibi öngörülen işlevlere sahiptirler. Bu nedenle, agotronlar kodlamayan RNA'ların yeni ve önemli bir sınıfı olarak değerlendirilmektedir. Ancak biyolojik etkilerinin tam olarak anlaşılması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır (Stagsted vd., 2017).

1.6.2. RNAi Mekanizması

RNAi, istenmeyen yabancı genleri ortadan kaldırmak, viral enfeksiyonlara karşı savunma geliştirmek, transpozan aktivitesini susturmak ve gelişimsel süreçleri düzenlemek amacıyla hücrelerin evrimsel olarak geliştirdiği bir mekanizmadır (Elbashir, 2001).

RNAi, siRNA ve miRNA'ların rehber olarak kullanıldığı mekanizmadır. Her iki mekanizma temelde benzer şekilde işlemesine rağmen bazı farklılıklar vardır. RNAi mekanizması genel olarak dsRNA veya pre-miRNA'nın siRNA veya miRNA'lara parçalandığı "başlangıç adımı" ve elde edilen RNA'ların RISC çoklu protein kompleksine katıldığı, rehber olarak kullanıldığı ve hedef mRNA'nın degrade olduğu "efektör adımı" olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

a. Başlangıç Adımı

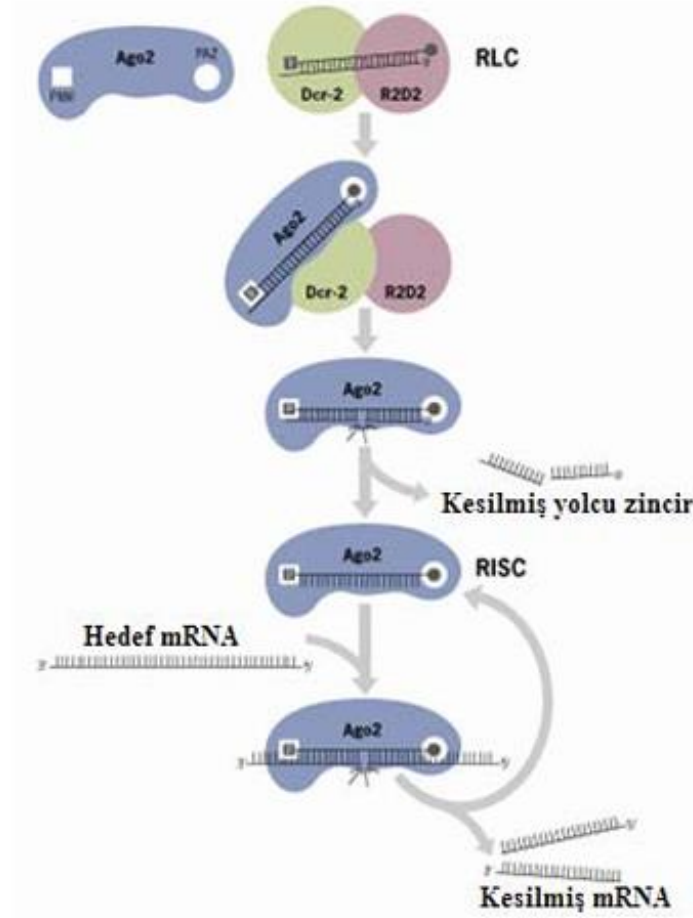
Mekanizmanın ilk basamağını, hücrede bulunan dsRNA (bu piRNA da olabilir) öncüllerinin Dicer enzimi ile siRNA veya miRNA moleküllerine parçalanması oluşturmaktadır. Oluşan bu siRNA ve miRNA'lar 5' fosfat ve 3' hidroksil uçlarında dinükleotid uzantıları taşıyacak şekilde kesilirler ve söz konusu süreç sitoplazmada gerçekleşmektedir (Bernstein vd., 2001; Zamore vd., 2000). Sonrasında, Dicer yapısında bulunan PAZ bölgesi cep oluşturarak dsRNA'lara bağlanmaktadır ve bu bağlanmayı takiben yine Dicer yapısında bulunan RNaz III bölgesi tarafından dsRNA'lar siRNA veya miRNA'lara parçalanmaktadır (Bernstein vd., 2001).

Dicer enziminin, iki alt birimden oluşan enzimatik bir dimer gibi işlev gördüğü düşünülmektedir. Tek bir Dicer proteini, primer yapısına ardışık olarak yerleşmiş iki katalitik RNaz III bölgesi aracılığıyla, dsRNA'ları yaklaşık 12–15 nükleotid uzunluğunda, siRNA boyutunun yarısına karşılık gelen ara ürünlere parçalamaktadır. dsRNA üzerinde antiparalel biçimde konumlanan iki Dicer enziminin toplam dört katalitik RNaz III bölgesi birleşerek işlevsel bir aktif bölge oluşturur. Bu dimer yapısında, her bir Dicer enzimine ait içteki katalitik bölgeler inaktif kalırken, aktif olan diğer bölgeler ise birbirleriyle uygun uzaklıkta yerleşerek yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olgun siRNA moleküllerinin oluşumunu sağlamaktadır (Agrawal vd., 2003; Blaszczyk vd., 2001; Hannon, 2002).

b. Efektör Adımı

RNAi mekanizmasının ikinci adımı olan efektör aşamasında, mekanizmanın ilk basamağı olan başlangıç adımıyla üretilen ürünler, RISC'in bileşenlerine bağlanmaktadır (Agrawal vd., 2003; Gündoğdu ve Çelik, 2009). *Drosophila*'da Dcr-1 (miRNA işleminde görevli) ve Dcr-2 (siRNA işleminde görevli) olmak üzere iki farklı dicer bulunmaktadır. *Drosophila*'da siRNA'nın RISC'e yüklenmesi, Dicer enzimi Dcr-2 ile küçük dsRNA bağlayıcı protein R2D2'nin ortak işleviyle gerçekleşmektedir. Bu iki protein, siRNA'ya bağlanabilen bir heterodimer yapısı oluşturmaktadır. Dcr-2, siRNA'nın termodinamik olarak daha kararlı ucuna bağlanırken, R2D2 daha az kararlı ucuna tutunmaktadır. Bu bağlanma asimetrisi, RISC kompleksine hangi zincirin rehber zincir olarak aktarılacağını belirleyen kritik bir mekanizmadır. Buna göre, 5' ucunda daha düşük kararlılığa sahip olan zincir rehber zincir olarak seçilmektedir. Ayrıca siRNA'nın 5' ucundaki fosfat grubu, R2D2'nin bağlanma etkinliğini artırmaktadır. Dcr-2/R2D2 heterodimeri, ardından RISC'in temel bileşeni olan

Ago ile yer değiştirmek üzere RISC yükleme kompleksine (RLC, RISC loading complex) katılmaktadır (Filipowicz, 2005; Hutvagner, 2005; Rand vd., 2005; Gündoğdu ve Çelik, 2009). Güncel çalışmalar, siRNA'nın Dcr-2/R2D2'den Ago2'ye çift zincirli halde aktarıldığını ve Ago2'nin hedef mRNA'yı tanıyan rehber zincir dışındaki, RISC'in yüklenmesi sırasında Ago tarafından hedef tanıma kullanılmayan yolcu zincir parçalayarak RISC'in substratını oluşturduğunu göstermiştir (Gregory vd., 2005; Rand vd., 2005) (Şekil 21). Yolcu zincirin bu şekilde parçalanması, hem zincirin Ago2'den uzaklaştırılması hem de RISC kompleksinin tam aktivasyonunun sağlanması açısından kritik öneme sahiptir (Rand vd., 2005). Parçalanmanın ardından, ATP'ye bağlı olduğu düşünülen bir aşamada rehber zincir Ago2 ile ilişkilendirilmiş halde kalır ve RISC tamamen aktif forma dönüşür ve (Gündoğdu ve Çelik, 2009).



Şekil 21. RNA susturmasının effektör basamağı (Gündoğdu ve Çelik, 2009).

Kompleksin katalitik çekirdeğini Argonat proteini oluşturur. PAZ bölgesi rehber zincirin 3' ucuna bağlanırken (Gündoğdu ve Çelik, 2009; Rand vd., 2005), yapılan çalışmalar bu bölgenin tek zincirli RNA'nın 3' ucunu veya çift zincirli RNA'nın 2 nükleotidlik 3' uzantısını tanıdığını göstermiştir (Filipowicz, 2005). PIWI bölgesi ise RNaz H aktif bölgesine benzer yapıyla rehber zincirin 5' ucuna bağlanır ve mRNA'yı 10. ile 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester bağından keser (Hutvagner, 2005; Rand vd., 2005; Gündoğdu ve Çelik, 2009). Kesilmiş mRNA fragmanlarının RISC'ten ayrılması ATP'ye bağlıdır; sonrasında 3' uç XRN-1 ekzonükleazı, 5' uç ise ekzozom kompleksi tarafından yıkılır (Gündoğdu ve Çelik, 2009).



1.7. Çalışmanın Amacı

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV), omurgasızları enfekte eden Entomopoxvirinae alt familyasının tip türüdür. AMEV'in omurgasızları enfekte etmesi, onu poksvirüslerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bir araştırma modeli haline getirmiştir. Ayrıca AMEV, ifade vektörü, gen tedavisi vektörü ve tarımsal açıdan zararlı türlerin kontrolünde mikrobiyal mücadele ajanı olarak kullanılma potansiyeline sahip önemli bir böcek virüsüdür.

Poksvirüslerin konak hücreye tutunma ve giriş aşamalarında görev alan genler üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu, VACV'ye aittir. Poksvirüslerin konak hücreye girerken bir EFC oluşturduğu bilinmektedir. AMEV'in konağa girişinde rol alan genler üzerine yapılan araştırmalar ise şu ana kadar yalnızca biyoinformatik analizlere dayanmaktadır. Bu analizler sonucunda, AMEV'de konağa girişte görev aldığı ve EFC kompleksini oluşturduğu öngörülen dokuz gen belirlenmiştir. Bu genlerin AMEV genomundaki AMV035, AMV083, AMV118, AMV127, AMV186, AMV217, AMV232, AMV243 ve AMV249 ORF'lere karşılık geldiği ve EFC proteinlerinin üretiminden sorumlu oldukları düşünülmektedir.

EFC'nin virüsün konağa girişinde ve enfeksiyonun başlatılmasında kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmasının amacı, AMEV'in hücreye girişinde rol oynadığı öngörülen EFC genlerinin RNAi yöntemiyle susturulması sonucunda, yeni virüs üretiminde azalmaya neden olan genlerin belirlenmesidir. Bu amaçla, RNAi yöntemi AMEV'in olası EFC genlerine uygulanmış, susturma işlemi her gen için ayrı ayrı ve önem durumuna göre bazıları için ikili halde gerçekleştirilmiştir. Susturma sonrasında, hangi gen veya genlerin baskılanmasının kompleksin kısmen ya da tamamen işlev kaybına yol açtığı araştırılmıştır.

Bu çalışmayla, konağa girişte etkin olan genlerin belirlenmesi, EFC kompleksinin oluşumu ve enfeksiyonun gerçekleşme oranı üzerindeki etkilerinin ortaya konulması hedeflenmektedir. Elde edilen bulguların, AMEV'in konağa giriş mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayarak uluslararası literatüre önemli veriler kazandırması beklenmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Virüslerin Çoğaltılması

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) üretimi ve çalışmaları için *Lymantria dispar* (Çingene Güvesi) böceğinden geliştirilen Ld652 hücre kültürü kullanıldı (Becker vd., 2008). Ld652 hücreleri stoktan çıkarıldı ve özel hücre kültürü kaplarında (T25, Corning), %10 fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, Kat No: F-0643) içeren besiyerinde (%45 Grace's Insect Medium, GIBCO; %45 Excell 420, SAFC-Biosciences) haftada iki kez pasajlanarak 28 °C'de çoğaltıldı.

Bu çalışmada, yaban tip AMEV'in yanı sıra sferoidin geni silinmiş ve onun yerine *gfp* geni içeren rekombinant AMEV (*AmΔsph/gfp*) kullanıldı. *AmΔsph/gfp*, AMEV'in replikasyon özelliklerini gösterdiği (Palmer vd., 1995) ve içerdği *gfp* geni sebebiyle ürettiği proteinin takibi floresan mikroskop altında kolay olduğu için bu çalışmada tercih edildi. Her bir virüs için Ld652 hücreleri kullanılarak enfeksiyon yapıldı. Özetle, virüsler, stoktan alındı ve 3×10^6 hücre/T25 olacak şekilde kaplara yerleştirilmiş Ld652 hücrelerinde enfeksiyon oluşturmak için kullanıldı. Enfeksiyon için, genç hücrelerin üzerindeki büyüme besiyeri uzaklaştırıldı, her bir virüs için enfeksiyon dozu, MOI (Multiplicity of infection, hücre başına düşen virüs sayısı) 1 olacak şekilde 1 ml enfeksiyon hacminde seyreltildi ve virüs solüsyonları ayrı ayrı hücrelerin bulunduğu kaplara bırakıldı. Virüslerin hücrelere tutunmasının sağlanması için, kaplar 2 saat hafif hızdaki (2 rpm) açılı sallayıcıda bekletildi. Sürenin sonunda, son hacim büyüme besiyeri ile 5 ml'ye tamamlandı. Enfeksiyonun tamamlanması için 5 ila 7 gün 28 °C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Virüs solüsyonunun toplanması, tabandan kaldırılan enfekte hücreler steril tüplere alınarak ve 800 ×g'de 5' santrifüj edilerek yapıldı. Santrifügasyon işleminden sonra, yeni nesil virüsleri içeren süpernatant yeni tüpe alındı ve konsantrasyonu belirleninceye kadar 4 °C'de ve karanlıkta stoklandı. Tüplerin tabanında toplanan pellet, daha sonraki çalışmalarda virüs genomik DNA'sının elde edilmesi amacıyla kullanılmak üzere -20 °C'de stoklandı.

2.2. EPDA Metodu ile Virüs Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Elde edilen virüs süspansiyonlarından rekombinant *AmΔsph/gfp*'nin konsantrasyonu, Terasaki kapları (60 gözlü hücre kültürü kapları) kullanılarak EPDA (Son nokta seyreltme deneyi) metoduna göre tespit edildi. EPDA deneyinde 10 adet mikrosantrifüj tüpü 1'den 10'a kadar etiketlendi. Her 10 tüpe 90 µl büyüme besiyeri konuldu. Konsantrasyonu belirlenecek virüs stokundan 1. tüpe 10 µl eklendi ve karıştırıldı. Yeni bir pipet ucu kullanarak 1. tüpteki karışımdan 2. tüpe 10 µl eklendi ve karıştırıldı. Bu şekilde 1'den 9'a kadar seyreltik hazırlandı. Son tüp, virüs içermeyen kontrol olarak kullanıldı. Virüsün seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra, 10. tüpten 1 tüpe doğru $1,5 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilen Ld652 hücrelerinden 90 µl eklendi ve her bir tüp içeriği karıştırıldı. Virüs içermeyen 10. tüpten başlanılarak 60 gözlü Terasaki kabının 10. sırasındaki 6 gözüne A'dan F'ye doğru 10'ar µl dağıtıldı. Hazırlanan virüs-hücre karışımlarından 10'ar µl, tüp numaraları ve satır numaraları uyumlu olacak şekilde Terasaki kabının satırlarına aynı şekilde dağıtıldı. Kabın kapağı dikkatli bir şekilde kapatıldı ve kapaklarının etrafı parafilm ile sarıldı. Her 3 tekrar için hazırlanan kaplar, üst üste nemli bir kutuya koyuldu ve 28 °C etüve kaldırıldı. Deney hazırlandıktan 5 ila 7 gün sonra, Ld652 hücreleri floresan mikroskop altında araştırıldı. Her gözdeki virüs enfeksiyonunu mevcudiyeti, *AmΔsph/gfp* sayesinde üretilen yeşil floresan proteinin varlığına veya yokluğuna göre (+) veya (-) değer verilerek sonuçlar kaydedildi. *AmΔsph/gfp* virüs konsantrasyonu, bu değerler ve aşağıda yazan EPDA formülüne göre hesaplandı (Reed ve Muench, 1938).

$$\text{Titer (TCID}_{50}/\text{ml}) = 10^{(a+x)} \times 100/\text{ml}$$

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

a = log n,

b = n. seyreltiğin % değeri,

c = n. seyreltiğin altındaki % değeri,

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

2.3. RNA Susturması Yöntemiyle Hedef Genlerin İfadelerinin Engellenmesi

AMEV'in konak hücreyi enfekte edebilmesi için, virüs proteinlerinin giriş füzyon kompleksi (EFC) denilen bir kompleks oluşturması gerektiği bilinmektedir. Yapılan biyoinformatik çalışmalara göre EFC proteinlerini oluşturan genlerin, AMV035, AMV083, AMV118, AMV127, AMV186, AMV217, AMV232, AMV243 ve AMV249 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu genlere özgü primerler tasarlandı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sayesinde her biri için kalıp DNA elde edildi, genlere özgü dsRNA'lar sentezlendi ve dsRNA'ların Ld652 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi.

2.3.1. AMEV EFC Genlerine Özgü Primerlerin Tasarlanması

EFC genlerinin çoğaltılabilmesi için her gene özgü primerler hazırlandı. Primerlerin tasarlanması sırasında snapgene ve çeşitli internet siteleri (<https://www.thermofisher.com>, <https://primer3.ut.ee>, <https://www.bioinformatics.org> ve tasarlanan primerlerin gene özgünlüğünü kontrol etmek için <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanıldı. Primerlerin tasarımı sırasında, primerlerin gene özgü, uzunluklarının 18-25 baz, bağlanma sıcaklığı değerlerinin 55-60 °C arasında, GC içeriğinin %45-55 oranında, primer çiftlerinin bağlanma sıcaklıklarının birbirine denk veya yakın (aralarındaki fark 5 °C'ye kadar) olması, saç tokası ve dimer oluşturmaması ve yapılacak projeye özgü olarak 5' ucunun Guanin (G) ile başlaması kriterleri göz önüne alınarak hazırlandı. Bu çalışmada her bir gen için iki farklı takım primer çifti tasarlandı: İlk takım olarak hedef gene özgü primerler (Tablo 2) ve ikinci takım olarak T7 RNA polimeraz promotör dizisi içeren primerler tasarlandı (Tablo 3). Ayrıca projede pozitif susturma kontrolü olarak GFP proteininin gen sırasına özgü primerler ve negatif susturma kontrolü olarak da AMEV genomu ile alakasız *Chilo iridescent virus* (CIV) CIV415 genine ait primerler temin edildi.

Tablo 2. Gene özgü primerler ve sırası

Primer Adı	Primer Dizisi
23AMV035Fw	GCAGTGTTGACATCGAA
23AMV035Rv	GCACACTCTCTATACCAAC
23AMV083Fw	GACATTAATTAAACAAAAAATAATAATG
23AMV083Rv	GAATAGGCTGGAATGTCT
23AMV118Fw	GGTGGTAGAGTAAGTATATCG
23AMV118Rv	GGATATCCATTTTCTCTCGC
23AMV127Fw	GATAATACTATTTTACAAATAGGTG
23AMV127Rv	GCTGTTTGACACGGAT
23AMV186Fw	GTCAATATTTATCTACTATATTTTCAAC
23AMV186Rv	GATGTATTGGCCATCAATAA
23AMV217Fw	GAGCGTCCGCAAGTATTA
23AMV217Rv	GACTAGACACTGCTCCATT
23AMV232Fw	GTTAAGTAATTATGAAAATGATAATAAAA
23AMV232Rv	GATATAATAATAACTATCGGATAAAAAA
23AMV243Fw	GAATCGCAATTACAAACCA
23AMV243Rv	GATCCCATCGTAATGTCTC
23AMV249Fw	GATATTATTGTTTTTTGTTGTATATTTTTTTA
GFPFw	GATTCTCGTGGAAGTGGATGG
GFPRv	GGGTCTTGTAGTTCCCGTCA
415RRw-dsRNA	AAAGACGTGTCCGCCCTTTT
415RFw-dsRNA	TTCCGTTGCTTCCGTAAGTGT

Tablo 3. T7 promotör dizisi içeren gene özgü primerler ve sırası

Primer Adı	Primer Dizisi
AMV035dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAGTGTGACATCGAA</u>
AMV035dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAGTGTGACATCGAA</u>
AMV083dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGACATTAATTAAACAAAAAATAAT</u> AATG
AMV083dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAATAGGCTGGAATGTCT</u>
AMV118dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGGTAGAGTAAGTATATCG</u>
AMV118dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGATATCCATTTTCTCTCGC</u>
AMV127dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATAATACTATTTTACAAATAGGTG</u>
AMV127dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCTGTTTGACACGGAT</u>
AMV186dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTCAATATTTATCTACTATATTTTCA</u> AC
AMV186dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGTATTGGCCATCAATAA</u>
AMV217dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGCGTCCGCAAGTATTA</u>
AMV217dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGACTAGACACTGCTCCATT</u>
AMV232dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTAAGTAATTATGAAAATGATAAT</u> AAAA
AMV232dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATATAATAATAACTATCGGATAAA</u> AAA
AMV243dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAATCGCAATTACAAACCA</u>
AMV243dsRNARv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATCCCATCGTAATGTCTC</u>
AMV249dsRNAFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATATTATTGTTTTTTGTTGTATATT</u> TTTTTA
dsRNAGFPFw	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATTCTCGTGGAAGTGGATGG</u>
dsRNAGFPRv	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTCTTGTAGTTCCCGTCA</u>
415RFw-dsRNAT7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAAGACGTGTCCGCCCTTTT</u>
415RRv-dsRNAT7	<u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTCCGTTGCTTCCGTACTGT</u>

* Tabloda kalın punto ile gösterilen dizi T7 promotör dizisini belirtir, altı çizili diziler ise RNA polimerazın daha etkili bir şekilde bağlanıp başlamasını sağlayarak enzimin verimliliğini artırır.

2.3.2. PCR Reaksiyonları için Genomik DNA İzolasyonu

PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmak üzere, yaban tip AMEV için genomik DNA izolasyonu yapıldı. Çalışmada, Bölüm 2.1’de anlatılan enfeksiyondan sonra elde edilen virüs ile enfekte hücre pelleti ve DNA izolasyonu kiti (DNeasyR Bloodve Tissue kiti; Qiagen, 69506) ile kitin kullanma kılavuzu kullanıldı. Kit prosedürüne göre enfekte hücrelerin bulunduğu pellet, 200 µl PBS (pH 7,4; fosfat tuzu tamponu) içinde çözüldü. Pellet, çözüldükten sonra proteinaz K ve AL tamponu eklendi, vortekslendi ve süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon, vorteksleme işleminden sonra ısıtıcı blokta 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Bu işlemten sonra %96’lık etanol eklenerek tekrar vortekslendi. Elde edilen

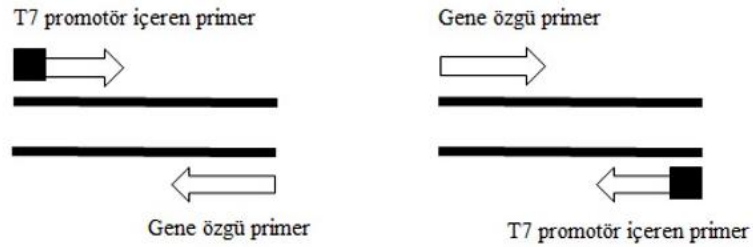
karışım kolondan geçirilerek santrifüjlendi ve biriken alt sıvı atıldı. Kolonu yıkamak için AW2 tamponu eklendi ve kolonun kuruması için santrifüjlendi. Kolondaki genomik DNA'yı almak için AE tamponu kolona eklendi ve santrifüjlenerek DNA'nın mikrosantrifüj tüpünde birikmesi sağlandı. Elde edilen genomik DNA nanodrop aracılığıyla ölçülerek konsantrasyonu belirlendi. DNA konsantrasyonunun 30 – 50 ng/μl arasında olması yeterlidir. Genomik DNA, hedef genlerin çoğaltılması için kullanıldı.

2.3.3. EFC Genlerin Çoğaltılması

Elde edilen genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. İlk olarak hedef genlere özgü primerler kullanılarak EFC genlerinin çoğaltılması çalışmasından istenilen sonuçlar elde edilemedi. Bu yüzden, çalışmada doğrudan genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. Böylece, biri hedef gene özgü ve diğeri hedefe özgüllüğün yanı sıra T7 RNA polimeraz promotör dizisi içerecek şekilde tasarlanmış primer çiftleri kullanılarak PCR oluşturuldu (Şekil 22) ve genler çoğaltıldı.

İki ayrı tek promotör kalıbı oluşturmak için tek bir T7 promotörü ile iki ayrı PCR reaksiyonu

2 PCR ürünü elde etmek için 4 PCR primeri gereklidir.



Şekil 22. PCR ile DNA kalıplarına T7 promotörlerinin eklenmesi. DNA kalıbının oluşturulması dört PCR primeri ve iki PCR amplifikasyonu gerektirir. T7 promotör dizileri içeren PCR reaksiyonu stratejisinde, primerin biri gene özgü diziyeye diğeri ise T7 promotörü içeren gene özgü diziyeye sahip olmalıdır.

T7 promotör içeren ve gene özgü primerler kullanılarak her bir gen için Tablo 3'de görüldüğü gibi PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR reaksiyonları sonucunda virüsün konağa girişte görevli olduğu düşünülen 9 genin, pozitif kontrol olan GFP proteini geninin ve negatif kontrol olarak CIV415 geninin sıraları elde edildi. dsRNA oluştururken, T7 promotörü

içeren DNA kalıbı olarak ~3 µg ürün elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle her gen için PCR reaksiyonları 30 tüp×2 kez yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri, DNA şahit (Genesta, GA-010) eşliğinde %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazı (BIO-RAD, ChemiDoc™MP Imaging System) ile görüntülendi.

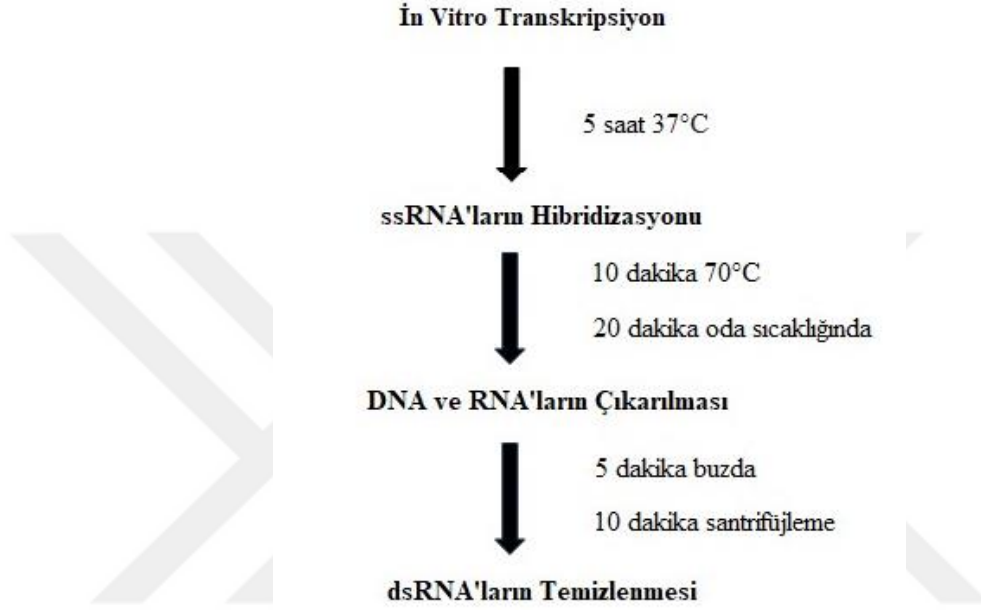
Tablo 4. PCR reaksiyonu bileşenleri ve kullanılan miktar

Bileşenler	Miktar
10X Buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP	1 µl (0,2mM)
DNA	1 µl (30-50 ng/µl)
İleri Primer	1 µl (10mM)
Geri Primer	1 µl (10mM)
Enzim	0,3 µl
dH ₂ O	38,2 µl

PCR ürünlerini dsRNA üretiminde kullanmadan önce, ticari kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega A9280) kullanılarak kalıp DNA'ların temizlenme işlemi yapıldı. Kit prosedürüne göre, ilk önce elde edilen PCR ürünlerine eşit hacimde membran bağlama solüsyonu eklendi. SV minikolonu, toplama tüpüne yerleştirildi ve PCR ürünü ve bağlama tamponu karışımı minikolon düzeneğine aktarıldı. Karışım, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 16.000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve minikolon toplama tüpüne tekrar yerleştirildi. Yıkama aşaması için 700 µl membran yıkama solüsyonu, minikolon düzeneğine eklendi ve 1 dakika 16.000×g'de santrifüjlendi. Toplama tüpüne biriken sıvı atıldı ve minikolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Minikolon düzeneğine bu kez 500 µl membran yıkama solüsyonu eklendi ve 5 dakika 16.000×g'de santrifüjlendi. Toplama tüpü boşaltıldı ve minikolonda kalan etanolün uzaklaştırılması için 1 dakika 16.000×g'de tekrar santrifüjlendi. Minikolon temiz bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Minikolona 50-90 µl nükleaz içermeyen su eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 1 dakika 16.000×g'de santrifüjlendi. Minikolon atıldı elde edilen DNA, -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3.4. dsRNA'ların Oluşturulması

Temizlenen EFC gen dizilerine özgü DNA kalıpları ve ticari kit (T7 RiboMAX[™] Express RNAi System, Promega P1700) kullanılarak, dsRNA'lar elde edildi. Şekil 23'de kullanılan kitin protokolünün genel hatları gösterilmiştir.



Şekil 23. Ticari kit kullanılarak dsRNA üretim ve saflaştırma protokolü

dsRNA üretiminde ilk reaksiyon, T7 promotörün her iki yönü için ayrı ayrı hazırlandı. Kit tamponu, kalıp DNA, nükleaz içermeyen su ve T7 ekspresyonu için enzim, toplam 3 reaksiyon hacminde olacak şekilde hazırlandı. İlk basamak olan *in vitro* transkripsiyonda, çift zincirli kalıp DNA dizilerinin tek zincirli RNA (ssRNA) dizilerine dönüşümünü sağlamak için 37 °C inkübe edildi. İkinci adımda, elde edilen ssRNA'lar tamamlayıcı ssRNA'ları ile 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında soğutma için 20 dakika bekletildi. Üçüncü adımda, elde edilen dsRNA solüsyonuna RNaz çözeltisi ve RNaz içermeyen DNaz eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Böylece ortamda bulunan ssRNA'lar ve kalıp DNA çıkarıldı ve dsRNA'lar elde edilmiş oldu. Dördüncü adımda, elde edilen dsRNA'ların ileri derece temizlenmesi çalışması yapıldı. Kit prosedürüne göre, dsRNA solüsyonuna 1/10'u kadar sodyum asetat (3M, pH 5,2) ve aynı miktarda da izopropanol eklendi. Karışım, 5 dakika buzda bekletildikten sonra 10 dakika en yüksek hızda santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra tüpte kalan üst sıvı atıldı, pellet %70 etanol ile yıkandı, 5 dakika santrifüjlendi ve etanolden arındırıldı. Kalan pellet oda sıcaklığında 15

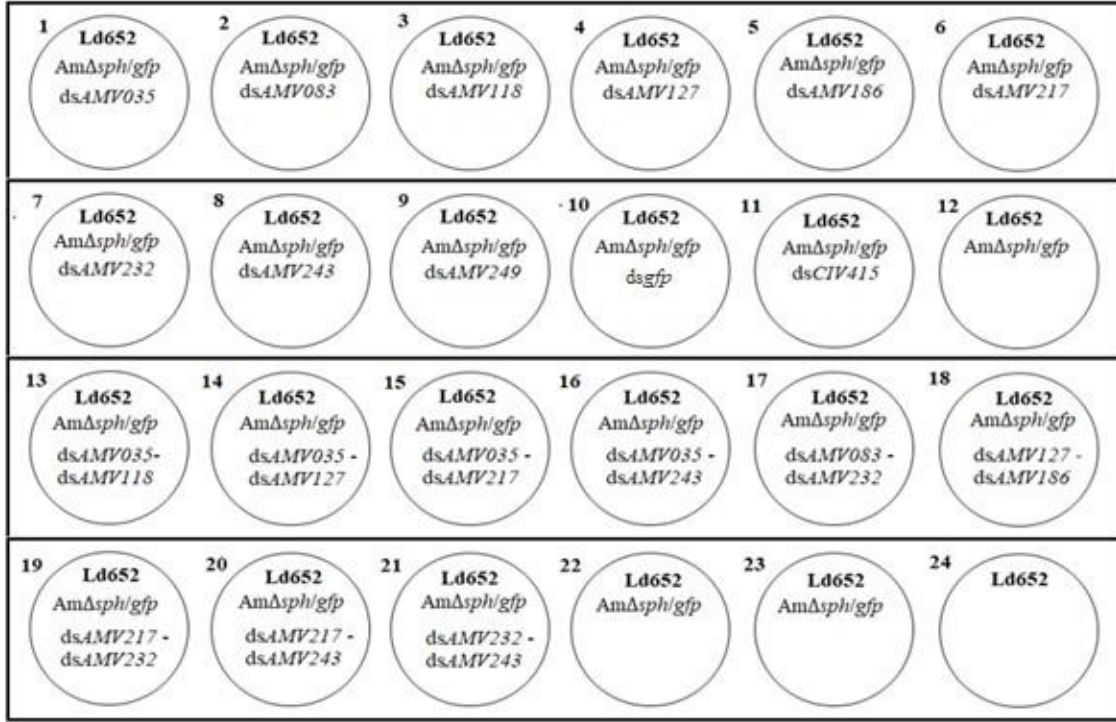
dakika boyunca hava ile kurutmaya bırakıldı. dsRNA bulunan tüp, reaksiyon hacminin 2 - 5 katı hacimde nükleaz içermeyen su ile çözdürüldü ve daha sonra 30 dakika buzda bekletildi. Bekletme süresi sona erdiğinde dsRNA'lar 1/100 oranında seyreltildi. Seyreltik dsRNA'ların konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü ve DNA şahitler (100 bp, GeneDirex, DM003-R500; 1 kbp, Thermo Scientific, SM0311) eşliğinde %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Stok dsRNA reaksiyon tüpleri -20 °C saklandı.

2.3.5. dsRNA'ların Hücrelere Transfeksiyonu

Transfeksiyon işleminden önce, *AmΔsph/gfp* rekombinant virüs ile 24 gözlü kültür kaplarında enfeksiyon gerçekleştirildi. Kabin her bir gözüne $2,4 \times 10^5$ hücre olacak şekilde Ld652 hücreleri konuldu. Büyüme besiyeri (%45 Grace's Insect Medium, %45 Excell 420, %10 FBS) kullanılarak son hacim 500 µl olarak ayarlandı ve hücreler, tutunma için 1 gece 28 °C'lik etüvde inkübe edildi. Hücrelerin tutunmasından sonra, Ld652 hücrelerinin üzerinden üst sıvı alındı ve MOİ 0,03 olacak şekilde *AmΔsph/gfp* rekombinant virüs ile enfekte edildi. Enfeksiyon hacmi 100 µl olacak şekilde tamamlandı ve tüm virüslerin hücrelere tutunması için 2 saat 1 rpm'de açılı sallayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında, transfeksiyon işlemleri için gerekli solüsyonlar hazırlandı.

Enfeksiyonu takiben dsRNA'ların *AmΔsph/gfp* rekombinant virüs ile enfekte Ld652 hücrelerine transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon işlemi sırasında, dsRNA'lardan kaynaklanabilecek kontaminasyonun engellenmesi için zeosin (50 µg/ml) ve amfoterisin (4 µg/ml) antibiyotikleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan 24 gözlü kaplar için, ~50 µg dsRNA kullanıldı.

Transfeksiyon uygulaması, her bir gen için tekli dsRNA transfeksiyonu ve Vaksinya virüslerin EFC genleri üzerine yapılan çalışmalara göre kompleksin oluşumunda birlikte görev aldığı düşünülen genler için ikili dsRNA transfeksiyonu şeklinde yapıldı (Moss, 2012, 2016; Schin vd., 2021; Tak vd., 2021). Tekli ve ikili transfeksiyon uygulamalarının toplu gösterimi, Şekil 24'de verildi. dsCIV415-*AmΔsph/gfp* durumunda, dsCIV415 dsRNA'sı, *Chilo iridescent virus* (CIV, Iridovirus type 6) kapsid proteinine ait gen dizisine göre hazırlandı ve *AmΔsph/gfp* virüs ile düşük dizi benzerliği için negatif susturma kontrolü olarak seçildi. *dsgfp-AmΔsph/gfp* durumunda, *dsgfp* dsRNA'sı pozitif susturma kontrolü olarak kullanıldı. Ayrıca, yalnızca *AmΔsph/gfp* virüs enfeksiyonu da pozitif enfeksiyon kontrolü olarak çalışmaya dahil edildi.



Şekil 24. AMEV EFC proteinlerinin sentezinden sorumlu genlerin RNA interferansı çalışma şeması. Çalışma, 24 gözlü kültür kabında yapıldı ve 1.-9. gözler, EFC protein genlerinin dsRNA'larının tekli transfeksiyonunu; 13.-21. gözler, EFC protein genlerinin dsRNA'larının ikili transfeksiyonunu; 10. göz, pozitif susturma kontrolünü; 11. göz negatif susturma kontrolünü; 22. ve 23. gözler, yalnız virüs enfeksiyonunu ve 24. göz, yalnız hücre kontrolünü ifade eder.

Her bir transfeksiyon işlemi için önce A ve B solüsyonları hazırlandı. A solüsyonları, her bir örnek için tekli transfeksiyon durumunda ~50 µg dsRNA (Tablo 5) ve ikili transfeksiyon durumunda her biri ~25 µg dsRNA (Tablo 6) içerecek ve besiyeri içinde toplam 40 µl olacak şekilde hazırlandı. B solüsyonları, her bir örnek için 18,5 µl besiyeri ve 1,5 µl transfeksiyon kimyasalı (Cellfectin, Invitrogen, Kat no: 10362-100) karıştırılarak hazırlandı. A ve B solüsyonları, önce 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin sonunda, B solüsyonunun kabında A ve B solüsyonları birleştirildi ve yeni karışım, oda sıcaklığında 45 dakika daha bekletildi. A ve B solüsyonlarının hazırlanması sırasında, Tablo 5 ve Tablo 6 verileri kullanıldı.

Tablo 5. Tekli uygulama için kullanılan A ve B solüsyonlarının hazırlanması

dsRNA'lar	ng/μl	μg/μl	<u>A solüsyonu</u>		<u>B solüsyonu</u>		Son ek besiyeri (μl)
			50 μg için hacim (μl)	Besiyeri (μl)	Selfektin (μl)	Besiyeri (μl)	
AMV35dsRNA	4653	4,653	11	29	1,5	18,5	40
AMV83dsRNA	3535	3,535	14	26	1,5	18,5	40
AMV118dsRNA	9363	9,363	5	35	1,5	18,5	40
AMV127dsRNA	5192	5,192	10	30	1,5	18,5	40
AMV186dsRNA	3192	3,192	16	24	1,5	18,5	40
AMV217dsRNA	14340	14,34	3	37	1,5	18,5	40
AMV232dsRNA	4408	4,408	11	29	1,5	18,5	40
AMV243dsRNA	8082	8,082	6	34	1,5	18,5	40
AMV249dsRNA	4890	4,89	10	30	1,5	18,5	40
gfpdsRNA	1584	1,584	32	8	1,5	18,5	40
CIV415dsRNA	3584	3,584	14	26	1,5	18,5	40

Tablo 6. İkili uygulama için kullanılan A ve B solüsyonlarının hazırlanması

dsRNA'lar	A solüsyonu					B solüsyonu			Son ek besiyeri (µl)
	1.'nin µg/µl	1.'nin 25 µg için hacim (µl)	2.'nin µg/µl	2.'nin 25 µg için hacim (µl)	50 µg için hacim (µl)	Besiyeri (µl)	Selfektin (µl)	Besiyeri (µl)	
AMV035+AMV118	4,653	5,372878	9,363	2,670084	8,042962	32	1,5	18,5	40
AMV035+AMV127	4,653	5,372878	5,192	4,8151	10,18798	30	1,5	18,5	40
AMV035+AMV217	4,653	5,372878	14,34	1,743375	7,116253	33	1,5	18,5	40
AMV035+AMV243	4,653	5,372878	8,082	3,093294	8,466171	32	1,5	18,5	40
AMV083+AMV232	3,535	7,072136	4,408	5,671506	12,74364	27	1,5	18,5	40
AMV127+AMV186	5,192	4,8151	3,192	7,83208	12,64718	27	1,5	18,5	40
AMV217+AMV232	14,34	1,743375	4,408	5,671506	7,414882	33	1,5	18,5	40
AMV217+AMV243	14,34	1,743375	8,082	3,093294	4,836669	35	1,5	18,5	40
AMV232+AMV243	4,408	5,671506	8,082	3,093294	8,7648	31	1,5	18,5	40

Enfeksiyon için gerekli 2 saatlik inkübasyondan sonra, Ld652 hücreleri üzerinde bulunan enfeksiyon sıvısı alındı. Her bir gözdeki hücreler, FBS'siz ve antibiyotikli 500 μl besiyeri ile yıkandı. Yıkama işlemi için eklenen 500 μl besiyeri alındı ve yerine hazırlanmış olan A+B solüsyonu eklendi. Transfeksiyonun gerçekleşmesi için 28 °C'lik etüvde 5 saatlik inkübasyon yapıldı. Inkübasyon süresinin sonunda 24 gözlü kültür kabında bulunan 100 μl transfeksiyon sıvısı alındı ve önceden hazırlanmış olan FBS'li ve antibiyotikli besiyeriden

her bir göze 500 µl büyüme besiyeri konuldu. Böylece, hücreler 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Enfeksiyon-Transfeksiyon sonuçları, 24., 48., 60., 84. ve 108. saatlerde floresan mikroskop altında değerlendirildi. Floresan mikroskopunda ilk değerlendirme, *AmΔsph/gfp* (pozitif enfeksiyon kontrolü) enfeksiyonuna ve *dsCIV415* (negatif susturma kontrolü) enfeksiyon-transfeksiyonuna göre yapıldı. Enfeksiyon-transfeksiyon yapılan gözlerin tamamı floresan mikroskop ile görüntülendi.

Enfeksiyon-transfeksiyon çalışmasının görüntülenmesinden sonra, toplama işlemi 24 gözlü hücre kültürü kabındaki her göz için ayrı ayrı yapıldı. Gözdeki tüm hücreler mikropipet yardımıyla tabandan kaldırıldı, mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve tüp içeriği 6000×g'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işlemini takiben süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

2.4. dsRNA Muamelesinin Virüs Üretimi Üzerindeki Etkisi

AMEV'in EFC proteinlerinin genlerinin ve bunların seçilmiş ikili kombinasyonlarının dsRNA aracılı susturulmasının yeni üretilen *AmΔsph/gfp* virüs konsantrasyonu üzerine etkisi belirlendi. Bunun için, enfeksiyon-transfeksiyon işleminden sonra toplanan süpernatantlardan EPDA yapıldı. EPDA deneyi, hücre kültürünün %50'sinde enfeksiyon yapabilme yeteneği için gereken virüs seyreltiğinin belirlenmesine dayalı istatistiksel bir yöntemdir. Bölüm 2.2'de açıklandığı gibi virüs konsantrasyonları, *AmΔsph/gfp* ile 7 günlük enfeksiyon sonucunda Ld652 hücrelerinde üretilen yeşil floresan proteinin mevcudiyetine göre hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Virüs Üretimi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere yaban tip AMEV üretildi. Diğer yandan, üretilen rekombinant *AmΔsph/gfp*'ye ait virüs stoklarının konsantrasyonları EPDA metoduna göre belirlendi. Seyreltik virüs süspansiyonu kullanılarak 60 gözlü hücre kültür kaplarında gerçekleştirilen enfeksiyon deneylerinden elde edilen veriler, istatistiksel olarak standartlaştırılmış EPDA formülü kullanılarak hesaplandı. Yapılan hesaplamaya göre *AmΔsph/gfp* konsantrasyonu $4,3 \times 10^6$ pfu/ml olarak saptandı.

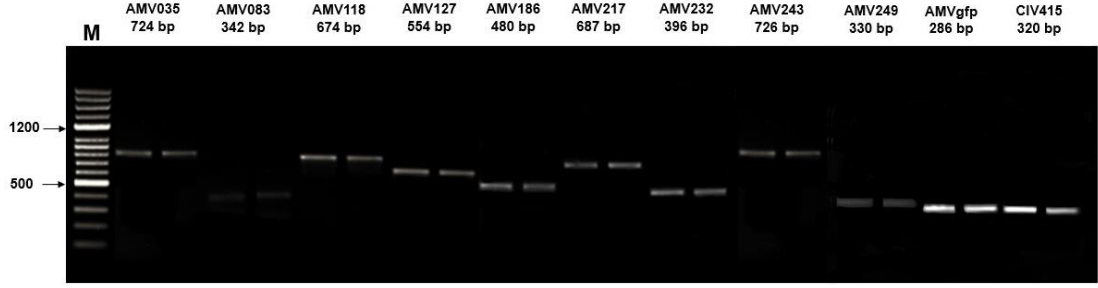
3.2. RNA Susturması Yöntemiyle Hedef Genlerin Engellenmesi

Daha önce yapılan biyoinformatik analizler doğrultusunda AMEV EFC proteinlerini ürettiği değerlendirilen genler, tasarlanan primerler kullanılarak çoğaltıldı. Çoğaltılan DNA, kalıp olarak kullanılarak dsRNA'lar oluşturuldu. Hücrelerin enfeksiyonunu takiben, hazırlanan dsRNA'ların transfeksiyonu yapılarak EFC genlerinin engellenmesi sağlandı.

3.2.1. PCR Reaksiyonları İçin Hedef Genlerin Çoğaltılması

Yaban tip AMEV enfeksiyonunda elde edilen hücre pelleti, PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanmak amacıyla DNA izolasyonuna tabi tutuldu. İzole edilen genomik DNA, nanodrop aracılığıyla ölçüldü ve konsantrasyonu 45 ng/μl olarak belirlendi. Elde edilen genomik DNA, hedef genlerin çoğaltılması için kalıp olarak kullanıldı.

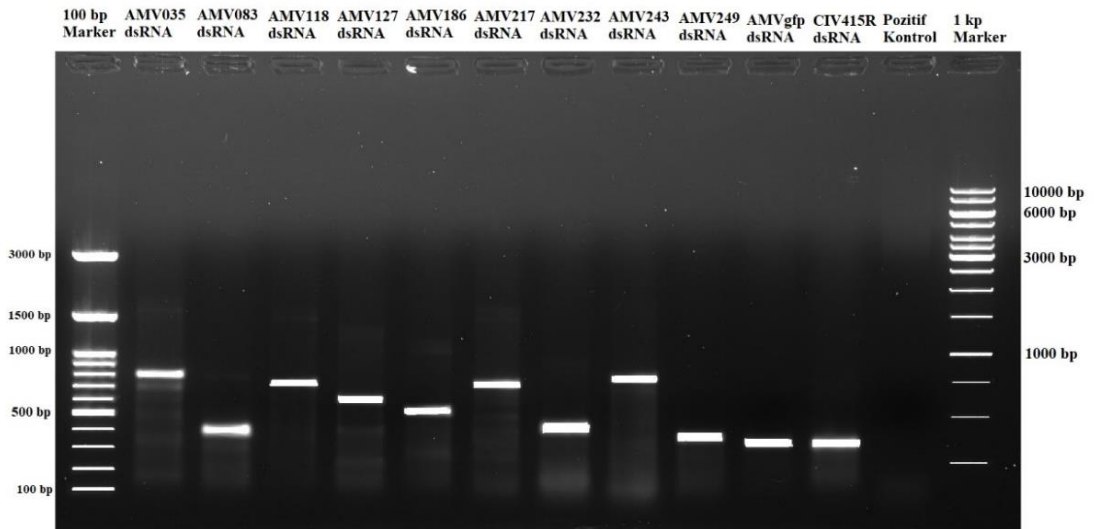
T7 promotör içeren ve gene özgü primerler kullanılarak genomik DNA eşliğinde her bir gen için PCR reaksiyonu hazırlandı ve genler 30 tüp×2 kez olacak şekilde çoğaltıldı. Böylece her bir gen için, hem 3' ucunda hem de 5' ucunda T7 promotörü içeren DNA kalıpları elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri, DNA şahit eşliğinde %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Şekil 25).



Şekil 25. AMEV Giriş Füzyon Kompleksi (EFC) proteinlerinin sentezinden sorumlu genlerin PCR ürünleri

3.2.2. Çoğaltılan Genlerin dsRNA'lara Dönüştürülmesi

Elde edilen EFC gen dizilerine özgü DNA kalıpları ve ticari kit kullanılarak, dsRNA'lar elde edildi. dsRNA'lar 1/100 oranında seyreltilti. Seyreltik dsRNA'ların konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü (Tablo 7) ve DNA şahitler (100 bp ve 1 kbp) eşliğinde %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 26). Beklenen ağırlığa sahip dsRNA'lar, rekombinant *AmΔsph/gfp* virüsler ile enfeksiyona tabi tutulan Ld652 hücrelerine transfeksiyonu için kullanıldı ve AMEV EFC genlerinin virüs enfeksiyonu üzerindeki etkisi araştırıldı.



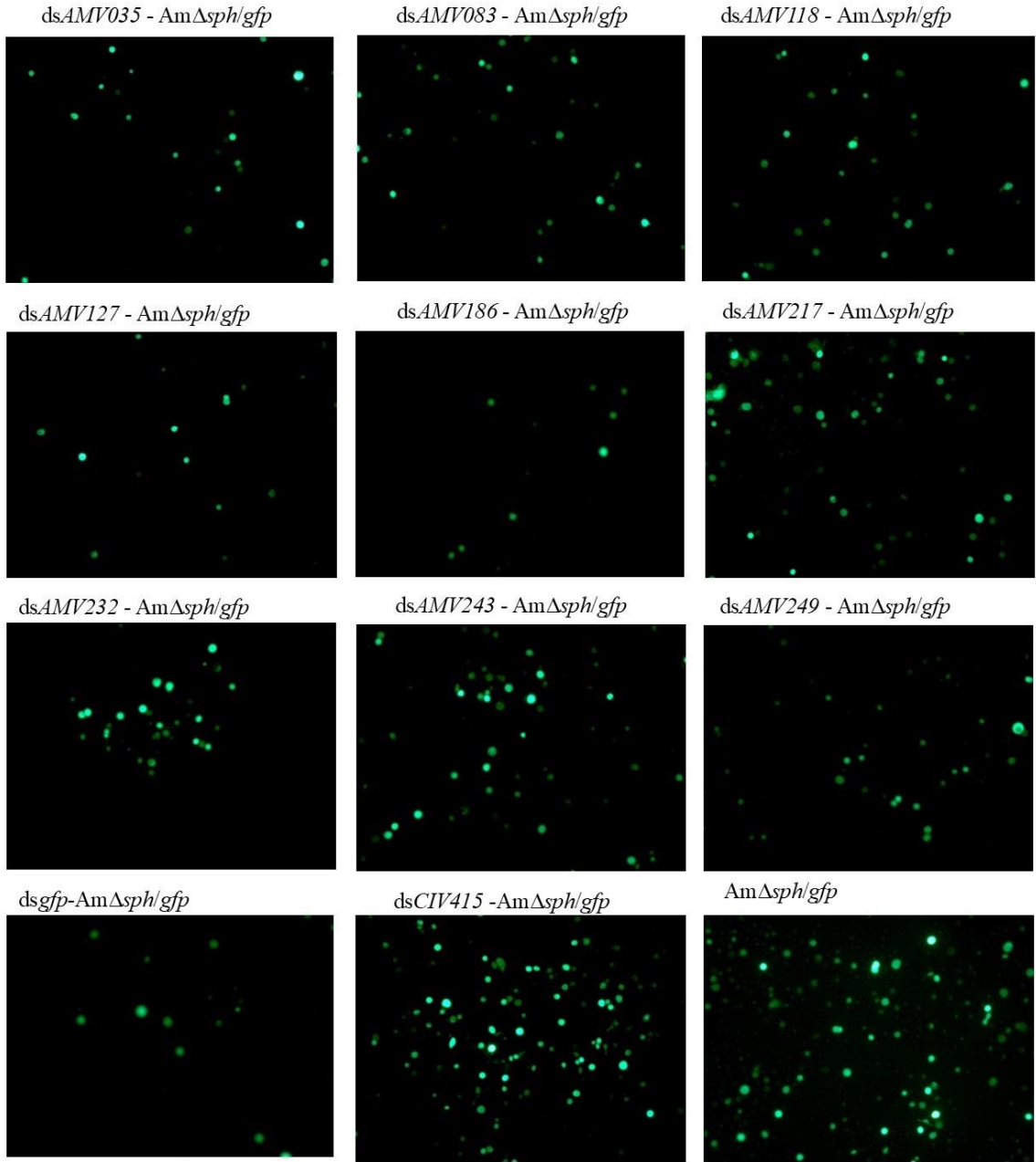
Şekil 26. AMEV *gfp* 'ye Giriş Füzyon Kompleksi (EFC) genlerine özgü dsRNA'larının agaroz jel görüntüsü

Tablo 7. dsRNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları

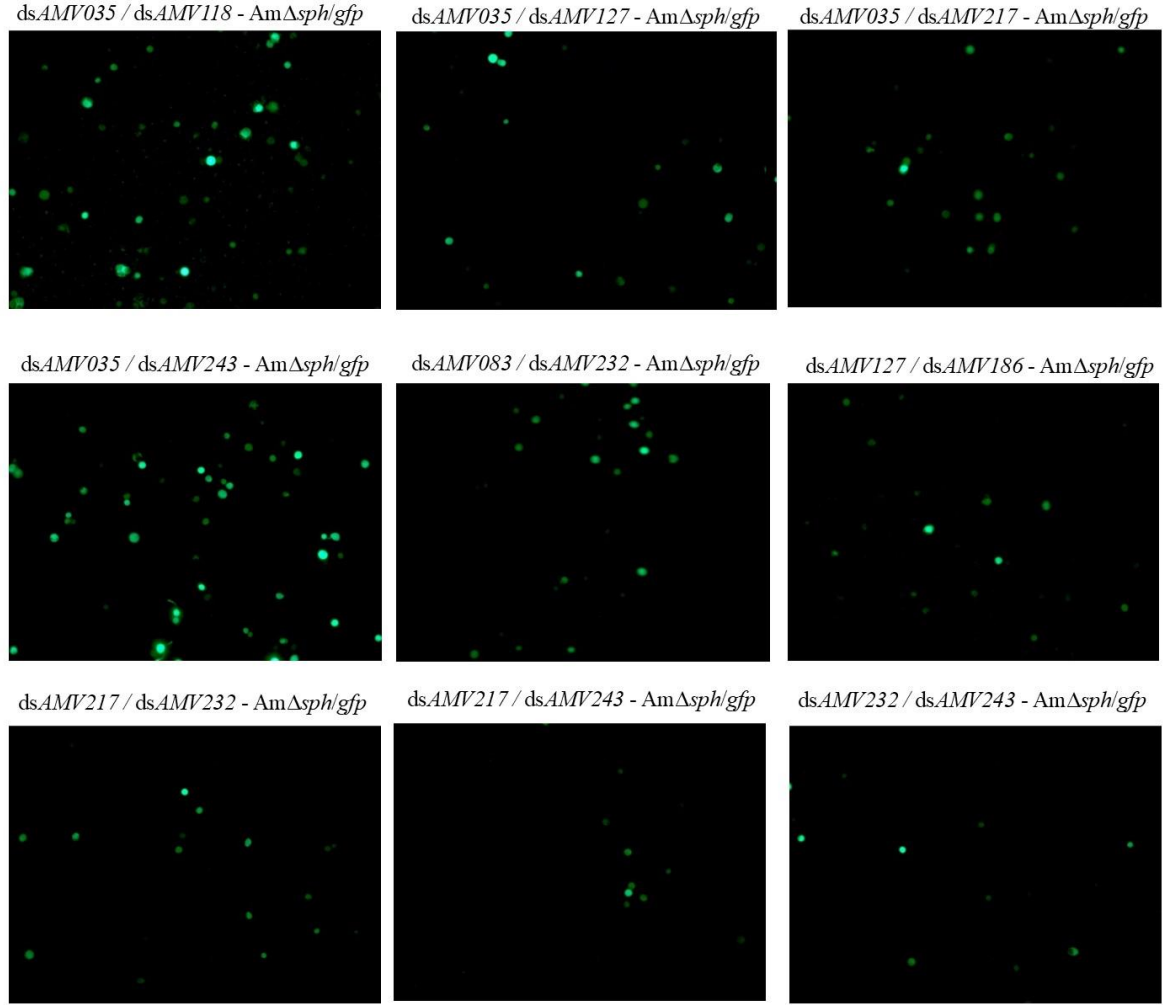
dsRNA	ng/ μ l	260/280	260/230
AMV035	4653	2,135	8,056
AMV083	3535	1,498	6,353
AMV118	9363	2,052	14,23
AMV127	5192	1,582	8,494
AMV186	3192	1,862	5,889
AMV217	14340	2,336	19,94
AMV232	4408	2,400	8,249
AMV243	8082	2,004	12,42
AMV249	489	2,527	9,008
GFP	1584	-46,00	3,182
CIV415R	3584	2,986	6,777

3.2.3. dsRNA'ların Hücrelere Transfeksiyonu

Ld652 hücreleri, *Am Δ sph/gfp* rekombinant virüs ile MOİ 0,03 olacak şekilde enfekte edildi. Enfeksiyonu takiben, dsRNA'ların Ld652 hücrelerine transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon uygulaması, her bir gen için tekli dsRNA transfeksiyonu ve bazı genler için ikili dsRNA transfeksiyonu şeklinde yapıldı. Transfeksiyon için negatif susturma kontrolü, pozitif susturma kontrolü ve *Am Δ sph/gfp* virüs enfeksiyonu kontrolü kullanıldı. Enfeksiyon-Transfeksiyon sonuçları, 24., 48., 60., 84. ve 108. saatlerde floresan mikroskop altında değerlendirildi. En iyi *Am Δ sph/gfp* enfeksiyonu 108. saatte görüldüğü için, enfeksiyon-transfeksiyonu yapılan gözlerin tamamı floresan mikroskop ile görüntülendi. Aynı zaman diliminde alınan görüntüler, tekli uygulamalar (Şekil 27) ve ikili uygulamalar (Şekil 28) olarak ayrı ayrı kaydedildi.



Şekil 27. Enfeksiyon-transfeksiyonun tekli uygulamalarının floresan mikroskopik görüntüsü. AmΔsph/gfp, pozitif enfeksiyon kontrolüdür.



Şekil 28. Enfeksiyon-transfeksiyonun ikili uygulamalarının floresan mikroskopik görüntüsü

3.3. dsRNA Muamelesinin Virüs Üretimi Üzerine Etkisi

AMEV'in EFC proteinlerinin genlerinin ve bunların seçilmiş ikili kombinasyonlarının dsRNA aracılı susturulmasının yeni üretilen *AmΔsph/gfp* virüs konsantrasyonu üzerine etkisi belirlendi. Bunun için, enfeksiyon-transfeksiyon işleminden sonra toplanan süpernatantlardan 3 tekrarlı olarak EPDA çalışması yapıldı. Toplam 7 günlük enfeksiyon sonucunda Ld652 hücrelerinde *AmΔsph/gfp* tarafından üretilen yeşil floresan proteininin mevcudiyetine göre virüs konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 8'da ve Şekil 29'da gösterildi.

EPDA sonuçları Tablo 8'da hem pozitif (*dsgfp-AmΔsph/gfp*) hem de negatif (*dsCIV415-AmΔsph/gfp*) susturma kontrollerine göre değerlendirildi. Tekli uygulamalar

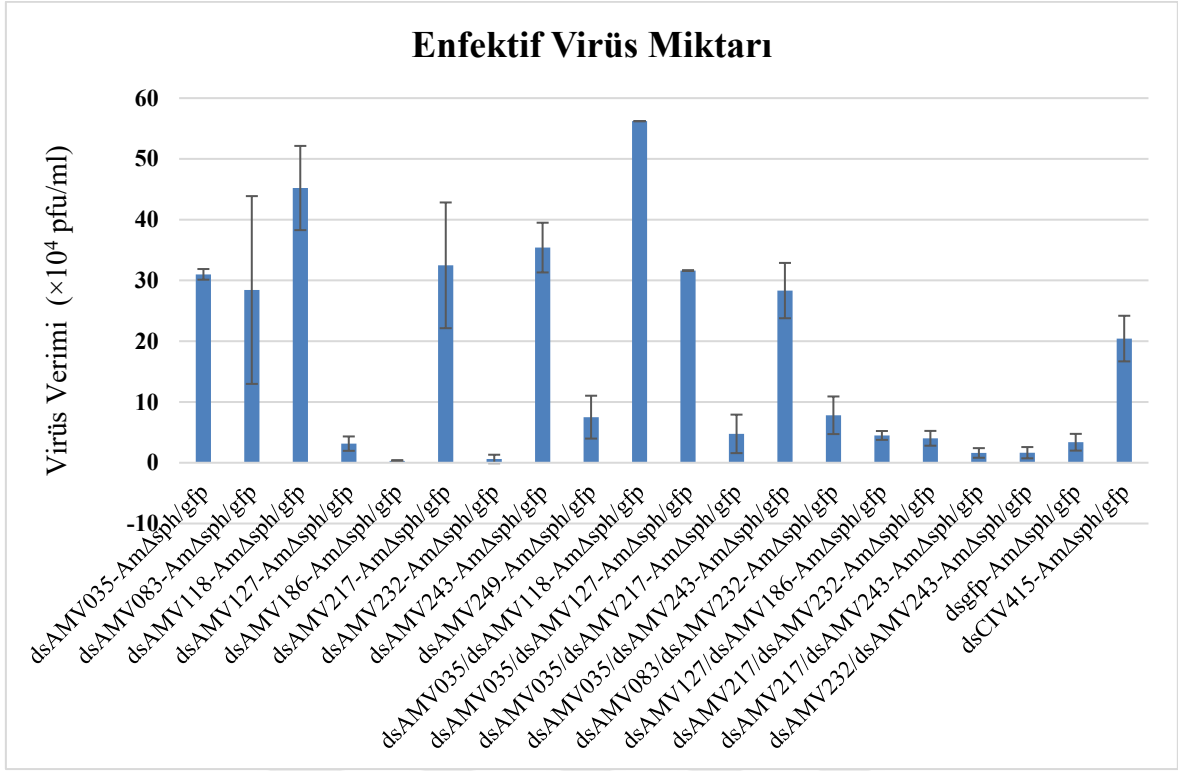
olan *dsAMV186-AmΔsph/gfp* ve *dsAMV232-AmΔsph/gfp*'lerin virüs miktarında kontrollere göre sırasıyla 10,73-64,98 ve 5,44-32,93 kata kadar bir azalma tespit edildi. Yapılan ikili uygulamalardaki virüs miktarındaki ise *dsAMV217/dsAMV243-AmΔsph/gfp* için 2,09-12,68 katlık ve *dsAMV232/dsAMV243-AmΔsph/gfp* için 2,04-12,35 katlık azalmış sonuçlar gözlemlendi.

Tablo 8. Enfeksiyon-transfeksiyon sonrası *AmΔsph/gfp* üretim sonuçları

Transfeksiyon-Enfeksiyon	EPDA Sonucu (pfu/ml)	Kat Azalma (<i>dsgfp-AmΔsph/gfp</i>)/*	Kat Azalma (<i>dsCIV415-AmΔsph/gfp</i>)/**)
<i>dsAMV035-AmΔsph/gfp</i>	$3,10005 \times 10^5$	0,11	0,66
<i>dsAMV083-AmΔsph/gfp</i>	$2,8425 \times 10^5$	0,12	0,72
<i>dsAMV118-AmΔsph/gfp</i>	$4,521 \times 10^5$	0,07	0,45
<i>dsAMV127-AmΔsph/gfp</i>	$3,1448 \times 10^5$	1,07	6,50
<i>dsAMV186-AmΔsph/gfp</i>	$3,1448 \times 10^3$	10,73	64,98
<i>dsAMV217-AmΔsph/gfp</i>	$3,2485 \times 10^5$	0,10	0,63
<i>dsAMV232-AmΔsph/gfp</i>	$6,2053 \times 10^3$	5,44	32,93
<i>dsAMV243-AmΔsph/gfp</i>	$3,5408 \times 10^5$	0,10	0,58
<i>dsAMV249-AmΔsph/gfp</i>	$7,50585 \times 10^4$	0,45	2,72
<i>dsAMV035/dsAMV118-AmΔsph/gfp</i>	$5,621 \times 10^4$	0,06	0,36
<i>dsAMV035/dsAMV127-AmΔsph/gfp</i>	$3,1622 \times 10^5$	0,11	0,65
<i>dsAMV035/dsAMV217-AmΔsph/gfp</i>	$4,75169 \times 10^4$	0,71	4,30
<i>dsAMV035/dsAMV243-AmΔsph/gfp</i>	$2,83315 \times 10^5$	0,12	0,72
<i>dsAMV083/dsAMV232-AmΔsph/gfp</i>	$7,8115 \times 10^4$	0,43	2,62
<i>dsAMV127/dsAMV186-AmΔsph/gfp</i>	$4,495 \times 10^4$	0,73	4,55
<i>dsAMV217/dsAMV232-AmΔsph/gfp</i>	$4,0241 \times 10^4$	0,84	5,08
<i>dsAMV217/dsAMV243-AmΔsph/gfp</i>	$1,61216 \times 10^4$	2,09	12,68
<i>dsAMV232/dsAMV243-AmΔsph/gfp</i>	$1,6545 \times 10^4$	2,04	12,35
<i>dsgfp-AmΔsph/gfp</i>	$3,374 \times 10^4$	1,00	6,06
<i>dsCIV415-AmΔsph/gfp</i>	$2,04355 \times 10^5$	1,17	1,00
<i>AmΔsph/gfp</i>	$2,4425 \times 10^6$	0,01	0,08

*: Çalışmada kullanılan her bir değer pozitif susturma kontrolü değerine bölünerek farkı kat olarak ifade edilmiştir.

** : Çalışmada kullanılan her bir değer negatif susturma kontrolü değerine bölünerek farkı kat olarak ifade edilmiştir



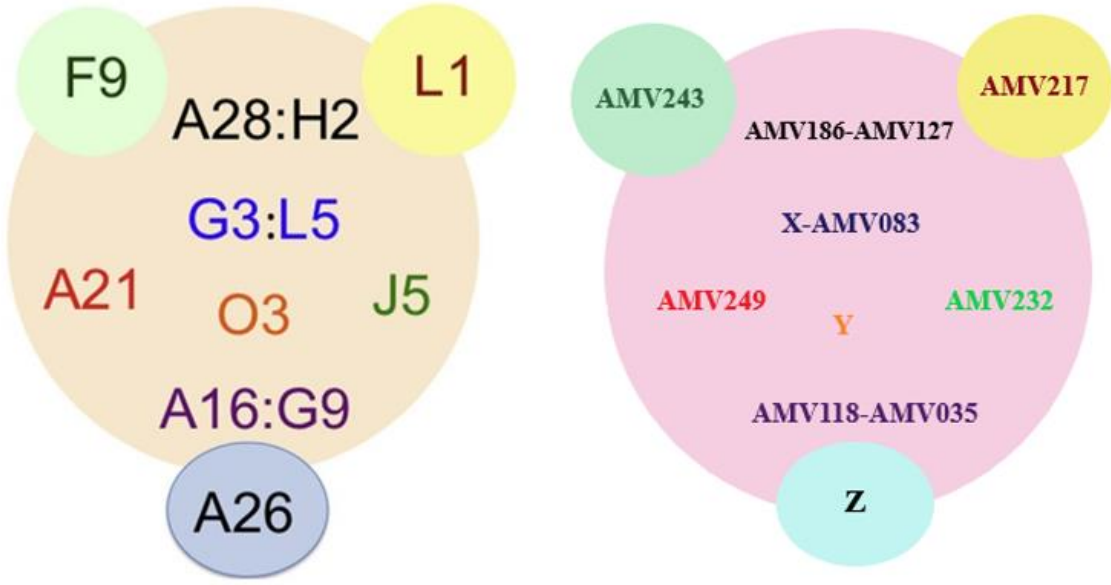
Şekil 29. Tekli ve ikili şekilde dsRNA'ların enfeksiyon-transfeksiyon sonuçlarının EPDA ile virüs miktarının belirlenmesi.

4. TARTIŞMA

Poksvirüslere dair yapılan çalışmaların çoğunluğu VACV üzerinde gerçekleştirilmiştir. Poksvirüslerin hücreye girişinin 11 proteinin bir araya geldiği giriş füzyon kompleksi (EFC) sayesinde gerçekleştiği bilinmektedir. Poksvirüslerin hücreye giriş mekanizmasının anlaşılması için yapılan ilk çalışmada, VACV'nin enfeksiyon esnasında konak hücrenin yüzeyinde bulunan heparan sülfata bağlandığı tespit edilmiştir (Chung vd., 1998). İlerleyen süreçlerde ise VACV'lerde hücreye girişin bir giriş füzyon kompleksi tarafından gerçekleştiği kanıtlanmış ve bu EFC proteinlerinin yapı ve işlevlerini aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. EFC'nin 11 proteinden oluştuğu ve bu proteinlerin: A21 (Townesley vd., 2005b), A28 (Senkevich vd., 2004; Turner vd., 2007), F9 (Diesterbeck vd., 2018), G3 (Izmailyan vd., 2006), G9 (Ojeda, Domi, vd., 2006a), H2 (Senkevich ve Moss, 2005a), J5 (Wolfe vd., 2012), L1 (Bisht vd., 2008), L5 (Townesley vd., 2005) ve O3 (Satheshkumar ve Moss, 2009) oldukları tespit edilmiştir. Bir entomopoksvirüs olan AMEV de tüm poksvirüsler gibi EFC oluşturarak konak hücreye girip enfeksiyonu başlatmaktadır. Yapılan karşılaştırmalı dizi analizleri ve biyoinformatik çalışmalar sonucunda AMEV'de EFC oluşumunda görevli 9 genin olabileceği tespit edilmiştir. AMEV EFC için önerilen proteinlerin genleri sırasıyla *AMV035*, *AMV083*, *AMV118*, *AMV127*, *AMV186*, *AMV217*, *AMV232*, *AMV243* ve *AMV249* şeklindedir. Tablo 9'da VACV EFC protein elemanlarının AMEV'deki homologları gösterilmektedir. (Thézé vd., 2013).

Tablo 9. VACV ve AMEV EFC proteinlerini üreten genler (Thézé vd., 2013)

AMEV EFC genleri	VACV EFC genleri
AMV035	G9
AMV083	L5
AMV118	A16
AMV127	H2
AMV186	A28
AMV217	L1
AMV232	J5
AMV243	F9
AMV249	A21



Şekil 30. VACV (Moss, 2016) ve AMEV EFC proteinlerini üreten genlerin şematik diyagramı.

Literatürdeki VACV EFC proteinlerinin şematik gösterimi ve biyoinformatik analizler baz alınarak, AMEV'deki EFC elamanlarının şematik diyagramı Şekil 30'da oluşturulmuştur. Bu şematik diyagram doğrultusunda VACV'de alt birim oluşturan A28:H2'nin AMEV'deki karşılığı AMV186:AMV127 ve yine VACV'de alt birim oluşturan A16:G9 proteinlerinin AMEV'deki karşılıklarının AMV118:AMV035 olduğu değerlendirilmektedir. Literatürde yer alan biyoinformatik analizler sonucunda VACV'de yer alan G3'ün AMEV'de karşılığı tespit edilememiştir. Bu nedenle G3:L5 alt kompleksinin AMEV'de karşılığı tespit edilememiştir. Ancak L5'in AMEV'deki homologunun AMV083 olduğu değerlendirilmektedir. Ayrıca VACV EFC'ye ait geri kalan F9, L1, A21 ve J5 proteinlerinin AMEV'deki karşılıklarının sırasıyla AMV243, AMV217, AMV249 ve AMV232 olduğu öngörülmüştür.

Bu çalışmada ise biyoinformatik analizler sonucunda öngörülen AMEV EFC proteinleri genlerinin RNA susturması yöntemiyle gen ifadesinin geçici süreliğine baskılanması sonucunda bu genlerin virüsün konak hücreye girişte etkinlikleri incelendi.

VACV'de J5 proteinini susturmaya yönelik RNAi yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, J5 ORF'sinin 4 farklı bölgesiyle eşleşen siRNA'lar tasarlanmıştır. Özgün olmayan siRNA kontrolüne göre susturulmanın %40 ile %50 arasında gerçekleştiği belirlenmiştir. Susma miktarının bu denli düşük olmasının, siRNA'nın düzgün olmayan

transfeksiyonundan kaynaklanabileceğini (Wolfe vd., 2012) ve mRNA üzerindeki hedef bölgenin yapısı, siRNA'nın hücreye alınma verimliliği, silme etkinliği ve süresi ve son olarak siRNA'nın kararlılığı gibi birçok özelliğin siRNA'nın susturma etkinliğini azaltabileceğini (Ali Zaidi vd., 2023; Gao ve Huang, 2013; Pancoska, 2004) gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada pozitif susturma kontrolü olarak kullanılan *dsgfp-AmΔsph/gfp* ile yapılan RNAi çalışması sonucunda yüksek oranda bir susturma gerçekleşmediği tespit edildi. Elde edilen sonuçların nedeninin yukarıdaki sebepler olduğu değerlendirilmektedir.

VACV A28, MV zarında bulunan virüsün konak hücreye girişini sağlayan EFC'nin önemli bir parçasıdır (Senkevich vd., 2004). IPTG indüklemeli yapılan çalışmada, A28 yokluğunda viriyonların hücreye bağlandığı ancak hücre zarına girişini gerçekleştiremediği görülmüştür. Düşük pH koşullarında bile A28'in yokluğu nedeniyle hücre-hücre füzyonu gerçekleşmemektedir (Laliberte vd., 2011; Senkevich vd., 2004). A28, EFC'yi bir arada tutan kritik öneme sahip bir proteindir. Bu nedenle yokluğu ya da baskılanması kompleksin kararlılığını bozarak işlevsiz kılmaktadır (Laliberte vd., 2011). AMEV'de A28'in homoloğu kabul edilen *AMV186* tek başına RNAi ile baskılandığında, üretilen virüs miktarının yüksek oranda, hatta negatif susturma kontrolüne göre 64,98 kat, pozitif susturma kontrolüne göre ise 10,73 kat azaldığı görüldü.

VACV H2 hücreye girişte A28 viral proteinine benzer işlevi yerine getiren ikinci bir proteindir. İndüklenebilir H2 virüsünün gösterdiği özelliklerin neredeyse tümü daha önce indüklenebilir A28 virüsünün özelliklerinde de görülmüştür. Bu sebeple her iki proteine de hücreye girişte ve füzyonda ihtiyaç vardır (Senkevich ve Moss, 2005b). Yapılan bir çalışmada A28 veya H2'den birinin ekspresyonunun baskılanmasıyla EFC'nin yapısının bozulduğu belirlenmiştir. Bu da A28 ve H2'nin EFC'nin oluşumunda beraber rol aldığını düşündürmektedir (Nelson vd., 2008b). H2'nin homoloğu olan *AMV127*'nin tek başına baskılanması sonucunda, *AMV186* kadar olmasa da, 6,50 kat oranda negatif kontrole göre bir azalma gözlemlendi. Moss'un 2016'da yaptığı derlemede H2-A28'nin EFC oluşumunda alt kompleks oluşturduğunun tespit edildiği çalışmadan bahsedilmiştir (Nelson vd., 2008b). Bu bilgiler ışığında *dsAMV127* ve *dsAMV186*'nin ikili uygulaması yapıldı. *dsAMV127*–*dsAMV186* transfeksiyonu sayesinde transkripsiyonunun baskılanması sonucu negatif kontrole göre 4,55 kat, pozitif kontrole göre ise 0,73 kat azalma gözlemlendi. Çalışmadan elde edilen sonuçların literatürdeki bilgilerle uyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

VACV L1 ve F9 proteinleri, EFC ile periferik olarak etkileşime girerler. Bu nedenle de ikisinin de ifadesinin baskılanması sonucunda viriyonun enfektivitesinde önemli derece

bir azalma oluşmamaktadır (Foo vd., 2009; Moss, 2016). VACV L1 ve F9'un AMEV'de karşılığı olan sırasıyla AMV217 ve AMV243'ün RNA susturması sonucunda kontrole göre enfektivitede bir azalma gözlemlenmedi. Bu sonuç, bunların da VACV'deki proteinler gibi EFC'ye periferik bağlandıklarını düşündürmektedir. Ancak üçlü GFP tamamlayıcı sistem kullanılarak yapılan bir çalışmada, F9'un J5 ile etkileşim halinde olduğu tespit edilmiştir (Schin vd., 2021). Bu nedenle *AMV217* ve VACV J5'in homoloğu olan *AMV232* için birlikte dsRNA uygulaması yapıldı. Elde edilen verilere göre *dsAMV217/dsAMV232-AmΔsph/gfp*'de negatif kontrole göre 5,08 kat bir azalma gözlemlendi. Bu sonuç da F9'un, periferik bağlansa da J5 ile etkileşimi durumunda virüs enfeksiyonu için önem kazandığını ima etmektedir.

Ayrıca AMEV'de VACV EFC bileşeni olan O3'ün benzeri bir proteine rastlanılmamıştır (Thézé vd., 2013). Daha önce yapılan indüklenabilir O3 mutanı ve O3 delesyon mutanı ile O3'ten yoksun VACV viriyonların enfektivitesinde yüksek oranda bir azalma ve aynı zamanda hücreye girme yeteneklerinde kayıp görüldü (Satheshkumar ve Moss, 2009). Ancak yapılan sonraki çalışmada O3 delesyonuna sahip viriyonun dördüncü pasajında büyük plak oluşumu gözlemlenirken sekizinci pasajda ise plakların sayısı artmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda, O3 delesyonuna sahip viriyonlarda süreç içinde çerçeve kayması mutasyonları gerçekleştiği değerlendirilmektedir. Bu mutasyonların F9 ve L5'in işlevinde değişikliğe neden olduğu ve enfeksiyöz virüsün tekrar çoğalmaya başladığı belirlenmiştir (Tak vd., 2021). Bu sonuçlar, *AMV217* ve *AMV243*'ün O3 gibi davranabileceğini düşündürdüğünden, *AMV217* ve *AMV243*'ün ikili RNAi uygulanması yapıldı. Elde edilen sonuçlarda *dsAMV217/dsAMV243-AmΔsph/gfp* enfeksiyon-transfeksiyon sonucunda negatif kontrole göre 12,68 kat, pozitif kontrole göre 2,09 kat bir azalma gözlemlendi. *AMV217* ve *AMV243* gen ürünlerinin birlikte O3'ün görevini yerine getirip getirmediğinin ileri çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

VACV A16, VACV'nin MV zarında yer almaktadır. A16'dan yoksun viriyonların konak hücrelere bağlanabildiği ancak bağlandıktan sonra hücre içerisine girişi gerçekleştiremediği hatta asidik ortamda, sinsityum (hücre-hücre füzyonu) oluşumunu uyaramadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak A16, hem hücreler arası füzyonda hem de virüs-hücre füzyonunda gereklidir. A16'dan yoksun viriyonlarda, morfolojinin şekillenmesinde bir engel oluşmadığı ancak viriyonların enfektivitesinin yüksek oranda düşürüldüğü tespit edilmiştir (Ojeda, Senkevich, vd., 2006b). A16'nın AMEV'deki karşılığı olan *AMV118* için yapılan dsRNA uygulamasında, virüs üretiminde belirgin bir azalma tespit edilememiştir.

AMV118 için gen ifadesinin baskılanmasına yönelik deneyden elde edilen sonuç ve literatürdeki VACV A16 bilgilerin çelişmesi, kullanılan deney yönteminin farklılığından olabileceği gibi, AMEV ve VACV proteinlerinin görevleri arasındaki bir farklılaşmadan da kaynaklanabileceği için, konu üzerinde ayrıntılı çalışmaların yapılması faydalı olacaktır.

VACV A21 virüs enfeksiyonunun geç evresinde sentezlenen MV zarında bulunan bir transmembran proteinidir (Townesley vd., 2005b). Laktoz promotörü baskılayıcı koşullu letal mutantla A21 gen ekspresyonunun baskılandığı çalışmada, A21 bulundurmeyen viriyonların hücre yüzeyine tutunduğu ancak füzyon adımını gerçekleştiremediği gösterilmiştir (Townesley vd., 2005b). A21'in AMEV'deki karşılığı olan *AMV249*'ün RNA susturması sonrası üretilen virüs miktarında negatif kontrole göre 2,72 kat bir azalma görüldü. Bu da A21'den farklı olarak, AMEV'de bulunan *AMV249*'ün baskılanmasıyla viriyon enfektivitesinde dikkat çekici bir azalma görülmediği anlamına gelmektedir.

VACV J5, A16 ve G9 ile dizi farklılıklarına rağmen bunlarla homologdur. J5 geninin transkripsiyonunun IPTG ile düzenlendiği bir sistem tasarlanmıştır. Rekombinant J5'in IPTG'li ve IPTG'siz ortamda BS-C-1 hücrelerine transfeksiyonu sonucunda IPTG'siz ortamda enfeksiyöz virüs miktarında %80 azalma görülmüştür. Eş zamanlı yapılan RNA susturma susturmasıyla oluşturulan J5 siRNA'ların, virüs J5'ini baskılayarak enfeksiyöz virüs miktarında yüksek oranda azalma yakalanmıştır (Wolfe vd., 2012). AMEV'de J5'in karşılığı olan *AMV232* için RNA susturması uygulandığında, enfeksiyöz virüs miktarında negatif kontrole göre 32,93 kat, pozitif kontrole göre ise 5,44 kat azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuç, VACV J5 ve *AMV232* için fonksiyonel homolojiyi destekler niteliktedir.

VACV G9'un işlevini aydınlatmak için 3 farklı grup içeren 47 öldürücü mutantın kullanıldığı deney tasarlanmıştır. Yapılan çalışmada, MV kaynaklı membran füzyonu, EFC oluşumu ve viral enfektivite için kritik amino asitler tanımlanmıştır. Grup 1 mutantlarının A16 ve G9 protein-protein etkileşimlerini ve EFC oluşumunu sekteye uğrattığı tespit edildi. Grup 2 mutantlarının ise sadece A16'ya bağlandıkları ancak diğer EFC proteinleri ile etkileşime girmedikleri görüldü. Son olarak Grup 3 mutantlarının, Grup 2 ile benzer şekilde, A16 ile etkileşime girdiği lakin diğer EFC proteinlerine bağlanmadıkları tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda G9 ile A16'ın alt kompleks oluşturduğu ve bu kompleksin EFC'nin birleşimi için başlangıç oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında G9'un EFC'nin oluşumunda görevli olduğu ve hatta membran füzyonu süreçlerini düzenleyen birçok farklı alan içerdiği ispatlanmıştır. Bu nedenle G9'ün EFC oluşumu için gerekli olduğu ve yokluğunda enfektivitenin azaldığı sonucuna varılmaktadır.

(Chiu vd., 2025). Bu çalışmada ise VACV G9'un AMEV'deki karşılığı olan *dsAMV035*'in RNA susturmasında tek başına uygulandığında negatif kontrole göre 0,66 oranında azalma gözlemlendi. Aynı zamanda Schin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada üçlü GFP tamamlayıcı sistem kullanılarak VACV EFC proteinlerinin birbirleri ile ilişkilerinde elde edilen bilgilere (Schin vd., 2021) ve yayınlanmamış biyoinformatik verilere dayanarak *AMV035*'in *AMV118*, *AMV127*, *AMV217* ve *AMV243* ile ikili uygulamaları denenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde virüs üretiminde negatif kontrole göre *dsAMV035/dsAMV118-AmΔsph/gfp*'nin 0,36, *dsAMV035/dsAMV127-AmΔsph/gfp*'nin 0,65, *dsAMV035/dsAMV243-AmΔsph/gfp*'nin 0,72 ve *dsAMV035/dsAMV217-AmΔsph/gfp* ikilisi için ise 4,30 oranında azalma gözlemlenmiştir. *dsAMEV035*'in, tek başına hem de ikili kombinasyonlarında istenilen düzeyde susturmanın gerçekleşmediği gözlemlendi. Bu farklı sonuçlar, AMEV ve VACV proteinlerinin görevleri arasındaki farklılaşmadan kaynaklanabileceği gibi VACV'deki G9'ün AMEV'deki karşılığının *AMEV035* olmayabileceğini düşündürmektedir.

VACV L5, virüsün temel EFC bileşenlerindendir ve transmembran proteinlerinden biridir. G3 ile alt kompleks oluşturduğu ve bu kompleksin EFC'nin kararlılığına katkıda bulunduğu tespit edildi. L5'in yokluğunda viriyonların hücreye bağlandıkları ancak girişi sağlayamadıkları görüldü. Sonuç olarak oluşan viriyonlar morfolojik olarak normal görünmelerine rağmen enfektivitede ciddi bir azalma belirlenmiştir (Wolfe ve Moss, 2011). AMEV'deki L5 proteinin karşılığı *AMV083* olarak belirlenmişti. Yapılan çalışmada, *AMV083* RNAi uygulamasında negatif kontrole göre dikkate değer bir azalma görülmedi. Üçlü GFP tamamlayıcı sistem kullanılarak yapılan bir çalışmada L5'in J5 ile etkileşim içinde olduğu sonucuna varılmıştı (Schin vd., 2021). Bu bilgiler ışığında *dsAMV083* ve *dsAMV232*'nin ikili uygulaması yapıldı ve beklenenin aksine virüs üretiminde negatif kontrole göre sadece 2,62 kat azalma görüldü.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV)'in giriş füzyon kompleksi (EFC) proteinlerini kodladığı öngörülen genlerin, RNA susturması (RNAi) yöntemiyle baskılanması sonucu virüsün konak hücreye girişine ve enfektivite düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, *Vaccinia virus* (VACV) EFC proteinleriyle yapılan karşılaştırmalar ışığında değerlendirilmiştir.

Analiz edilen genler arasında VACV A28'in homoloğu olan AMV186 susturulduğunda virüs üretiminde en belirgin azalma gözlenmiş, bu genin EFC'nin kararlılığı ve virüsün hücreye girişinde kritik bir rol oynadığı doğrulanmıştır. Benzer şekilde VACV H2'nin homoloğu AMV127 baskılandığında enfektivitede anlamlı bir düşüş saptanmış ve AMV186–AMV127 ikili susturmasında da bu iki proteinin kompleks oluşumunda birlikte görev aldığı değerlendirilmiştir. Ayrıca J5'in homoloğu olan AMV232 susturulduğunda enfektivitenin belirgin biçimde azalması, AMV232'nin VACV J5 proteiniyle benzer işlevde olduğunu desteklemektedir.

Buna karşın AMV217 (L1 homoloğu) ve AMV243 (F9 homoloğu) tekli susturmalarında anlamlı bir enfektivite azalması gözlenmemiştir. VACV'de O3 delesyonlu mutantların oluşturulmasından sonra F9 ve L5 proteinlerinde virüs enfektivitesini kısmen geri kazandıran adaptif mutasyonlar belirlendiğinde, bu iki proteinin VACV'de O3'ün işlevini üstlendiği sonucuna varılmıştır. Bu yüzden AMEV'de bu iki proteine karşılık gelen AMV217 ve AMV243 birlikte baskılandığında virüs miktarının azalması, ikisinin etkileşerek VACV'deki O3 proteininin işlevini üstlendiğini düşündürmüştür. Dolayısıyla AMV217 ve AMV243'ün, O3'ün görevini telafi edebilecek şekilde etkileşime girmiş olabileceği değerlendirilmektedir.

AMV249 (A21 homoloğu) ve AMV083 (L5 homoloğu) genlerinin susturulmasının ise enfektivitede yalnızca sınırlı düzeyde azalmaya neden olması, bu genlerin EFC'nin tamamlayıcı veya yardımcı bileşenleri olabileceğini göstermiştir. VACV A16 homoloğu AMV118 ve VACV G9 homoloğu AMV035 susturmalarında ise belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu durum AMEV ve VACV proteinleri arasındaki evrimsel işlev farklılıklarından ya da RNAi verimliliğinden kaynaklanıyor olabilir.

Genel olarak, elde edilen veriler AMEV'in VACV ile yapısal olarak benzer ancak işlevsel açıdan farklılıklar gösteren bir EFC yapısına sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Elde edilen susma oranlarına bakıldığında, AMV186, AMV232 ve AMV217'nin

susturulmasında en az yeni virüs gözlemlendiği için, bu genlerin virüsün hücre zarını füzyonunda ve hücreye girişinde temel bileşenler olduğu ve diğer bileşenlerin ise kompleksin kararlılığını ve konak uyumu gibi işlevlerde rol aldığı değerlendirilmektedir.

Bu bulgular, AMEV'in konak hücreye giriş mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlamakta olup, ilerleyen çalışmalarda bu proteinlerin etkileşimlerinin detaylı biçimde incelenmesi ve mutasyon analizleriyle desteklenmesi önerilmektedir.



6. ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, AMEV EFC bileşenlerinin RNA susturması kullanılarak baskılanmasıyla konak hücreye giriş hakkında önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak bu çalışmaya rağmen AMEV EFC yapısı, işlevi ve konaktaki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. EFC bileşenleri hakkında daha kapsamlı bilgiler edinebilmek için ek araştırmalara ihtiyaç vardır. Çalışmalarda aydınlatılabilecek hususlar aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

1. Üçlü GFP tamamlayıcı sistem kullanılarak yapılan çalışmada VACV EFC'leri durumunda etkili sonuçlar alındığı için AMEV EFC'leri için de proteine yönelik etkileşim sisteminin kullanılması, gen susturma çalışmalarını pekiştirmek açısından faydalı olacaktır.
2. *AMV217* ve *AMV232* EFC oluşumunda etkileri beraber susturulduğunda, etkili sonuç gözlemlendiğinden dolayı bu genlerin protein düzeyinde etkileşimleri araştırılabilir.
3. *AMV217* ve *AMV243* ayrı ayrı RNA susturması ile susturulduğunda kontrole göre kayda değer bir azalma gözlemlenmemiştir. İki genin birlikte uygulaması sonucunda kontrole göre bir azalma gözlemlendiğinden dolayı AMEV de homoloğu bulunmayan O3'ün yerine görev aldığı düşünülmüştür. Bu nedenle protein düzeyinde *AMV217* ve *AMV243*'ün diğer proteinlerle etkileşimlerine bakılmalıdır.
4. *AMV217* ve *AMV243* için VACV O3 gibi davrandığı görüşünü ispatlamak için, AMEV EFC'nin bozulmadan izolasyonu sağlanabilir ve kompleks halindeyken NMR gibi yöntemler kullanılarak kompleksin üç boyutlu yapısı araştırılabilir. Böylece O3'ün eksikliğini telafi eden AMEV EFC proteinleri hakkında daha fazla bilgi elde edinilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657-685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>
- Akashi, H., Miyagishi, M., & Taira, K. (2001). Suppression of Gene Expression by RNA Interference in Cultured Plant Cells. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 11(6), 359-367. <https://doi.org/10.1089/108729001753411326>
- Albarnaz, J., Torres, A., & Smith, G. (2018). Modulating Vaccinia Virus Immunomodulators to Improve Immunological Memory. *Viruses*, 10(3), 101. <https://doi.org/10.3390/v10030101>
- Ali Zaidi, S. S., Fatima, F., Ali Zaidi, S. A., Zhou, D., Deng, W., & Liu, S. (2023). Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 381. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02147-z>
- Arif, B. M. (1995). Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses. *Journal of General Virology*, 76(1), 1-13. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-1-1>
- Arif, B. M., & Kurstak, E. (1991). *The entomopoxviruses. Viruses of invertebrates* (Kutstak E, Ed.).
- Artenstein, A. W., & Grabenstein, J. D. (2008). Smallpox vaccines for biodefense: need and feasibility. *Expert Review of Vaccines*, 7(8), 1225-1237. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1225>
- Baek, S.-H., Kwak, J.-Y., Lee, S. H., Lee, T., Ryu, S. H., Uhlinger, D. J., & Lambeth, J. D. (1997). Lipase Activities of p37, the Major Envelope Protein of Vaccinia Virus. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32042-32049. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32042>
- Baroudy, B. M., Venkatesan, S., & Moss, B. (1982). Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell*, 28(2), 315-324. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90349-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90349-X)
- Bawden, A. L., Glassberg, K. J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W., & Moyer, R. W. (2000). Complete Genomic Sequence of the Amsacta moorei Entomopoxvirus: Analysis and Comparison with Other Poxviruses. *Virology*, 274(1), 120-139. <https://doi.org/10.1006/VIRO.2000.0449>
- Becker, M. N., Greenleaf, W. B., Ostrov, D. A., & Moyer, R. W. (2004). *Amsacta moorei* Entomopoxvirus Expresses an Active Superoxide Dismutase. *Journal of Virology*, 78(19), 10265-10275. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10265-10275.2004>

- Becker, M. N., Todd, T. M., & Moyer, R. W. (2008). An Amsacta moorei entomopoxvirus ortholog of the poly(A) polymerase small subunit exhibits methyltransferase activity and is non-essential for virus growth. *Virology*, 375(2), 624-636. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.023>
- Bell, E., Shamim, M., Whitbeck, J. C., Sfyroera, G., Lambris, J. D., & Isaacs, S. N. (2004). Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*, 325(2), 425-431. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.05.004>
- Benhnia, M. R.-E.-I., McCausland, M. M., Moyron, J., Laudenslager, J., Granger, S., Rickert, S., Koriazova, L., Kubo, R., Kato, S., & Crotty, S. (2009). Vaccinia Virus Extracellular Enveloped Virion Neutralization In Vitro and Protection In Vivo Depend on Complement. *Journal of Virology*, 83(3), 1201-1215. <https://doi.org/10.1128/JVI.01797-08>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Bisht, H., Weisberg, A. S., & Moss, B. (2008). Vaccinia Virus L1 Protein Is Required for Cell Entry and Membrane Fusion. *Journal of Virology*, 82(17), 8687-8694. <https://doi.org/10.1128/JVI.00852-08>
- Blagbrough, I. S., & Zara, C. (2009). Animal Models for Target Diseases in Gene Therapy — using DNA and siRNA Delivery Strategies. *Pharmaceutical Research*, 26(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9646-8>
- Blasco, R., & Moss, B. (1991). Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *Journal of Virology*, 65(11), 5910-5920. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.11.5910-5920.1991>
- Blasco, R., Sisler, J. R., & Moss, B. (1993). Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *Journal of Virology*, 67(6), 3319-3325. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.6.3319-3325.1993>
- Blaszczyk, J., Tropea, J. E., Bubunenko, M., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., Court, D. L., & Ji, X. (2001). Crystallographic and Modeling Studies of RNase III Suggest a Mechanism for Double-Stranded RNA Cleavage. *Structure*, 9(12), 1225-1236. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00685-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00685-2)
- Brown, E., Senkevich, T. G., & Moss, B. (2006). Vaccinia Virus F9 Virion Membrane Protein Is Required for Entry but Not Virus Assembly, in Contrast to the Related L1 Protein. *Journal of Virology*, 80(19), 9455-9464. <https://doi.org/10.1128/JVI.01149-06>
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichlow, G. V, Christie, C. H., Dalenberg, K., Di Costanzo, L., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ganesan, S., Goodsell, D. S., Ghosh, S., Green, R. K., Guranović, V., Guzenko, D., Hudson, B. P.,

- Zhuravleva, M. (2021). RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D437-D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
- Byrd, A. K. (2012). Superfamily 2 helicases. *Frontiers in Bioscience*, 17(7), 2070. <https://doi.org/10.2741/4038>
- Chang, H.-W., Yang, C.-H., Luo, Y.-C., Su, B.-G., Cheng, H.-Y., Tung, S.-Y., Carillo, K. J. D., Liao, Y.-T., Tzou, D.-L. M., Wang, H.-C., & Chang, W. (2019). Vaccinia viral A26 protein is a fusion suppressor of mature virus and triggers membrane fusion through conformational change at low pH. *PLOS Pathogens*, 15(6), e1007826. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007826>
- Chang, S.-J., Shih, A.-C., Tang, Y.-L., & Chang, W. (2012). Vaccinia Mature Virus Fusion Regulator A26 Protein Binds to A16 and G9 Proteins of the Viral Entry Fusion Complex and Dissociates from Mature Virions at Low pH. *Journal of Virology*, 86(7), 3809-3818. <https://doi.org/10.1128/JVI.06081-11>
- Chang, T.-H., Chang, S.-J., Hsieh, F.-L., Ko, T.-P., Lin, C.-T., Ho, M.-R., Wang, I., Hsu, S.-T. D., Guo, R.-T., Chang, W., & Wang, A. H. J. (2013). Crystal Structure of Vaccinia Viral A27 Protein Reveals a Novel Structure Critical for Its Function and Complex Formation with A26 Protein. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003563. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003563>
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2003). Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 175-207. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504>
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2005). Membrane Hemifusion: Crossing a Chasm in Two Leaps. *Cell*, 123(3), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.015>
- Chiu, H.-J., Wang, H.-C., & Chang, W. (2025). *Structural Dissection of Vaccinia G9 Identifies Residues Essential for Membrane Fusion and Complex Assembly*. <https://doi.org/10.1101/2025.04.22.650039>
- Chiu, W.-L., Lin, C.-L., Yang, M.-H., Tzou, D.-L. M., & Chang, W. (2007). Vaccinia Virus 4c (A26L) Protein on Intracellular Mature Virus Binds to the Extracellular Cellular Matrix Laminin. *Journal of Virology*, 81(5), 2149-2157. <https://doi.org/10.1128/JVI.02302-06>
- Chung, C.-S., Chen, C.-H., Ho, M.-Y., Huang, C.-Y., Liao, C.-L., & Chang, W. (2006). Vaccinia Virus Proteome: Identification of Proteins in Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion Particles. *Journal of Virology*, 80(5), 2127-2140. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2127-2140.2006>
- Chung, C.-S., Hsiao, J.-C., Chang, Y.-S., & Chang, W. (1998). A27L Protein Mediates Vaccinia Virus Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 72(2), 1577-1585. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1577-1585.1998>

- Condit, R. C., Moussatche, N., & Traktman, P. (2006). In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. *Advances in Virus Research*, 66, 31-124. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66002-8)
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernández, J. J., Jiménez, M. V., Estéban, M., Baumeister, W., & Carrascosa, J. L. (2005). Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2772-2777. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409825102>
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2016). One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4), 324-337. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.008>
- da Fonseca, F. G., Wolffe, E. J., Weisberg, A., & Moss, B. (2000). Effects of Deletion or Stringent Repression of the H3L Envelope Gene on Vaccinia Virus Replication. *Journal of Virology*, 74(16), 7518-7528. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7518-7528.2000>
- Dales, S., and Siminovitch, L. (1961). THE DEVELOPMENT OF VACCINIA VIRUS IN EARLE'S L STRAIN CELLS AS EXAMINED BY ELECTRON MICROSCOPY. *The Journal of Cell Biology*, 10(4), 475-503. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.475>
- Davies, D. H., McCausland, M. M., Valdez, C., Huynh, D., Hernandez, J. E., Mu, Y., Hirst, S., Villarreal, L., Felgner, P. L., & Crotty, S. (2005). Vaccinia Virus H3L Envelope Protein Is a Major Target of Neutralizing Antibodies in Humans and Elicits Protection against Lethal Challenge in Mice. *Journal of Virology*, 79(18), 11724-11733. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11724-11733.2005>
- De Castro, E., Hulo, C., Masson, P., Auchincloss, A., Bridge, A., & Le Mercier, P. (2024). ViralZone 2024 provides higher-resolution images and advanced virus-specific resources. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D817-D821. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad946>
- De Haven, B. C., Gupta, K., & Isaacs, S. N. (2011). The vaccinia virus A56 protein: a multifunctional transmembrane glycoprotein that anchors two secreted viral proteins. *Journal of General Virology*, 92(9), 1971-1980. <https://doi.org/10.1099/vir.0.030460-0>
- Deng, Y., Navarro-Forero, S., & Yang, Z. (2025). Temporal expression classes and functions of vaccinia virus and mpox (monkeypox) virus genes. *mBio*, 16(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.03809-24>
- Diesterbeck, U. S., Gittis, A. G., Garboczi, D. N., & Moss, B. (2018). The 2.1 Å structure of protein F9 and its comparison to L1, two components of the conserved poxvirus entry-fusion complex. *Scientific Reports*, 8(1), 16807. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34244-7>
- Diesterbeck, U. S., Muslinkina, L. A., Gittis, A. G., Singh, K., Moss, B., & Garboczi, D. N. (2025). The 2.3 Å Structure of A21, a Protein Component of the Conserved Poxvirus Entry-Fusion Complex. *Journal of Molecular Biology*, 437(12), 169097. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.169097>

- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L., & Smith, G. L. (2010). Repulsion of Superinfecting Virions: A Mechanism for Rapid Virus Spread. *Science*, 327(5967), 873-876. <https://doi.org/10.1126/science.1183173>
- Duanmu, H., Guo, F., Liu, Y., & He, K. (2025). Developing RNAi pesticides in the post genomic era: A review. *Advanced Agrochem.* <https://doi.org/10.1016/j.aac.2025.07.002>
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15(2), 188-200. <https://doi.org/10.1101/gad.862301>
- Faehnle, C. R., and Joshua-Tor, L. (2010). Argonaute MID domain takes centre stage. *EMBO reports*, 11(8), 564-565. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.110>
- Filipowicz, W. (2005). RNAi: The Nuts and Bolts of the RISC Machine. *Cell*, 122(1), 17-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.023>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Foo, C. H., Lou, H., Whitbeck, J. C., Ponce-de-León, M., Atanasiu, D., Eisenberg, R. J., & Cohen, G. H. (2009). Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans. *Virology*, 385(2), 368-382. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.019>
- Forterre, P. (2005). The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie*, 87(9-10), 793-803. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.03.015>
- Galmiche, M. C., Goenaga, J., Wittek, R., & Rindisbacher, L. (1999). Neutralizing and Protective Antibodies Directed against Vaccinia Virus Envelope Antigens. *Virology*, 254(1), 71-80. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9516>
- Gao, K., & Huang, L. (2013). Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(4), 213-225. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2013.06.005>
- Granados, R. R., and Naughton, M. (1975). Development of Amsacta moorei entomopoxvirus in ovarian and hemocyte cultures from *Estigmene acrea* larvae. *Intervirology*, 5(1-2), 62-68. <https://doi.org/10.1159/000149881>
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell*, 123(4), 631-640. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
- Greseth, M. D., & Traktman, P. (2022). The Life Cycle of the Vaccinia Virus Genome. *Annual Review of Virology*, 9(1), 239-259. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-104752>

- Grunweller, A., & Hartmann, R. K. (2005). RNA Interference as A Gene-Specific Approach for Molecular Medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 12(26), 3143-3161. <https://doi.org/10.2174/092986705774933489>
- Guo, F. B., Yu, X. J. (2007). Re-prediction of protein-coding genes in the genome of Amsacta moorei entomopoxvirus. *Journal of Virological Methods*, 146(1-2), 389-392. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2007.07.010>
- Gündoğdu, R., and Çelik, V. (2009). RNA İNTERFERANS (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 34-47. <http://fbe.erciyes.edu.tr/>
- Hall, R. L., & Hink, W. F. (1990). Physical mapping and field inversion gel electrophoresis of Amsacta moorei entomopoxvirus DNA. *Archives of Virology*, 110(1-2), 77-90. <https://doi.org/10.1007/BF01310704>
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244-251. <https://doi.org/10.1038/418244a>
- Hansen, T. B. (2018). *Detecting Agotrons in Ago CLIPseq Data* (ss. 221-232). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8624-8_17
- Harrison, S. C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S. L., Moss, B., O'Donnell, M., Ploegh, H., Schmid, S. L., Walter, K. P., & Theriot, J. (2004). Discovery of antivirals against smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), 11178-11192. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403600101>
- Helenius, A. (2018). Virus Entry: Looking Back and Moving Forward. *Journal of Molecular Biology*, 430(13), 1853-1862. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.03.034>
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K., & Fries, E. (1980). On the entry of semliki forest virus into BHK-21 cells. *The Journal of Cell Biology*, 84(2), 404-420. <https://doi.org/10.1083/jcb.84.2.404>
- Hernández-Crespo, P., Veyrunes, J. C., Cousserans, F., & Bergoin, M. (2000). The spheroidin of an Entomopoxvirus isolated from the grasshopper Anacridium aegyptium (AaEPV) shares low homology with spheroidins from lepidopteran or coleopteran EPVs. *Virus Research*, 67(2), 203-213. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00144-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00144-1)
- Hernandez-Gonzalez, M., Calcraft, T., Nans, A., Rosenthal, P. B., & Way, M. (2023). A succession of two viral lattices drives vaccinia virus assembly. *PLOS Biology*, 21(3), e3002005. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002005>
- Hollinshead, M., Vanderplasschen, A., Smith, G. L., & Vaux, D. J. (1999). Vaccinia Virus Intracellular Mature Virions Contain only One Lipid Membrane. *Journal of Virology*, 73(2), 1503-1517. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.2.1503-1517.1999>
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2), 210. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-210>

- Hsiao, J.-C., Chung, C.-S., & Chang, W. (1999). Vaccinia Virus Envelope D8L Protein Binds to Cell Surface Chondroitin Sulfate and Mediates the Adsorption of Intracellular Mature Virions to Cells. *Journal of Virology*, 73(10), 8750-8761. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8750-8761.1999>
- Hughes, A. L., Irausquin, S., & Friedman, R. (2010). The evolutionary biology of poxviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(1), 50-59. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2009.10.001>
- Hutvagner, G. (2005). Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Letters*, 579(26), 5850-5857. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.071>
- Ichihashi, Y. (1996). Extracellular Enveloped Vaccinia Virus Escapes Neutralization. *Virology*, 217(2), 478-485. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1996.0142>
- Inan, C., Muratoglu, H., Arif, B. M., & Demirbag, Z. (2018). Amsacta moorei entomopoxvirus encodes a functional heparin-binding glycosyltransferase (AMV248). *Virus Genes*, 54(3), 438-445. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1561-4>
- Iyer, L. M., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses. *Journal of Virology*, 75(23), 11720-11734. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11720-11734.2001>
- Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Research*, 117(1), 156-184. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.01.009>
- Izmailyan, R. A., Huang, C.-Y., Mohammad, S., Isaacs, S. N., & Chang, W. (2006). The Envelope G3L Protein Is Essential for Entry of Vaccinia Virus into Host Cells. *Journal of Virology*, 80(17), 8402-8410. <https://doi.org/10.1128/JVI.00624-06>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kaever, T., Matho, M. H., Meng, X., Crickard, L., Schlossman, A., Xiang, Y., Crotty, S., Peters, B., & Zajonc, D. M. (2016). Linear Epitopes in Vaccinia Virus A27 Are Targets of Protective Antibodies Induced by Vaccination against Smallpox. *Journal of Virology*, 90(9), 4334-4345. <https://doi.org/10.1128/JVI.02878-15>
- Kalia, M., & Jameel, S. (2011). Virus entry paradigms. *Amino Acids*, 41(5), 1147-1157. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0363-3>
- Kao, C.-F., Liu, C.-Y., Hsieh, C.-L., Carillo, K. J. D., Tzou, D.-L. M., Wang, H.-C., & Chang, W. (2023a). Structural and functional analyses of viral H2 protein of the vaccinia virus entry fusion complex. *Journal of Virology*, 97(12). <https://doi.org/10.1128/jvi.01343-23>

- Kao, C.-F., Tsai, M.-H., Carillo, K. J., Tzou, D.-L., & Chang, W. (2023b). Structural and functional analysis of vaccinia viral fusion complex component protein A28 through NMR and molecular dynamic simulations. *PLOS Pathogens*, 19(11), e1011500. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011500>
- Karagüzel, A., Kalay, E., & Celep, F. (2007). RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33(1), 41-44.
- Khlusevich, Y., Matveev, A., Emelyanova, L., Goncharova, E., Golosova, N., Pereverzev, I., & Tikunova, N. (2022). New p35 (H3L) Epitope Involved in Vaccinia Virus Neutralization and Its Deimmunization. *Viruses*, 14(6), 1224. <https://doi.org/10.3390/v14061224>
- King, L. A., Wilkinson, N., Miller, D. P., & Marlow, S. A. (1998). Entomopoxviruses. İçinde *The Insect Viruses* (ss. 1-29). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5341-0_1
- Kotwal, G. J., Isaacs, S. N., McKenzie, R., Frank, M. M., & Moss, B. (1990). Inhibition of the Complement Cascade by the Major Secretory Protein of Vaccinia Virus. *Science*, 250(4982), 827-830. <https://doi.org/10.1126/science.2237434>
- Kurzynska-Kokorniak, A., Pokornowska, M., Koralewska, N., Hoffmann, W., Bienkowska-Szewczyk, K., & Figlerowicz, M. (2016). Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro. *Scientific Reports*, 6(1), 23989. <https://doi.org/10.1038/srep23989>
- Laliberte, J. P., Weisberg, A. S., & Moss, B. (2011). The Membrane Fusion Step of Vaccinia Virus Entry Is Cooperatively Mediated by Multiple Viral Proteins and Host Cell Components. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002446. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002446>
- Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y., & Leung, S. W. S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e252. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>
- Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (2006). Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5989-5994. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601025103>
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M. R., & Kim, V. N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 25(3), 522-532. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600942>
- Lefkowitz, E. J., Wang, C., & Upton, C. (2006). Poxviruses: past, present and future. *Virus Research*, 117(1), 105-118. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.01.016>
- Leung, R. K. M., & Whittaker, P. A. (2005). RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), 222-239. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.03.004>

- Lin, C.-L., Chung, C.-S., Heine, H. G., & Chang, W. (2000). Vaccinia Virus Envelope H3L Protein Binds to Cell Surface Heparan Sulfate and Is Important for Intracellular Mature Virion Morphogenesis and Virus Infection In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology*, 74(7), 3353-3365. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3353-3365.2000>
- Lin, S., Yue, D., Yang, F., Chen, Z., He, B., Cao, Y., Dong, H., Li, J., Zhao, Q., & Lu, G. (2023). Crystal structure of vaccinia virus G3/L5 sub-complex reveals a novel fold with extended inter-molecule interactions conserved among orthopoxviruses. *Emerging Microbes & Infections*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2160661>
- Liu, Z., Wang, J., Cheng, H., Ke, X., Sun, L., Zhang, Q. C., & Wang, H.-W. (2018). Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell*, 173(5), 1191-1203.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.080>
- Lucas, M. S., Gasser, P., Günthert, M. M., Wepf, R., Mercer, J., Helenius, A., & Schertel, A. (2008). Correlative 3D Microscopy: CLSM and FIB/SEM Tomography. *Imaging & Microscopy*, 10(3), 30-31. <https://doi.org/10.1002/imic.200890065>
- Lustig, S., Fogg, C., Whitbeck, J. C., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., & Moss, B. (2005). Combinations of Polyclonal or Monoclonal Antibodies to Proteins of the Outer Membranes of the Two Infectious Forms of Vaccinia Virus Protect Mice against a Lethal Respiratory Challenge. *Journal of Virology*, 79(21), 13454-13462. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13454-13462.2005>
- Lustig, S., Fogg, C., Whitbeck, J. C., & Moss, B. (2004). Synergistic neutralizing activities of antibodies to outer membrane proteins of the two infectious forms of vaccinia virus in the presence of complement. *Virology*, 328(1), 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.024>
- Ma, E., MacRae, I. J., Kirsch, J. F., & Doudna, J. A. (2008). Autoinhibition of Human Dicer by Its Internal Helicase Domain. *Journal of Molecular Biology*, 380(1), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.005>
- Ma, E., Zhou, K., Kidwell, M. A., & Doudna, J. A. (2012). Coordinated Activities of Human Dicer Domains in Regulatory RNA Processing. *Journal of Molecular Biology*, 422(4), 466-476. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.009>
- MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., & Doudna, J. A. (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, 311(5758), 195-198. <https://doi.org/10.1126/science.1121638>
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell*, 22(12), 3879-3889. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080671>
- Manuka, A., Mehmeti, I., Radaelli, A., Hashorva, E., Zanotto, C., & Morghen, C. D. G. (2025). Insights into poxviruses: virology and vaccines. *Acta Virologica*, 69. <https://doi.org/10.3389/av.2025.14597>
- Marlow, S. A., Billam, L. J., Palmer, C. P., & King, L. A. (1993). Replication and morphogenesis of Amsacta moorei entomopoxvirus in cultured cells of Estigmene

- acrea (salt marsh caterpillar). *Journal of General Virology*, 74(7), 1457-1461. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-7-1457>
- Más, V., & Melero, J. A. (2013). *Entry of Enveloped Viruses into Host Cells: Membrane Fusion* (ss. 467-487). https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_16
- Masliyah, G., Barraud, P., & Allain, F. H.-T. (2012). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1119-x>
- Matho, M. H., de Val, N., Miller, G. M., Brown, J., Schlossman, A., Meng, X., Crotty, S., Peters, B., Xiang, Y., Hsieh-Wilson, L. C., Ward, A. B., & Zajonc, D. M. (2014). Murine Anti-vaccinia Virus D8 Antibodies Target Different Epitopes and Differ in Their Ability to Block D8 Binding to CS-E. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004495. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004495>
- McInnes, C. J., Damon, I. K., Smith, G. L., McFadden, G., Isaacs, S. N., Roper, R. L., Evans, D. H., Damaso, C. R., Carulei, O., Wise, L. M., & Lefkowitz, E. J. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Poxviridae 2023. *Journal of General Virology*, 104(5). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001849>
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), 447-459. <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
- Mello, C. C., & Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006), 338-342. <https://doi.org/10.1038/nature02872>
- Mercer, J., Schelhaas, M., & Helenius, A. (2010). Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 803-833. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>
- Milhavet, O., Gary, D. S., & Mattson, M. P. (2003). RNA Interference in Biology and Medicine. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 629-648. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.1>
- Mitsuhashi, W., Miyamoto, K., & Wada, S. (2014). The complete genome sequence of the Alphaentomopoxvirus *Anomala cuprea* entomopoxvirus, including its terminal hairpin loop sequences, suggests a potentially unique mode of apoptosis inhibition and mode of DNA replication. *Virology*, 452-453, 95-116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.036>
- Monticelli, S. R., Earley, A. K., Tate, J., & Ward, B. M. (2019). The Ectodomain of the Vaccinia Virus Glycoprotein A34 Is Required for Cell Binding by Extracellular Virions and Contains a Large Region Capable of Interaction with Glycoprotein B5. *Journal of Virology*, 93(4). <https://doi.org/10.1128/JVI.01343-18>
- Morris, K. V. (2006). Therapeutic Potential of siRNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing. *BioTechniques*, 40(sup4). <https://doi.org/10.2144/000112166>
- Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, 344(1), 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.037>

- Moss, B. (2012). Poxvirus cell entry: How many proteins does it take? *Viruses*, 4(5), 688-707. <https://doi.org/10.3390/V4050688>
- Moss, B. (2013). Poxvirus DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a010199-a010199. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010199>
- Moss, B. (2015). Poxvirus membrane biogenesis. *Virology*, 479-480, 619-626. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.003>
- Moss, B. (2016). Membrane fusion during poxvirus entry. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 60, 89-96. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.07.015>
- Moss, B., & Shisler, J. L. (2001). Immunology 101 at poxvirus U: Immune evasion genes. *Seminars in Immunology*, 13(1), 59-66. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0296>
- Murphy, F. A. (1995). On target: “Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses — Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses” will be published in March 1995 by Springer-Verlag Wien New York. *Archives of Virology*, 140(2), 391-392. <https://doi.org/10.1007/BF01309873>
- Müller, M., Fazi, F., & Ciaudo, C. (2020). Argonaute Proteins: From Structure to Function in Development and Pathological Cell Fate Determination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00360>
- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., & Patel, D. J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 486(7403), 368-374. <https://doi.org/10.1038/nature11211>
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, 279-289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Nelson, G. E., Sisler, J. R., Chandran, D., & Moss, B. (2008a). Vaccinia virus entry/fusion complex subunit A28 is a target of neutralizing and protective antibodies. *Virology*, 380(2), 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.009>
- Nelson, G. E., Wagenaar, T. R., & Moss, B. (2008b). A Conserved Sequence within the H2 Subunit of the Vaccinia Virus Entry/Fusion Complex Is Important for Interaction with the A28 Subunit and Infectivity. *Journal of Virology*, 82(13), 6244-6250. <https://doi.org/10.1128/JVI.00434-08>
- Ojeda, S., Domi, A., & Moss, B. (2006a). Vaccinia Virus G9 Protein Is an Essential Component of the Poxvirus Entry-Fusion Complex. *Journal of Virology*, 80(19), 9822-9830. <https://doi.org/10.1128/JVI.00987-06>
- Ojeda, S., Senkevich, T. G., & Moss, B. (2006b). Entry of Vaccinia Virus and Cell-Cell Fusion Require a Highly Conserved Cysteine-Rich Membrane Protein Encoded by the A16L Gene. *Journal of Virology*, 80(1), 51-61. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.1.51-61.2006>

- Osborne, R. J., Sriskantha, A., & Dall, D. J. (1997). Mapping of the *Heliothis armigera* entomopoxvirus (HaEPV) genome, and analysis of genes encoding the HaEPV spheroidin and nucleoside triphosphate phosphohydrolase I proteins. *Journal of General Virology*, 78(12), 3115-3123. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-12-3115>
- Özşahin, E., Sezen, K., & Demirbağ, Z. (2015). *Amsacta moorei* entomopoxvirus encodes a functional esterase (amv133) with protease activity. *Intervirology*, 58(1), 41-48. <https://doi.org/10.1159/000369018>
- Palmer, C. P., Miller, D. P., Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M., & King, L. A. (1995). Genetic modification of an entomopoxvirus: deletion of the spheroidin gene does not affect virus replication in vitro. *Journal of General Virology*, 76(1), 15-23. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-1-15>
- Pancoska, P. (2004). Efficient RNA interference depends on global context of the target sequence: quantitative analysis of silencing efficiency using Eulerian graph representation of siRNA. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1469-1479. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh314>
- Paturi, S., & Deshmukh, M. V. (2021). A Glimpse of “Dicer Biology” Through the Structural and Functional Perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.643657>
- Plitzko, J. M., Rigort, A., & Leis, A. (2009). Correlative cryo-light microscopy and cryo-electron tomography: from cellular territories to molecular landscapes. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.03.008>
- Pong, S. K., & Gullerova, M. (2018). Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes – Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins. *FEBS Letters*, 592(17), 2973-2986. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13196>
- Poranen, M. M., Daugelavičius, R., & Bamford, D. H. (2002). Common Principles in Viral Entry. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 521-538. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160643>
- Pratt, A. J., & MacRae, I. J. (2009). The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 17897-17901. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900012200>
- Pütz, M. M., Midgley, C. M., Law, M., & Smith, G. L. (2006). Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of *Vaccinia* virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 12(11), 1310-1315. <https://doi.org/10.1038/nm1457>
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell*, 123(4), 621-629. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>

- Resch, W., Hixson, K. K., Moore, R. J., Lipton, M. S., & Moss, B. (2007). Protein composition of the vaccinia virus mature virion. *Virology*, 358(1), 233-247. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.025>
- Roberts, K. L., Breiman, A., Carter, G. C., Ewles, H. A., Hollinshead, M., Law, M., & Smith, G. L. (2009). Acidic residues in the membrane-proximal stalk region of vaccinia virus protein B5 are required for glycosaminoglycan-mediated disruption of the extracellular enveloped virus outer membrane. *Journal of General Virology*, 90(7), 1582-1591. <https://doi.org/10.1099/vir.0.009092-0>
- Roberts, K. L., & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in Microbiology*, 16(10), 472-479. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.009>
- Satheshkumar, P. S., & Moss, B. (2009). Characterization of a Newly Identified 35-Amino-Acid Component of the Vaccinia Virus Entry/Fusion Complex Conserved in All Chordopoxviruses. *Journal of Virology*, 83(24), 12822-12832. <https://doi.org/10.1128/JVI.01744-09>
- Sattentau, Q. (2008). Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(11), 815-826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1972>
- Schin, A. M., Diesterbeck, U. S., & Moss, B. (2021). Insights into the Organization of the Poxvirus Multicomponent Entry-Fusion Complex from Proximity Analyses in Living Infected Cells. *Journal of Virology*, 95(16). <https://doi.org/10.1128/JVI.00852-21>
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., Helenius, A., & Mercer, J. (2011). Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *The EMBO Journal*, 30(17), 3647-3661. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.245>
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., & Mercer, J. (2012). Poxvirus host cell entry. *Current Opinion in Virology*, 2(1), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.007>
- Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., & McFadden, G. (2003). Poxviruses and Immune Evasion. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 377-423. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141049>
- Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S. K., Koča, J., Rose, A. S. (2021). Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W431-W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>
- Senkevich, T. G., & Moss, B. (2005a). Vaccinia Virus H2 Protein Is an Essential Component of a Complex Involved in Virus Entry and Cell-Cell Fusion. *Journal of Virology*, 79(8), 4744-4754. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4744-4754.2005>
- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E., & Moss, B. (2005b). Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), 18572-18577. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509239102>

- Senkevich, T. G., Ward, B. M., Moss, B. (2004). Vaccinia Virus Entry into Cells Is Dependent on a Virion Surface Protein Encoded by the A28L Gene. *Journal of Virology*, 78(5), 2357-2366. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.5.2357-2366.2004>
- Senkevich, T. G., White, C. L., Koonin, E. V., Moss, B. (2002). Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6667-6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.062163799>
- Sezen, K., & Demirbağ, Z. (2005). Entomopoksvirüsler ve Biyolojik Kontrol. *Turkish Journal of Parasitology*, 29(4), 280-286.
- Shinoda, K., Wyatt, L. S., Moss, B. (2010). The neutralizing antibody response to the vaccinia virus A28 protein is specifically enhanced by its association with the H2 protein. *Virology*, 405(1), 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.025>
- Sinha, N. K., Iwasa, J., Shen, P. S., Bass, B. L. (2018). Dicer uses distinct modules for recognizing dsRNA termini. *Science*, 359(6373), 329-334. <https://doi.org/10.1126/science.aag0921>
- Skehel, J. J., Wiley, D. C. (2000). Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 531-569. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
- Smith, G. L., Vanderplasschen, A., & Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*, 83(12), 2915-2931. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-2915>
- Sobhy, H. (2017). A comparative review of viral entry and attachment during large and giant dsDNA virus infections. *Archives of Virology*, 162(12), 3567-3585. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3497-8>
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J., Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 10(12), 1026-1032. <https://doi.org/10.1038/nsb1016>
- Srinivasan Rajsri, K., Rao, M. (2022). Poxvirus-driven human diseases and emerging therapeutics. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 9. <https://doi.org/10.1177/20499361221136751>
- Stagsted, L. V. W., Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017). The agotrons: Gene regulators or Argonaute protectors? *BioEssays*, 39(4). <https://doi.org/10.1002/bies.201600239>
- Su, H.-P., Garman, S. C., Allison, T. J., Fogg, C., Moss, B., Garboczi, D. N. (2005). The 1.51-Å structure of the poxvirus L1 protein, a target of potent neutralizing antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4240-4245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501103102>
- Su, H.-P., Golden, J. W., Gittis, A. G., Hooper, J. W., Garboczi, D. N. (2007). Structural basis for the binding of the neutralizing antibody, 7D11, to the poxvirus L1 protein. *Virology*, 368(2), 331-341. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.042>

- Sun, H., Chen, X., & Wang, Y. (2025). Strategies for the Modification of Vaccinia Virus towards a Better Vaccine Vector. *Zoonoses*, 5(1). <https://doi.org/10.15212/ZOONOSSES-2024-0044>
- Szweykowska-Kulińska, Z., Jarmołowski, A., & Figlerowicz, M. (2003). RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Acta biochimica Polonica*, 50(1), 217-229.
- Şalva, E. (2009). *siRNA için Uygun Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi; İn Vitro ve İn Vivo Çalışmalar*. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tak, A. I., Americo, J. L., Diesterbeck, U. S., & Moss, B. (2021). Loss of the Vaccinia Virus 35-Amino-Acid Hydrophobic O3 Protein Is Partially Compensated by Mutations in the Transmembrane Domains of Other Entry Proteins. *Journal of Virology*, 95(8). <https://doi.org/10.1128/JVI.02228-20>
- Takatsuka, J., Okuno, S., Ishii, T., Nakai, M., & Kunimi, Y. (2010). Fitness-related traits of entomopoxviruses isolated from *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae) at three localities in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.010>
- Thézé, J., Takatsuka, J., Li, Z., Gallais, J., Doucet, D., Arif, B., Nakai, M., & Herniou, E. A. (2013). New Insights into the Evolution of Entomopoxvirinae from the Complete Genome Sequences of Four Entomopoxviruses Infecting *Adoxophyes honmai*, *Choristoneura biennis*, *Choristoneura rosaceana*, and *Mythimna separata*. *Journal of Virology*, 87(14), 7992-8003. <https://doi.org/10.1128/jvi.00453-13>
- Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J.-B., Park, J.-E., Heo, I., Kim, V. N., & Patel, D. J. (2014). A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Molecular Cell*, 53(4), 606-616. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.003>
- Townsley, A. C., Senkevich, T. G., & Moss, B. (2005). The Product of the Vaccinia Virus L5R Gene Is a Fourth Membrane Protein Encoded by All Poxviruses That Is Required for Cell Entry and Cell-Cell Fusion. *Journal of Virology*, 79(17), 10988-10998. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.10988-10998.2005>
- Turner, P. C., Dilling, B. P., Prins, C., Cresawn, S. G., Moyer, R. W., & Condit, R. C. (2007). Vaccinia virus temperature-sensitive mutants in the A28 gene produce non-infectious virions that bind to cells but are defective in entry. *Virology*, 366(1), 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.060>
- Turner, P. C., & Moyer, R. W. (2008). The vaccinia virus fusion inhibitor proteins SPI-3 (K2) and HA (A56) expressed by infected cells reduce the entry of superinfecting virus. *Virology*, 380(2), 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.020>
- Vago, C. (1963). A new type of insect virus. *Insect Pathol*, 275-276.
- Vanderplasschen, A., & Smith, G. L. (1997). A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind

- to different cellular receptors. *Journal of Virology*, 71(5), 4032-4041. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.4032-4041.1997>
- Vergani-Junior, C. A., Tonon-da-Silva, G., Inan, M. D., & Mori, M. A. (2021). DICER: structure, function, and regulation. *Biophysical Reviews*, 13(6), 1081-1090. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00902-w>
- Wagenaar, T. R., Ojeda, S., & Moss, B. (2008). Vaccinia Virus A56/K2 Fusion Regulatory Protein Interacts with the A16 and G9 Subunits of the Entry Fusion Complex. *Journal of Virology*, 82(11), 5153-5160. <https://doi.org/10.1128/JVI.00162-08>
- Wei, jianming, Zhang, C., Gao, B., Zheng, Y., Feng, W., Crabbe, M. J. C., Li, Y., & Zhang, D. (2022). *Research Advances in Argonaute Proteins*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2000932/v1>
- Welker, N. C., Maity, T. S., Ye, X., Aruscavage, P. J., Krauchuk, A. A., Liu, Q., & Bass, B. L. (2011). Dicer's Helicase Domain Discriminates dsRNA Termini to Promote an Altered Reaction Mode. *Molecular Cell*, 41(5), 589-599. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.005>
- White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3), 189-219. <https://doi.org/10.1080/10409230802058320>
- White, J., Matlin, K., & Helenius, A. (1981). Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. *The Journal of cell biology*, 89(3), 674-679. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.3.674>
- Williams, T., Bergoin, M., & Van Oers, M. M. (2017). Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 4-22. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.001>
- Winter, J., Hall, R. L., & Moyer, R. W. (1995). The Effect of Inhibitors on the Growth of the Entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in *Lymantria dispar* (Gypsy Moth) Cells. *Virology*, 211(2), 462-473. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1428>
- Wojnicka, M., Szczepanska, A., & Kurzynska-Kokorniak, A. (2020). Unknown Areas of Activity of Human Ribonuclease Dicer: A Putative Deoxyribonuclease Activity. *Molecules*, 25(6), 1414. <https://doi.org/10.3390/molecules25061414>
- Wolfe, C. L., & Moss, B. (2011). Interaction between the G3 and L5 proteins of the vaccinia virus entry-fusion complex. *Virology*, 412(2), 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.014>
- Wolfe, C. L., Ojeda, S., & Moss, B. (2012). Transcriptional Repression and RNA Silencing Act Synergistically To Demonstrate the Function of the Eleventh Component of the Vaccinia Virus Entry-Fusion Complex. *Journal of Virology*, 86(1), 293-301. <https://doi.org/10.1128/JVI.05935-11>

- Wolffe, E. J., Vijaya, S., & Moss, B. (1995). A Myristylated Membrane Protein Encoded by the Vaccinia Virus L1R Open Reading Frame Is the Target of Potent Neutralizing Monoclonal Antibodies. *Virology*, 211(1), 53-63. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1378>
- Wolffe, E. J., Weisberg, A. S., & Moss, B. (2001). The Vaccinia Virus A33R Protein Provides a Chaperone Function for Viral Membrane Localization and Tyrosine Phosphorylation of the A36R Protein. *Journal of Virology*, 75(1), 303-310. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.1.303-310.2001>
- Wu, J., Yang, J., Cho, W. C., & Zheng, Y. (2020). Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *Journal of Advanced Research*, 24, 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.017>
- Yang, F., Lin, S., Chen, Z., Yue, D., Yang, M., He, B., Cao, Y., Dong, H., Li, J., Zhao, Q., & Lu, G. (2023). Structural basis of poxvirus A16/G9 binding for sub-complex formation. *Emerging Microbes & Infections*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2179351>
- Yoder, J. D., Chen, T. S., Gagnier, C. R., Vemulapalli, S., Maier, C. S., & Hruby, D. E. (2006). Pox proteomics: mass spectrometry analysis and identification of Vaccinia virion proteins. *Virology Journal*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-10>
- Yu, H., Resch, W., & Moss, B. (2025a). Poxvirus structural biology for application to vaccine design. *Trends in Immunology*, 46(6), 455-470. <https://doi.org/10.1016/j.it.2025.04.002>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi. *Cell*, 101(1), 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zhang, H. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO Journal*, 21(21), 5875-5885. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf582>
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve Orta öğrenimini Oğuzhan İlkokulunda bitirdikten sonra lise eğitimine 2013 yılında Mardin Nusaybin Anadolu Lisesinde tamamladı. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde 2017-2018 öğretim yılında lisans eğitimine başladı ve 2021 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında tezli yüksek lisans programına başladı. Orta seviyede İngilizce bilmektedir. Yüksek lisans eğitimi sırasında TÜBİTAK 2210A burs programı ve ESPS projesi tarafından desteklendi.

Inan Bektas, K., Nalcaoğlu, A., Ceylan, E., Çağlar P., **Ağırman S.**, Sivri, N. S., Gunes S., Kaya, A., Çanakci S. ve Belduz A. O. (2023). Isolation and characterization of detergent-compatible amylase-, protease-, lipase-, and cellulase-producing bacteria. *Braz J Microbiol* **54**, 725–737 <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00944-0>

Ağırman S., Demirbağ Z., Muratoğlu H. (2025). *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Giriş Füzyon Kompleksi Genlerinin Sustainılması. 26. Ulusal Biyoloji Kongresi, Muğla, Türkiye03-07 Eylül 2025.