

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) MUHTEMEL KASPAZ ORF'SİNİN
(AMV063) FONKSİYONEL ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Funda BİLGİLİ

OCAK 2020

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) MUHTEMEL KASPAZ ORF'SİNİN
(AMV063) FONKSİYONEL ANALİZİ

Funda BİLGİLİ

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30 / 12 / 2019

Tezin Savunma Tarihi : 20 / 01 / 2020

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalında
Funda BİLGİLİ Tarafından Hazırlanan**

***AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) MUHTEMEL KASPAZ ORF'SİNİN
(AMV063) FONKSİYONEL ANALİZİ***

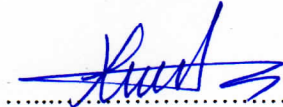
**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 03 / 01 / 2020 gün ve 1835 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Üye : Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Üye : Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ


.....

.....

.....

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Muhtemel Kaspaz ORF’sinin (AMV063) Fonksiyonel Analizi” başlıklı tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlandı. Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi (Proje numarası: FYL-2018-7782).

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoteknoloji Ana Bilim Dalına yüksek lisans öğrencisi olarak 2018 yılında başlamamla birlikte, üniversite ve akademik yaşamıma destekleri, engin bilgi ve deneyimleriyle daima yanımda olan, bana ve eğitim öğretim hayatıma bıraktığı kıymetli izleri için danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvar imkanlarından yararlandığım Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve Sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, araştırmalarıma ve bana kattığı tüm değerli bilgi ve tecrübeleri için; yüksek lisans tez savunmamda yer alan değerli tez jürisi hocalarıma ve deneyimlerini benimle paylaşan kıymetli laboratuvar arkadaşlarıma yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Bilim ve akademisyenlik ile tanışmama vesile olan, daimi danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Barış Emre DAYANÇ’a, bilgi, tecrübe ve inisiyatifleri için teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimime başladığım ilk günden beri maddi ve manevi her koşulda yanımda olan, tez süresince mental danışmanlığımı yapan sevgili aile üyelerim Mehmet-Hatice-Tuba-Nisa-Nursena-Melisa-Akif-Eren-Enes BİLGİLİ’ye, bana ve çalışmalarına olan tüm desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite ve akademik hayatımın her sürecinde 2012 yılından beri yanımda olan, engin bilgileriyle bana daima destek olan, yol arkadaşım sevgili Sinan TETİKOĞLU’na, bana ve çalışmalarına olan tüm desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Funda BİLGİLİ

Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Muhtemel Kaspaz ORF’sinin (AMV063) Fonksiyonel Analizi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 20/01/2020

Funda BİLGİLİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1.1. Giriş.....	1
1.2. Poksvirüsler.....	2
1.2.1. Poksvirüslerin Genel Özellikleri	2
1.2.2. Poksvirüslerin Genom Özellikleri	4
1.2.3. Poksvirüslerin Enfektivitesi	5
1.3. Entomopoksvirüsler.....	6
1.4. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> (AMEV).....	9
1.4.1. AMV063 ORF'si.....	10
1.5. Apoptozis.....	10
1.6. Kaspazlar	14
1.6.1. Kaspaz-2	16
1.7. Çalışmanın Amacı	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Virüs ve Hücrelerin Tedariği.....	19
2.1.1. Stoktan Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması.....	19
2.1.2. AMEV Virüsünün Çoğaltılması.....	20
2.2. AMV063 Proteininin Prokaryotik Sistemde İfadesi	20
2.2.1. AMEV Enfekte Hücrelerden Genomik DNA İzolasyonu.....	20
2.2.2. AMEV Muhtemel Kaspaz-2 DNA Dizisinin (AMV063) Klonlama Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu.....	21

2.2.2.1.	AMV063 DNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması.....	21
2.2.2.2.	AMV063 DNA'sı PCR Ürününün Klonlama Vektörü pGEM-T Easy Vektöre Ligasyonu.....	22
2.2.2.3.	Kalsiyum Klorür (CaCl ₂) Metodu ile Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	23
2.2.2.4.	AMV063 DNA'sını İçeren Rekombinant Vektörün Kompetent Hücrelere Transformasyonu.....	24
2.2.2.5.	Plazmid DNA İzolasyonu.....	24
2.2.2.6.	Transformasyonun Restriksiyon Analiziyle Doğrulanması.....	25
2.2.3.	Klonlama Vektöründeki AMV063 DNA'sının İfade Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu.....	26
2.2.3.1.	Kit ile Plazmid DNA İzolasyonu.....	26
2.2.3.2.	İzole Edilen pGEM-AMV063 ve İfade Vektörü pET28a'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi.....	27
2.2.3.3.	Restriksiyon Enzimlerle Kesilen DNA'ların Agaroz Jelden Temizlenmesi.....	28
2.2.3.4.	AMV063 DNA'sının İfade Vektörü pET28a ile Ligasyonu.....	28
2.2.3.5.	pET28-AMV063 vektörün <i>Escherichia coli</i> DH10β Kompetent Hücrelerine Transformasyonu.....	29
2.2.3.6.	<i>Escherichia coli</i> DH10β Hücrelerine Transform Edilen pET28-AMV063 Vektörün Restriksiyon Analiziyle Doğrulanması.....	29
2.2.4.	AMV063 DNA'sını İçeren İfade Vektörünün <i>Escherichia coli</i> BL-21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu.....	30
2.2.5.	<i>Escherichia coli</i> BL-21 (DE3) Hücrelerinde AMV063 Proteininin İfadesi.....	30
2.2.6.	AMV063 Proteininin His Kuyruğu Sayesinde Saflaştırılması.....	30
2.2.7.	AMV063 Proteininin İfadesinin SDS-PAGE ile Gösterilmesi	31
2.2.8.	AMV063 Proteininin Western Blot Analizi.....	33
2.2.9.	Diyaliz Yöntemiyle AMV063 Proteininin Temizlenmesi.....	34
2.3.	Muhtemel Kaspaz ORF'si (AMV063) Silinmiş Rekombinant Virüsün Oluşturulması.....	34
2.3.1.	AMV063 ORF'sinin Yukarı ve Aşağı Sıralarının ve <i>gfp</i> Dizisinin PCR ile Çoğaltılması.....	35
2.3.2.	AMV063 ORF'sinin Yukarı ve Aşağı Sıralarının Klonlanması	35
2.3.3.	<i>gfp</i> DNA'sını İçeren Transfer Vektörünün Oluşturulması.....	36
2.3.4.	Transfer Vektörün LD652 Hücrelerine Transfeksiyonu	38
2.3.5.	Rekombinant Virüsün Çoğaltılması	39
2.3.6.	Rekombinant AMEV Virüsünün (Am-Δ063/ <i>gfp</i>) Saflaştırılması.....	39

2.3.7.	Rekombinant AMEV (AmΔ063/ <i>gfp</i>) Virüsün Büyük Hacimlerde Çoğaltılması..	41
2.3.8.	Çoğaltılan Virüs Miktarlarının Belirlenmesi.....	42
2.4.	AMV063 Proteininin ve AmΔ063/ <i>gfp</i> Virüsün Kaspaz-2 Aktivitesinin Araştırılması	42
2.5.	AMV063 Proteininin ve AmΔ063/ <i>gfp</i> Virüsünün Apoptozis Etkisinin TUNEL Testi ile belirlenmesi	44
3.	BULGULAR	46
3.1.	Virüslerin LD652 Hücrelerinde Çoğaltılması ve Miktarlarının Tayini.....	46
3.2.	AMV063 Proteinin Prokaryotik Sistemde İfadesi.....	46
3.2.1.	Enfekte Hücrelerden Genomik DNA İzolasyonu.....	46
3.2.2.	AMV063 Dizisinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması	47
3.2.3.	AMV063 Dizisinin Klonlama Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu.....	47
3.2.4.	Klonlama Vektöründeki AMV063 Dizisinin İfade Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu.....	49
3.2.5.	Hazırlanan İfade Vektörünün <i>Escherichia coli</i> BL-21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu ve Proteinin İfadesi	50
3.2.6.	AMV063 Proteininin Saflaştırılması ve Western-Blot analizi.....	51
3.3.	Muhtemel Kaspaz Geni (AMV063) Silinmiş Rekombinant Virüsün Oluşturulması..	53
3.3.1.	AMV063 Yukarı ve Aşağı Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması	53
3.3.2.	AMV063 Yukarı ve Aşağı Dizilerinin Klonlanması.....	53
3.3.3.	<i>gfp</i> İşaret Dizisini İçeren Transfer Vektörünün Oluşturulması	54
3.3.4.	Transfer Vektörün LD652 Hücrelerine Transfeksiyonu	59
3.3.5.	Rekombinant AMEV Virüsünün (AmΔ063/ <i>gfp</i>) Saflaştırılması ve Virüs Miktarının Belirlenmesi	59
3.4.	AMV063 Proteininin Kaspaz-2 Aktivitesi	61
3.5.	AMV063 Proteininin Apoptotik Etkisinin TUNEL Testi ile Belirlenmesi.....	63
4.	TARTIŞMA.....	65
5.	SONUÇLAR	69
6.	ÖNERİLER	70
7.	KAYNAKÇA	71
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS (AMEV) MUHTEMEL KASPAZ
ORF'SİNİN (AMV063) FONKSİYONEL ANALİZİ

Funda BİLGİLİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU
2020, 80 Sayfa

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV), tarımsal açıdan önemli zararlıları enfekte ettiği için, AMEV'nin genomunda yapılan genetik mühendisliği çalışmalarıyla hem bu virüslerin biyoteknolojik ajan olarak kullanımının artırılması amaçlanmakta hem de henüz keşfedilmeyen gen fonksiyonları aydınlatılmaktadır. AMEV'nin, LD652 ve CF-70-B2 gibi böcek hücre hatlarını enfekte edilebildiği ve viral yaşam döngüsünü devam ettirmek için apoptozise sebep olduğu gösterilmiştir. Kaspazlar, sistein proteaz ailesinin üyeleridir ve apoptozisin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. AMEV'ye ait muhtemel kaspaz proteinini kodladığı belirlenen 63. ORF'nin, AMEV protein kinazlarıyla etkileşimi belirlenmiş olmasına rağmen, AMV063 proteininin apoptozis ve kaspaz aktivitesi daha önce araştırılmamıştır.

Bu tez kapsamında, AMEV063 ORF'sinin fonksiyonel analizi yapıldı. AMV063 proteini prokaryotik sistemde ifade edildi. Homolog rekombinasyonla AMV063 dizisi silinen nakavt *AmΔ063/gfp* oluşturuldu. Apoptozise duyarlı CF-70-B2 hücreleri, AMV063 proteini ve *AmΔ063/gfp* kombinasyonları ile muamele edilerek apoptozis ve kaspaz-2 aktiviteleri araştırıldı. AMV063 proteini ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinde, kaspaz-2 ve TUNEL aktivitesi belirlenemedi. *AmΔ063/gfp* virüsü ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinin kaspaz-2 ve TUNEL aktivitesi, kontrol *AmΔsph/gfp* virüsü ile muamele edilenlere göre önemli derecede azaldı. Bu sonuçlar, AMV063 dizisinin kaspaz-2 proteinini kodladığını ve doğal sisteminde üretilen AMV063 proteininin, kaspaz-2 ve apoptozis aktivitesine sahip olduğunu açık bir şekilde gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Böcek virüsleri, *Amsacta moorei entomopoxvirus*, AMV063, *AmΔ063/gfp*, kaspaz-2, apoptozis

Master Thesis

SUMMARY

FUNCTIONAL ANALYSIS OF PUTATIVE *AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* (AMEV) CASPASE ORF (AMV063)

Funda BİLGİLİ

Karadeniz Technical University
The Institute of Science
Molecular Biotechnology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Hacer MURATOĞLU
2020, 80 Pages

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) infects agriculturally important pests. Genetic engineering studies on the genome of AMEV helped to reveal undiscovered gene functions and also its potential to be used as biotechnological agent. It has been shown that AMEV infects and causes apoptosis of insect cells, such as Ld652 and CF-70-B2. Caspases are members of cysteine protease family and have important roles in apoptosis. Although the interaction of AMEV putative caspase ORF (AMV063) with protein kinase of AMEV has been determined, the apoptosis and caspase activity of these proteins has not been investigated.

In this thesis, functional analysis of AMEV063 ORF was performed. AMV063 protein was expressed in the prokaryotic system. Knock-out mutant, Am Δ 063/*gfp* was created by deleting its sequence with homologue recombination. Apoptosis and caspase-2 activities of apoptosis sensitive CF-70-B2 cells were investigated by treating AMV063 protein and Am Δ 063/*gfp* mutant with different combinations. Caspase-2 and TUNEL activity could not be determined in AMV063 protein the treated cells. Significant decrease in caspase-2 and TUNEL activity was observed in the cells treated with Am Δ 063/*gfp* compared to the same cell line treated with Am Δ sph/*gfp*. These results clearly indicate that AMV063 sequence encodes the caspase-2 protein and only AMV063 protein produced in its natural system has caspase-2 and apoptosis activity.

Keywords: Insect viruses, *Amsacta moorei entomopoxvirus*, AMV063, Am Δ 063/*gfp*, caspase-2, apoptosis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Poksvirüslerin görünümü	3
Şekil 2. Entomopoksvirüslere ait genel görünüm	6
Şekil 3. Kaspaz bağımlı apoptotik sürecin gösterimi	13
Şekil 4. Kaspaz-2 enziminin domeinlerinin gösterimi	16
Şekil 5. pGEM-T Easy vektörün haritası	23
Şekil 6. pET-28a ifade vektörünün haritası	26
Şekil 7. pBlueScript SK(-) vektörün haritası	36
Şekil 8. Kaspaz-2'nin aktivitesinin florometrik tayini	43
Şekil 9. CF-70-B2 hücrelerinin AMV063 proteini ve AmΔ063/ <i>gfp</i> virüs ile muamelesi.....	44
Şekil 10.AMEV genomik DNA izolasyonunun agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 11.AMV063 dizisinin PCR yöntemi ile çoğaltılması.....	47
Şekil 12.pGEM-T Easy Vektörüne klonlanan AMV063 DNA'sının transformasyonu..	48
Şekil 13.pGEM-T Easy Vektörüne klonlanan AMV063 DNA dizisinin restriksiyon analizi..	48
Şekil 14.pGEM-AMV063 ve pET-28 vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Xho</i> I enzimleri ile kesimi.	49
Şekil 15.pET-28 vektörüne klonlanan AMV063 DNA'sının restriksiyon analizi.	50
Şekil 16. <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) hücrelerindeki pET-28-AMV063 vektörünün varlığının restriksiyon analizi ile doğrulanması.....	51
Şekil 17.AMV063 proteininin CBB boyası ile boyanarak görüntülenmesi.	52
Şekil 18.AMV063 proteininin Western-Blot analizi.....	52
Şekil 19.AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin PCR ile çoğaltılması.....	53
Şekil 20.pGEM-T vektöründeki AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin ve <i>gfp</i> DNA dizisinin restriksiyon enzimleriyle kesimi.....	54
Şekil 21.pGEM-AMV063up ve pBluescript SK(-) vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Xba</i> I enzimleri ile restriksiyon kesimi..	55
Şekil 22.pBluescript SK(-) vektörüne klonlanan AMV063 yukarı dizisinin restriksiyon kesimi.	56
Şekil 23.pBS-AMV063up ve pGEM-AMV063down vektörünün <i>Kpn</i> I ve <i>Hind</i> III enzimleri ile restriksiyon kesimi..	57
Şekil 24.pBS-AMV063up vektörüne klonlanan AMV063 aşağı dizisinin restriksiyon kesimi.	57
Şekil 25.pBS-AMV063updown ve pGEM- <i>gfp</i> vektörün <i>Eco</i> RI enzimi ile restriksiyon kesimi..	58
Şekil 26.pBS-AMV063updown vektörüne klonlanan <i>gfp</i> dizisini restriksiyon kesimi	58

Şekil 27.AmΔ063/ <i>gfp</i> virüs ile enfekte edilmiş LD652 hücrelerinin mikroskop görüntüleri	59
Şekil 28.Rekombinant AMEV ile enfekte edilen LD652 hücrelerinin mikroskop görüntüleri..	60
Şekil 29.Plak deneyi sonucunda saflaşan rekombinant AmΔ063/ <i>gfp</i> virüsün PCR analizi.	61
Şekil 30.Muamelerden sonra, CF-70-B2 hücrelerinin görünümü.	62
Şekil 31.AMV063 Proteini ve AmΔ063/ <i>gfp</i> virüs ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinin kaspaz-2 aktivite grafikleri.....	63
Şekil 32.AMV063 Proteini ve AmΔ063/ <i>gfp</i> virüs ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinin TUNEL aktivite grafikleri.....	64



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Poksvirüslerin sınıflandırılması	4
Tablo 2. Entomopoksvirüslerin taksonomik sınıflandırılması	8
Tablo 3. Apoptozis ve nekrozisdeki morfolojik farklar	12
Tablo 4. Kaspaz ailesinin üyeleri	15
Tablo 5. AMV063 DNA'sını çoğaltmak için kullanılan primerler	21
Tablo 6. AMV063 DNA'sını çoğaltmak için kullanılan PCR karışımının içeriği ve programı	22
Tablo 7. <i>EcoRI</i> Restriksiyon enzimi ile kesim prosedürü	25
Tablo 8. <i>BamHI</i> ve <i>XhoI</i> restriksiyon enzimleriyle kesim prosedürü	27
Tablo 9. AMV063 DNA'sı ve pET28a vektörünün ligasyon reaksiyonu karışımı	29
Tablo 10. AMV063 dizisinin yukarı ve aşağı bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primerler	35
Tablo 11. Rekombinant virüs saflaştırmada kullanılan plak sayıları	41

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

AMEV:	<i>Amsacta moorei</i> Entomopoxvirüs
AmΔ063/ <i>gfp</i> :	AMV063 ORF'si Askı Bölgeleri Arasında <i>gfp</i> Dizisi İçeren AMEV
Amp ⁺ :	Ampisilin İçeren
AMV063:	AMEV'nin 63. ORF'sinin Protein Ürünü
AT:	Adenin ve Timin Nükleotidleri
bp:	Baz Çifti
CaCl ₂ :	Kalsiyum Klorür
CF-70-B2:	<i>Choristoneura fumiferana</i> 'den Türetilen Böcek Hücre Kültürü
ddH ₂ O:	İki Kere Saflaştırılmış Su
dH ₂ O:	Saf su
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DNazI:	DNA'yı Kesen Enzim
dNTP:	Deoksi Nükleotit Trifosfat
dUTP:	Deoksiurasil Trifosfat
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPDA:	Son Nokta Seyreltme Deneyi (End Point Dilution Assay)
EPV:	Entomopoksvirüs
EtBr:	Etidyum Bromür
FBS:	Fetüs Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
GFP:	Yeşil Floresan Protein
<i>gfp</i> :	Yeşil Floresan Proteini Kodlayan Gen

HCl:	Hidrojen Klorik Asit
ICTV:	Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi
IPTG:	İzopiripil Beta-D-tiyogalaktozid
Kan ⁺ :	Kanamisin İçeren
kb:	Kilo Baz Çifti
kDa:	Kilo Dalton
LB:	Luria Bertani
LD652:	<i>Lymantria dispar</i> 'dan Türetilen Böcek Hücre Kültürü
M:	Molar
MgCl ₂ :	Magnezyum Klorür
mM:	Milimolar
MOI:	Hücre Başına Düşen Enfeksiyon Ünitesi (Multiplicity of Infection)
mRNA:	Mesajcı RNA
MsEPV:	<i>Melanoplus sanguinipes entomoxvirus</i>
NaOH:	Sodyum Hidroksit
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre
ORF:	Açık Okuma Çerçevesi
PAGE:	Poliakrilamid Jel Elektrophorezi
PBS:	Fosfat Tuzu Tamponu (Phosphate Saline Buffer)
pBS-AmΔ063/ <i>gfp</i> :	AMV063 ORF'si Askı Bölgeleri Arasında <i>gfp</i> Dizisi İçeren pBluescript SK(-) vektörü
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pfu:	Plak Oluşturan Ünite
RNA:	Ribonükleik Asit
RNaz:	RNA'yı Kesen Enzim
rpm:	Dakikadaki Dönme Sayısı (Round Per Minute)
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE:	SDS İçeren Poliakrilamid Jel Elektroföresi
TAE:	Tris-Asetat-EDTA
TENS:	Tris-HCl, EDTA, NaOH ve SDS İçeren Tampon
TUNEL:	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Kırık Uç Etiketleme
U:	Ünite
<i>AmΔ063/gfp</i> :	Muhtemel Kaspaz Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
<i>AmΔsph/gfp</i> :	Sferoidin Geni Silinmiş Rekombinant AMEV
VDVAD:	Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp Aminoasitlerini İçeren Peptid
xg:	Dünyanın Yerçekimi İvmesi
X-gal:	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid
λ_{max} :	Maksimum Işıma Yapan Dalga Boyu
°C:	Santigrat Derece
μ l:	Mikrolitre
μ m:	Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri (NCLDV) olarak da bilinen poksvirüsler, enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmasında replike olan büyük, karmaşık, çift iplikli DNA virüsleridir (Buller ve Palumbo, 1991). Poxviridae familyası Chordopoxvirinae ve Entomopoxvirinae olarak iki alt familyadan oluşmaktadır. Chordopoxvirinae üyeleri, omurgalıları enfekte ederken Entomopoxvirinae üyeleri omurgasızları enfekte etmektedir. Bu alt aile, enfekte ettikleri böcek takımlarına göre, Alphaentomopoxvirus (Coleoptera), Betaentomopoxvirus (Lepidoptera) ve Gammaentomopoxvirus (Diptera) olmak üzere üç cinsten oluşmaktadır. *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV), entomopoksvirüslerin tip türüdür (Bawden vd., 2000). AMEV, ilk olarak Lepidoptera ordosuna ait kırmızı tüylü tırtıldan (*Amsacta moorei*) izole edilmiştir (Roberts, 1968). AMEV'nin LD652 ve EAA-BTI gibi böcek hücre hatlarında kolayca çoğaltılıp değiştirilebilir olması, onu viroloji çalışmaları için elverişli yapmaktadır (Becker vd., 2004).

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü; çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle nitelendirilebilen, sonucunda hücre ölümüne yol açan aktif bir süreçtir (Chitnis vd., 2008). Sistein proteaz ailesinin üyesi olan kaspazlar, apoptozisin düzenlenmesi ve icrasında çok önemli bir rol oynar. Kaspazlar, inaktif zimogenerler (prokaspazlar) olarak hücrelerde bulunur ve apoptotik uyarılara yanıt olarak aktive edilir. Bu enzimler, inflammatör (Kaspaz-1, -4, -5 ve -11) ve apoptotik olmak üzere iki gruba ayrılır. Apoptozise yol açan kaspazlar başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlardır (Kaspaz-3, -6 ve -7). Başlatıcı kaspazlar, ölüm reseptör sinyalleri (dışardan gelen) veya mitokondriyal (içerden gelen) yollarla aktive edilir. Başlatıcı kaspazların aktivasyonu sonucunda, efektör kaspazlar aktive edilir. Aktif efektör kaspazları; hücre hacminin azalması, kromatin yoğunlaşması, nükleusun parçalanması, fosfatidilserinlerin hücre yüzeyine çıkması, DNA parçalanması, hücre zarının kabarması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi apoptozis ile ilişkili morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin yönlendirilmesinde etkilidir (Fink ve Cookson, 2005). Birçok virüs, hem *in vivo* hem de *in vitro* şartlarda hücrelerdeki apoptozisi doğrudan veya dolaylı olarak uyarır

(Chejanovsky ve Gershburg, 1995). Çoğu viral konakçı da viral replikasyonu ve yayılmayı sınırlandıran, hücre ölümüne doğrudan yol açabilen etkili bir antiviral mekanizmaya sahiptir. Konak savunmasına yanıt vermek için birçok virüs, anti-apoptotik proteinleri sentezler. Bu proteinler virüsün başarılı ve yüksek dozda enfeksiyon oluşturmaya izin verir. Kaspazlar, virüslerin çoğalması, olgunlaşması veya enfekte hücreden virüs salınımı yoluyla virüslerin yayılması için gereklidir (Best ve Bloom, 2004).

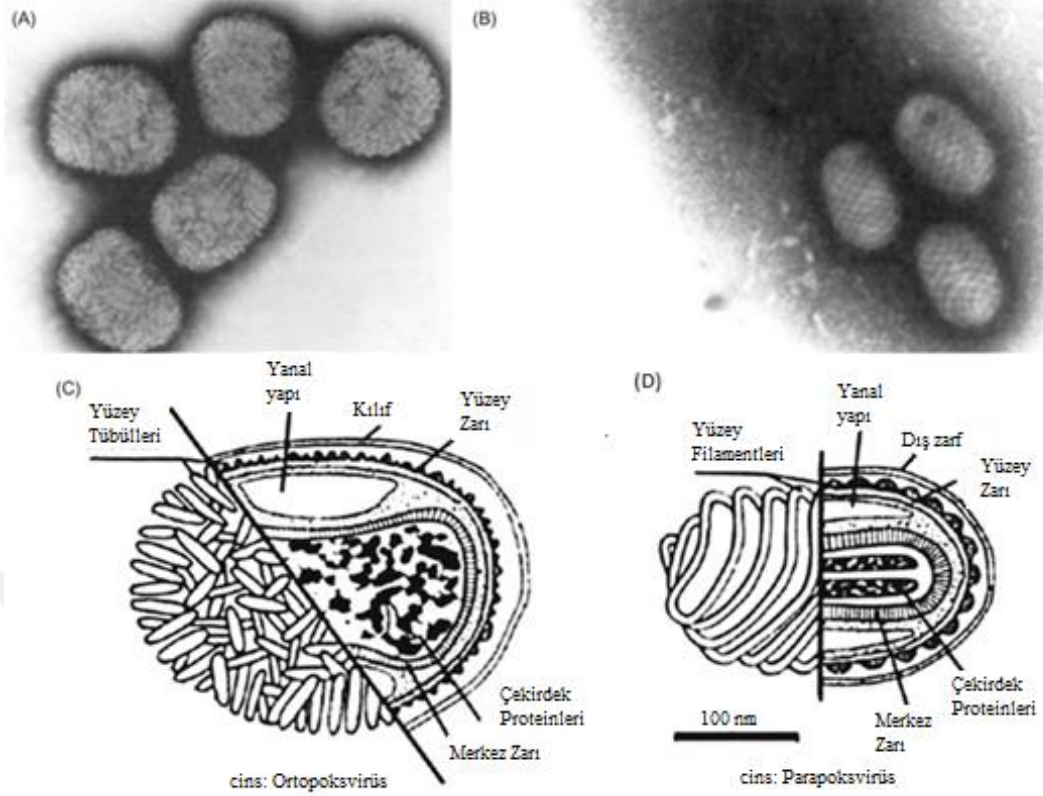
AMEV'nin AMV063 kodlu açık okuma zinciri (ORF), 617 baz uzunluğunda olup 205 aminoasit kodlamaktadır. AMV063 proteininin varsayılan Kaspaz-2 olabileceği daha önceden ortaya atılmıştır (Bawden vd., 2000). Danışmazoğlu ve arkadaşları, AMV063 dahil olmak üzere, bir grup AMEV gen ürünü proteinin, bazı poksvirüslerde apoptozis düzenlenmesinde rol aldığı bilinen protein kinazlarla etkileştiğini göstermiştir (Danismazoglu vd., 2018). Tüm bu varsayım ve yaklaşımlara rağmen AMV063 ORF ürününün fonksiyonel analizi ve kaspaz aktivitesi henüz araştırılmamıştır.

Bu bilgiler ışığında bu tezde kapsamında, kaspaz proteini olabileceği düşünülen *Amsacta moorei entomopoxvirus* AMV063 proteininin kaspaz aktivitesinin virüsün konak enfektivitesinde ve apoptozis olayındaki rolü araştırılmıştır. Ayrıca, AMV063 ORF sırasının silinmesiyle oluşturulan rekombinant AMEV'nin, yaban tip virus ile karşılaştırılması yapılmış ve AMV063 ORF'sinin fonksiyonu araştırılmıştır.

1.2. Poksvirüsler

1.2.1. Poksvirüslerin Genel Özellikleri

Poksvirüsler, hem insanları hem de hayvanları enfekte edebilen bir virüs ailesidir. Işık mikroskobu ile görüntülenebilen en büyük hayvan virüsleridir (Buller ve Palumbo, 1991). Elektron mikroskobunda görüntülendiklerinde, filament veya oval yapılı nükleoprotein üzerinde dış zar içeren, 200-400 nm ölçülerinde, tuğla veya oval şekilde karakteristik morfolojiye sahip oldukları tespit edildi (Şekil 1) (Diven, 2001; Dubovi, 2016).



Şekil 1. Poksvirüslerin görünümü (MacLachlan ve Dubovi, 2011). A: Orthopoxvirus cinsine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü, B: Parapoxvirus cinsine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü, C: Orthopoxvirus cinsine ait şematik görüntü, D: Parapoxvirus cinsine ait şematik görüntü.

Bir viriyonun ağırlığının ortalama olarak %90'ı protein, %3'ü nükleik asit içermektedir. Büyük çift zincirli DNA ve etrafını çevreleyen çift katmanlı lipoprotein zara sahip olan poksvirüsler, özellikle konakçı hücrelerinin sitoplazmasında replike olmaları ile bilinirler (McFadden, 2005). Poksvirüsler konakçı hücrelerin sitoplazmasında kendi başlarına çoğalırlar. Viriyon konakçı hücreye dahil olduktan sonra, erken ve geç proteinlerini üretir. Bu replikasyon ürünleri konakçı hücrenin çekirdeğinden bağımsızdır ve ışık mikroskobu altında bazofilik boyalarla inklüzyon adacıkları halinde görünürler (Laliberte ve Moss, 2010). Poksvirüsler hücre morfolojisini bozma, sitoplazmada vakuoller oluşturma gibi dejenerasyonlar ile konakçı hücre üzerinde toksik etkilere neden olabilmektedir (Bawden vd., 2000). Daha önceleri poksvirüs üyeleri A, B ve C olarak gruplandırılırken, 2014 yılında Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), Entomopoxvirinae içindeki cinsleri

yeniden adlandırdı ve virüsler için kullanılan kısaltmaları yeniden tanımladı (URL-1). Bu sınıflandırmaya göre omurgalıları enfekte edenlere *Chordopoxvirinae*, omurgasızları enfekte edenlere *Entomopoxvirinae* denilmiştir (Moss, 1991) (Tablo 1). *Entomopoxvirinae* grup virüsler insanları enfekte etmediklerinden, viroloji çalışmaları için uygundur ve insan hücrelerine entegre olabildikleri için gen terapi aracı olarak kullanımları son dönemlerin ilgi çeken konuları arasındadır (Conrad ve Liu, 2019; Moroziewicz ve Kaufman, 2005).

Tablo 1. Poksvirüslerin sınıflandırılması

Familya	Subfamilya	Cins
<i>Poxviridae</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>
		<i>Capripoxvirus</i>
		<i>Cervidpoxvirus</i>
		<i>Leporipoxvirus</i>
		<i>Molluscipoxvirus</i>
		<i>Orthopoxvirus</i>
		<i>Parapoxvirus</i>
		<i>Suipoxvirus</i>
		<i>Yatapoxvirus</i>
		<i>Alphaentomopoxvirus</i>
	<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Betaentomopoxvirus</i>
		<i>Gamaentomopoxvirus</i>

1.2.2. Poksvirüslerin Genom Özellikleri

Poksvirüsler, 130-375 kb uzunluğunda, lineer, çift zincirli DNA genomu sahiptirler. Türlerine bağlı olarak 150-300 arasında protein kodlamaktadır; viriyon yapısında ise yaklaşık 100 protein bulunur. Virüs parçacığının ağırlığının yaklaşık %3'ünü nükleik asitler oluşturmaktadır (Walsh, 2017). Poksvirüs genomları, DNA'nın transkripsiyonunda, proteinlerin veya nükleik asitlerin modifikasyonunda yer alan birçok enzim kodlamaktadır.

Zarflı viriyonların etrafı çift katmanlı lipid içeren polipeptitler ile çevrelidir. Entomopoksvirüsler, temel yapısal protein olarak sferoidinden meydana gelirken,

kordopoksvirüsler, yine tek bir proteinden (A-tipi ATI proteini) oluşan inklüzyon yapılar içinde bulunabilirler. Entomopoksvirüslerde, evrimsel süreçte virüs replikasyonu için önemli korunmuş proteinleri (polimerazlar ve yapısal proteinler) kodlayan genler, genomun ortalarında yer alırken, virüs-konak etkileşiminde ve replikasyonda daha az önemli proteinleri (immün düzenleyiciler) kodlayan genler, genomun uç bölgelerinde toplanmışlardır (Turner ve Moyer, 2002). Poksvirüsler arasında yaklaşık 50 korunmuş gen bulunur. Ayrıca 40 gen çoğu kordopoksvirüslerde ortaktır (Murphy, 1995).

Poksvirüs genomu, farklı promotorların aktifleştirdiği ORF'ler içermektedir. Her promotor viral transkripsiyon sırasında belirli bir zamanda aktifleşerek belirli genlerin transkripsiyonunu düzenler (Moss, 1991). Genler, aktifleştikleri zamana göre üç gruba ayrılır: Erken genler, ara genler ve geç genler. Erken genler, viral genomun konakçı hücre sitoplazmasına salınmasından önce veya salınması sırasında ifade edilirler. Bunlar viral genomun neredeyse yarısını oluşturur ve genomda yapısal olmayan çok sayıda immün-düzenleyici proteinleri, DNA replikasyonu ve ara gen transkripsiyonu için gerekli proteinleri kodlar. Ara genler, virüsün DNA replikasyonu için gerekli proteinleri kodlarken geç genlerin transkripsiyonunu düzenler. Geç genler ise, DNA'nın replikasyonundan sonra ifade edilen, post transkripsiyonel modifikasyonlar içeren ve viriyon proteinlerini kodlayan genlerdir (Broyles, 2003; Murphy, 1995).

Konakçı hücre yüzeylerine bağlanma ve plazma membranı ile füzyonun ardından, viral çekirdeğin sitoplazmaya salınmasıyla poksvirüs DNA replikasyonu başlatılır (Moss, 1991) Poksvirüsler geçici olarak düzenlenen bir gen ekspresyon programı kullanırlar. Yani DNA replikasyonu proteinlerini ve ara transkripsiyon faktörlerini kodlayan erken genlerin ürünleri, geç gene özgü transkripsiyon faktörlerini kodlayan ara genlerin ekspresyonunu tetikler (Oliveira vd., 2017). Geç gen ürünleri temelde, bir sonraki virus için ihtiyaç duyulan yapısal proteinlerden ve bir sonraki enfeksiyon turunda erken gen ekspresyonu için kullanılan enzimlerden oluşur (De Silva vd., 2007).

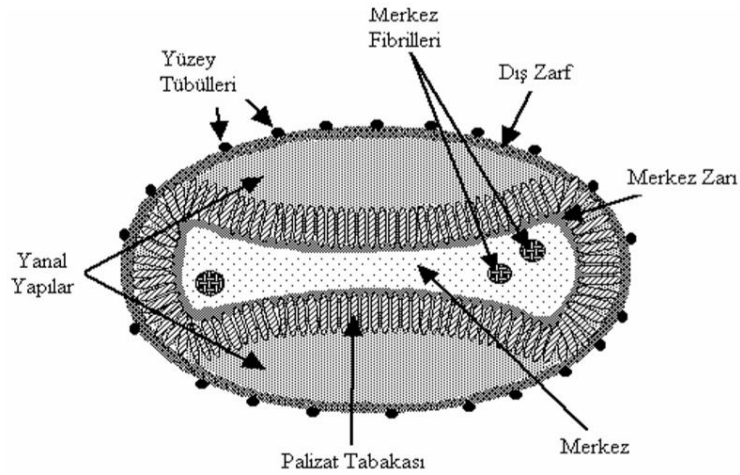
1.2.3. Poksvirüslerin Enfektivitesi

Olgun poksvirüsler çift katman nükleoprotein ile sarılı iken, bazı poksvirüsler ilave bir katman daha zarf içerebilir. Bunlara zarflı poksvirüsler denir. Zarflı poksvirüsler hücre membranına füzyon yapacakları sırada, bu ek zar tabakalarını kaybederler (Oliveira vd., 2017). Zarflı virüslerin antijenik özellikleri, zarfa özgü proteinler içerdiklerinden dolayı,

olgun viriyonlardan farklıdır. Poksvirüsler konakçı hücrede çoğaldıktan sonra, hücreden salınma sırasında hücre yüzeyine bağlı kalabilir (zarflı virüsler) veya hücre dışı matrikse zarflarıyla birlikte salınabilirler (Pickup, 2015). Çoğu memeli virüslerinde hücre dışına salınım bu yolla meydana gelerek olgun virüsler oluşturulur. Bazı memeli poksvirüs gruplarında olgun virüsün konakçı hücre dışına salınımı, konakçı hücrenin membranından bir parça olan protein kesecik (iklüzyon yapı) ile virüsün direk tomurcuklanması şeklinde olurken, entomopoksvirüslerde ise konakçı hücrenin içindeyken önceden oluşturulmuş kesecikler ile virüsün hücre dışına salınımı şeklinde oluşmaktadır (Buller ve Palumbo, 1991).

1.3. Entomopoksvirüsler

Entomopoksvirüsler (EPV'ler) ilk olarak 1963 yılında Vago tarafından keşfedilmiştir (Vago, 1963). EPV'ler, tuğla veya oval morfolojik şekilleri ile ortopoksvirüslerden ayrılmaktadırlar (Şekil 2). Yaklaşık olarak bir EPV, 150-470 nm uzunluk ve 165-300 nm genişliğe sahiptir ve diğer aile üyelerine kimyasal olarak benzerdir (Arif, 1995).



Şekil 2. Entomopoksvirüslere ait genel görünüm (Sezer, 2005)

EPV'ler Coleoptera, Diptera, Lepidoptera ve Orthoptera üyelerinin de dahil olduğu böcekleri enfekte ederler (Prasad, 2016). EPV'lerin belirgin özelliklerinden bir tanesi, konakçı hücrenin sitoplazmasında (hemositler ve adipoz doku hücreleri) sferoid denilen

küresel kesecikler oluşturmalarıdır. Yaklaşık 5-20 µm büyüklüğünde olan sferoidlere aslen "sferule" denilmiştir. Olgun viriyonlar, genellikle bu "sferoidin" olarak adlandırılan inklüzyon yapı proteininden oluşan sferoidlerde bulunur (Arif, 1991)

EPV'lerin sınıflandırılması, konakçı böcek, viriyon morfolojisi ve genom büyüklüğüne dayanmaktadır (Murphy, 1995). Entomopoxvirüsler (aile: Poxviridae, alt aile: Entomopoxvirinae), tarihsel olarak konukçu böcek ve viriyon morfolojisine göre üç cins altında gruplandırılır ve yaklaşık 31 tür içermektedir (Adams vd., 2014) (Tablo 2).

EPV'lerin genomu karmaşık, lineer ve çift zincirli yapıdadır. Genom ortalama 225 kb nükleotid içerirken, bunun %76-82'si AT nükleotidlerinden oluşmaktadır. Viriyon, boyutu 12-250 kDa arasında değişen en az 40 yapısal proteinden oluşur (Arif, 1984). Bu polipeptitlerin virüs parçacıklarındaki dağılımı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Sadece AMEV ve MsEPV DNA'sının fiziksel haritaları yayınlanmış ve bunların orthoptervirüs genomlarına yapısal benzerlikleri doğrulanmıştır (Hall ve Hink, 1990).

Entomopoxviridae cinsleri, alfa (Coleoptera), beta (Lepidoptera ve Orthoptera) ve gama (Diptera) olarak belirlenmiştir (Goodwin, 1991). Çekirgeleri enfekte eden *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* (MSEV) olanchekirgeleri enfekte çekirgeleri enfekte eden *Melanoplus sanguinipes* EPV (MsEPV), ilk dizilenen EPV'dir (Afonso vd., 2000). MsEPV'nin genom dizisi, entomopoksirüs genomlarının aydınlatılmasında önemli rol almıştır ve böcek ile omurgalı poksirüsler arasındaki benzerlik ve farklılıkları aydınlatmıştır (Afonso vd., 1999). MsEPV genom dizisi, her ne kadar bilgilendirici olduysa da, MsEPV'in *in vitro* olarak büyütülememesi ve kolayca üzerinde değişiklikler yapılamaması nedeniyle, elde edilen bilgilerin tam olarak kullanılması zor olmuştur. Bununla birlikte, *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV), hücre kültüründe kolayca büyütülebilmüş ve üzerinde genetik olarak değişikliklere neden olacak çalışmalar yapılabilmıştır (Bawden vd., 2000; Winter vd., 1995).

EPV'lerin genomu karmaşık, lineer ve çift zincirli yapıdadır. Genom ortalama 225 kb nükleotid içerirken, bunun %76-82'si AT nükleotidlerinden oluşmaktadır. Viriyon, boyutu 12-250 kDa arasında değişen en az 40 yapısal proteinden oluşur (Arif, 1984). Bu polipeptitlerin virüs parçacıklarındaki dağılımı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Sadece AMEV ve MsEPV DNA'sının fiziksel haritaları yayınlanmış ve bunların orthoptervirüs genomlarına yapısal benzerlikleri doğrulanmıştır (Hall ve Hink, 1990).

Tablo 2. Entomopoksvirüslerin taksonomik sınıflandırılması

Alt Aile	Cins	Tür
Entomopoxvirus	Alphaentomopoxvirus	<i>Anomala cuprea entomopoxvirus</i> (ACEV)
		<i>Aphodius tasmaniae entomopoxvirus</i> (ATEV)
		<i>Dermolepida albohirtum entomopoxvirus</i> (DAEV)
		<i>Demodema boranensis entomopoxvirus</i> (DBEV)
		<i>Figulus subleavis entomopoxvirus</i> (FSEV)
		<i>Geotrupes sylvaticus entomopoxvirus</i> (GSEV)
		<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i> (MMEV)
	Betaentomopoxvirus	<i>Acrobasis zelleri entomopoxvirus</i> "L" (AZEV)
		<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> "L" (AMEV)
		<i>Arphia conspersa entomopoxvirus</i> "O" (ACOEV)
		<i>Choristoneura biennis entomopoxvirus</i> "L" (CBEV)
		<i>Choristoneura conflictata entomopoxvirus</i> "L" (CCEV)
		<i>Choristoneura diversuma entomopoxvirus</i> "L" (CDEV)
		<i>Choristoneura fumiferana entomopoxvirus</i> 'L' (CFEV)
		<i>Chorizagrotis auxiliars entomopoxvirus</i> "L" (CXEV)
		<i>Heliothis armigera entomopoxvirus</i> "L" (HAVE)
		<i>Locusta migratoria entomopoxvirus</i> "O" (LMEV)
		<i>Oedaleus senigalensis entomopoxvirus</i> "O" (OSEV)
		<i>Operophtera brumata entomopoxvirus</i> "L" (OBEV)
		<i>Schistocera gregaria entomopoxvirus</i> "O" (SGEV)
	Gammaentomopoxvirus	<i>Aedes aegypti entomopoxvirus</i> (AAEV)
		<i>Camptochironomus tentans entomopoxvirus</i> (CTEV)
		<i>Chironomus attenuatus entomopoxvirus</i> (CAEV)
		<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i> (CLEV)
		<i>Chironomus plumosus entomopoxvirus</i> (CPEV)
	Sınıflandırılmamış türler	<i>Goeldichironomus haloprasimus entomopoxvirus</i> (GHEV)
		<i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i> (DIEV)
		<i>Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus</i> (MSEV)

EPV'lerin farklı türde böceklerden saflaştırılabilmeleri ve bakülovirüs ifade sistemini tamamlayıcı özellikte olması nedeniyle, bunlar mikrobiyal mücadele için çok büyük umut vaad etmektedir (Sezer, 2005). Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera ordolarına ait en önemli tarım zararlısı böceklerden izole edilebilen EPV'ler, günümüzde hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalarda artan hızda kullanılmaya devam etmektedir. Son yıllarda, biyoteknolojik çalışmalarda EPV'lerin protein ifade sisteminde kullanılmaları cazip hale gelmiştir (Arif ve Pavlik, 2013; L. Zhang vd., 2016).

1.4. *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV)

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV), Lepidoptera (güveler) ve Orthoptera (çekirge) takımlarını enfekte eden Betaentomopoxvirus cinsinin tip türüdür (Murphy, 1995). AMEV'nin doğal konağı, kırmızı tüylü tırtıl olan *Amsacta moorei*'dir. Böcek konukçusunda AMEV enfeksiyonu, zarflı virüsün böcek tarafından yenilmesi ile başlayarak, zarfın böceğin alkali orta bağırsağında sindirilmesi ile devam eder. Larvaların AMEV ile enfeksiyonu, larvanın bulunduğu döneme göre değişmektedir. Ancak, genel olarak enfeksiyon başladıktan itibaren böceğin yağ kütlesi, hemositler, sinir hücreleri, orta bağırsak hücreleri, hipodermiler, trakeoblastlar ve kas hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre ve dokuya ulaşabilmektedirler (Bawden vd., 2000). Enfekte olmuş larvalar ölmeden önce, hareket kaybıyla eş zamanlı olarak uyuşuk hale geçerler. Böcekleri enfekte eden bu viral parçacıklar, orta bağırsağa kadar sferoidin içeren inklüzyon yapıları içinde gömülü haldedirler (Becker vd., 2004). Inklüzyon kesecikleri içindeki çoğalmış yavru virüslerin çevreye yayılması, böceğin dışkılaması ve ölü larvaların parçalanması yoluyla gerçekleşir (Williams vd., 2017).

Bawden ve arkadaşları tarafından yapılan biyoinformatik çalışmalarla AMEV genomu 2000 yılında dizilenmiştir ve 232,392 bazdan oluştuğu tespit edilmiştir (Bawden vd., 2000). AMEV, 294 açık okuma çerçevesi (ORF) içermekte ve bunların 256'sının fonksiyonel olarak aktif protein kodladığı bilinmektedir. AMEV genomunun, daha önceden %81,5 AT içerdiği tahmin edilirken bu çalışma ile yapılan yeni dizilemede AT oranı %82,2 bulunmuştur. Bu yükseklikteki (%82,2) AT içerikli AMEV genomu, poksvirüsler içerisinde en fazla AT içeriğine sahip virüs olmuştur (Bawden vd., 2000).

AMEV, *Estigmene acrea* ve *Lymantria dispar* gibi tarımsal açıdan önemli zararlıları enfekte etmektedir. Bu nedenle, AMEV tarımda zararlı bazı böceklerle karşı mikrobiyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilir (Ozsahin vd., 2015). Böylece, özellikle, AMEV'nin genomunda yapılan genetik mühendisliği çalışmalarıyla hem bu virüslerin biyoteknolojik ajan olarak kullanımının artması sağlanmakta hem de henüz keşfedilmeyen gen fonksiyonları aydınlatılmaktadır (Inan vd., 2018). AMEV en çok çalışılan entomopoksvirüsdür, çünkü LD652, IPLB-LdElta, Ea.BTi gibi böcek hücre kültürlerinde kolayca büyütülebilen ve değiştirilebilecek az sayıda böcek poksvirüsünden biridir (Becker vd., 2004). AMEV, Ladin Tomurcuk Böceğinden (*Choristoneura fumiferana*) türetilen CF-70-B2 hücrelerinde de çoğaltılabilmektedir. Perera ve arkadaşlarının çalışmasında AMEV ile enfekte edilen CF-70-B2 ve LD652 hücrelerinin apoptotik cevapları kıyaslanmış, enfekte CF-70-B2 hücrelerinin membran kabarcıklaşma, apoptotik cisimlerin oluşumu ve kaspaz aktivitesinin uyarılması gibi apoptotik yolları daha fazla aktifleştirdiği tespit edilmiştir (Perera vd., 2013).

1.4.1. AMV063 ORF'si

AMV063 ORF'si, AMEV'nin protein kodladığı varsayılan 63. ORF'sidir. Yapılan biyoinformatik çalışmalar, AMV063 ORF'sinin başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-2 proteininin üretiminden sorumlu AMEV geni olabileceğini göstermiştir (Bawden vd., 2000). Başka bir çalışmada, AMV063 proteininin AMEV'ye ait protein kinaz (AMV197) ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (Danismazoglu vd., 2018). Protein kinazların, virüsün konağı ile etkileşiminde önemli görevleri olduğu bilindiğinden (Wang ve Shuman, 1995), tespit edilen protein-protein etkileşimi, AMV063 ORF'si ürününün muhtemel bir apoptozis başlatıcı kaspaz-2 olabileceğini doğrular niteliktedir. Fakat bunu kanıtlayan fonksiyonel bir analiz literatürde henüz yoktur.

1.5. Apoptozis

Apoptozis kavramının belirli bileşenleri daha önceden açıkça belirtilmiş olmasına rağmen, apoptozis terimi (a-po-toe-sis) ilk kez 1972'de Kerr ve arkadaşlarının makalesinde kullanılmıştır (Kerr vd., 1972). Memeli hücrelerinde apoptozis sürecindeki

mekanizmaların anlaşılması, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında ortaya çıkan programlanmış hücre ölümünün araştırılmasıyla ortaya çıkmıştır (Gumienny vd., 1999). Oluşumu süresince 1090 yeni somatik hücre oluşturan bu organizmada, oluşan hücrelerin 131 tanesinin apoptozis geçirdiği bulunmuştur. Bu 131 hücre, erginleşme süreci sırasında çoğu solucanda aynı olan belirli noktalarda ölür. Bu sistemde olağanüstü bir doğruluk ve kontrol mekanizması vardır. Apoptozis, o zamandan beri, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş bir şekilde elenmesini içeren “programlanmış” hücre ölümünün farklı ve önemli bir modeli olarak kabul edilmiştir (Formigli vd., 2000).

Apoptozis normal gelişim ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar (Fleisher, 1997). Apoptozis ayrıca immün reaksiyonlarda olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak veya hücreler hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde de ortaya çıkabilir (Zhou vd., 2019). Apoptozisi tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücrelerin aynı uyarana yanıt olarak mutlaka ölmesi gerekmez. Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde p53 bağımlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilecek DNA hasarına neden olur (Crighton vd., 2006). Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücreleri apoptotik ölüme gönderirken (örneğin timositler), diğer hücreleri etkilemez ve hatta uyarırmaz (Elmore, 2007).

Bazı hücreler, hücreye ligand bağlanması ve proteinin çapraz bağlanmasından sorumlu Fas veya TNF reseptörlerini ifade ederek apoptozise yol açabilir (Wong ve Goeddel, 1994). Diğer hücreler, hormon veya büyüme faktörü gibi bir hayatta kalma faktörünün engellenmesiyle ölüme itilebilir. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar apoptozisi indükleyebilir (Pistritto vd., 2016). Sonuç olarak, apoptozis, “kaspazlar” adı verilen bir sistein proteaz grubunun aktivasyonu ile başlayan, başlatıcı uyarıcılar ile hücrenin nihai ölümüne kadar karmaşık olaylar şelalesini içeren eş zamanlı ve sıklıkla enerjiye bağlı bir olaylar zinciridir (Elmore, 2007).

Apoptozis sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri ışık ve elektron mikroskopisi ile tanımlamak mümkündür. Apoptozisin erken aşamalarında hücre büzülmesi ve piknosis ışık mikroskobu ile görülebilir (Vijayarathna vd., 2017). Hücre büzülmesinde, hücreler daha küçülür, sitoplazma yoğundur ve organeller daha sıkı paketlenir. Piknosis ise hücrenin çekirdeğinde kromatinin geri dönüşümsüz

yoğunlaşmasıdır ve apoptozisin en karakteristik özelliğidir (Elmore, 2007). Bu özellik ile, apoptozis sırasındaki hücre içi değişiklikler çok daha iyi tanımlanabilir. Kromatin daha yoğunlaşma evresinin başlarında iken; yoğun çekirdek materyallerinin bulunduğu bölgeler, elektron bakımından yoğun bölgeler olarak elektron mikroskobu altında görünebilir (Vijayarathna vd., 2017).

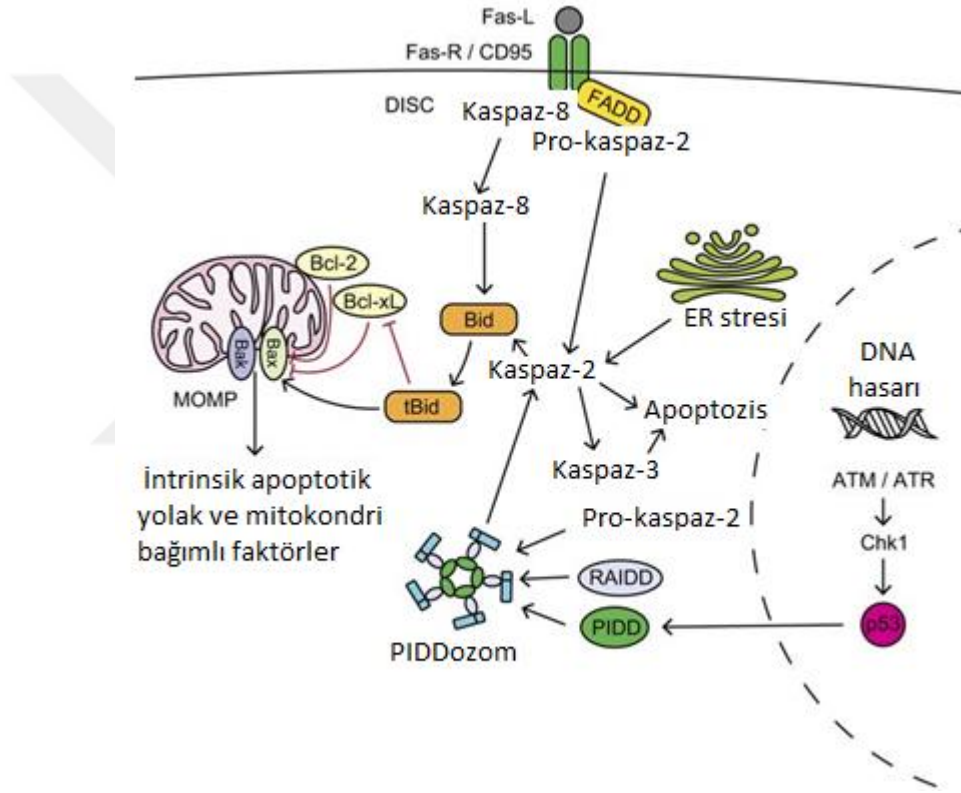
Plazma membranının kabarcıklanması ise, kromatinlerin sitoplazma içerisinde parçalanması olarak bilinen karyoheksiz ve tomurcuklanma olarak adlandırılan bir işlem sırasında hücrelerin apoptotik yapılara ayrılması olaylarından sonra meydana gelir. Apoptotik yapılar, sıkı bir şekilde paketlenmiş organellere sahip sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlüğü hala korunur ve bunların tümü sağlam bir plazma zarı içine alınır. Bu yapılar daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagositozlanır ve fagolizozomlar içinde parçalanır (Yagami vd., 2019). Esasen apoptozis süreci ile ilişkili inflamasyon reaksiyonu yoktur. Çünkü apoptotik hücreler hücresel bileşenlerini çevre dokuya salmaz, çevrelerindeki makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde fagositoz olduklarından, muhtemelen sekonder nekrozu önlerler ve fagositler anti-inflamasyon sitokinleri üretmez (Kurosaka vd., 2003).

Apoptotik hücre ölümünün alternatifi, hücrenin pasif bir kurban olduğu ve enerjiden bağımsız bir ölüm modelini takip ettiği toksik bir süreç olarak kabul edilen nekrozdur (Majno ve Joris, 1995). Ancak nekroz, hücre ölümünden sonra meydana gelen bozunma süreçlerini ifade ettiğinden apoptozisten ayrı bir ölüm mekanizması olarak kabul edilir. Bu nedenle onkoz, karyoliz ve hücre şişmesi, nekroza neden olan bir işlemi tanımlamak için kullanılırken, apoptozis, hücre büzüşmesi, piknosis ve karyoheksiz ile hücre ölümüne yol açar. Apoptozis ve nekrozun morfolojik farkları Tablo 3’de verilmiştir (Levin vd., 1999; Majno ve Joris, 1995).

Tablo 3. Apoptozis ve nekrozisdeki morfolojik farklar

Apoptozis	Nekrozis
Tek hücreler veya küçük hücre kümeleri	Sıkı dizilmiş bitişik hücreler
Hücre büzülmesi ve kıvrılması	Hücre şişmesi
Piknosis ve karyoheksiz	Karyoliz, piknosis ve karyoheksiz
Bozulmamış hücre zarı	Bozuk hücre zarı
Sitoplazma apoptotik cisimlerin içinde kalır	Sitoplazma salınır
İnflamasyon yok	İnflamasyon genellikle vardır

Apoptozis, enerjiye bağılı moleküler olayların şelalesini içeren oldukça karmaşık ve kusursuz tasarlanmış bir mekanizmadır (Şekil 3). Bugüne kadarki araştırmalar iki ana apoptotik yol olduğunu göstermekteydi: 1) Dışardan gelen veya ölüm reseptör yolak, 2) İçerden gelen veya mitokondriyel yolak. Fakat yeni çalışmalar, aslında bu iki yolağın birbirine bağılı olduğunu ve bir yolaktaki molekülün öbürünü etkilediğini göstermektedir (Fulda ve Debatin, 2006). Apoptotik hücreler; protein degradasyonu, protein çapraz bağlanması, DNA yıkımı ve Tablo 3’de tarif edilen ayırt edici patolojiyle sonuçlanan çeşitli biyokimyasal değişimler sergilerler.



Şekil 3. Kaspaz bağımlı apoptotik sürecin gösterimi (Thomas vd., 2017)

Konak savunma tepkisine karşı koymak için birçok virüs, yüksek miktarda çoğalmasına ve başarılı bir enfeksiyon oluşturmaya izin veren anti-apoptotik proteinleri kodlar. Bakulovirüs, entomopoksvirüs ve iridovirüs gibi böcek virüsleri, P35 ve/veya IAP apoptozis inhibitörü proteinlerini ifade ederek apoptozisi inhibe eder (Best ve Bloom, 2004). Son zamanlarda, *Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus*'de (LdMNPV) apoptozis baskılayıcı protein kodlayan yeni bir gen tanımlanmıştır (Yamada vd., 2011). Bazı durumlarda apoptozis, konak savunmasından ziyade viral patogeneze ile ilişkilidir.

Yani virüs, hücrel apoptotik yolların aktivasyonuna rağmen çoğalabilir hatta bulaşıcı nesiller üretebilir (Everett ve McFadden, 2002). Bu virüslerin bazılarının aktif olarak hayatta kalmaları ve yayılmaları için apoptozisi indüklemeleri gerekmektedir (Cuconati ve White, 2002). Apoptozisin aktivasyonu, virüs ve belirli bir konakçı arasındaki özel etkileşimlere bağlı olarak, virüs yaşam döngüsünün herhangi bir aşamasında gerçekleşebilir. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) gibi bazı virüsler apoptozis işlemini konakçı hücreye füzyon sırasında başlatır (Brojatsch vd., 2000). Bazı diğer virüslerde ise apoptozis, virüs yaşam döngüsünün daha sonraki aşamalarında (protein sentezi sırasında) başlatılabilir (Schultz ve Friesen, 2009). Apoptozisi saptamadaki yöntemler altı ana başlık altında incelenebilir: (i) Sitomorfolojik değişiklikler; (ii) DNA parçalanması; (iii) Kaspazların, parçalanmış substratların, regülatörlerin ve inhibitörlerin tespiti; (iv) Membran değişiklikleri; (v) Apoptozisin bütün bağlarda tespiti; (vi) Mitokondriyal analizler (Elmore, 2007). Bu tez kapsamında kullanılacak apoptozis belirleme yöntemleri; kaspaz-2 aktivite tayini ve TUNEL (Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Kırık Uç Etiketleme, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) deneyleridir.

1.6. Kaspazlar

Kaspazlar (sistein-aspartik proteazlar), apoptozisi ve inflamasyonu kontrol ettikleri bilinen proteolitik enzimlerdir (Shalini vd., 2015). Pek çok proteazda olduğu gibi, kaspazlar hücrelerde aktif olmayan zimojenler olarak bulunur ve proteolitik işleme aktifleştirilir (Shi, 2004). Çoğu kaspazlar aktif bir sisteine ve korunmuş penta-peptitlik aktif bölgeye (QACXG) sahiptir (Cooper vd., 2009). Bu enzimler proteolitik aktiviteleri gereği çoğunlukla substratlarını, aspartat (Asp) aminoasidinin bulunduğu bölgenin C-ucundan keserken, nadir olarak da glutamat ve fosfoserin uçlarından keserler (Fan vd., 2005). Kaspazlar, aktifleştirildikten sonra, bir proteaz şelalesi başlatılmasına izin vererek sıklıkla başka prokaspazları aktifleştirebilir. Bazı prokaspazlar da toplanabilir ve otomatik olarak aktif hale gelebilir. Bir kaspazın diğer kaspazları aktifleştirebildiği bu proteolitik şelale, apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar (Van Opdenbosch ve Lamkanfi, 2019).

Proteolitik yıkım; membranda kabarcıklanma, DNA kırılması ve fosfatidilserinlerin hücre yüzeyine çıkması gibi hücre morfolojisinde önemli değişikliklere yol açarak apoptotik keseciklerin oluşmasına sebep olur (Julien ve Wells, 2017). Aktif kaspazlar heterotetramer yapıdadırlar. Şu ana kadar tanımlanmış 14 kaspaz ailesi üyesi vardır. Tablo 4’de belirtildiği gibi, memelilere ait kaspazlar, aminoasit benzerlikleri ve fonksiyonlarına göre 2 ana gruba ayrılmıştır: İnflamatör ve apoptotik kaspazlar. Apoptotik kaspazlar, N-ucuna doğru özel protein motiflerinin varlığına veya yokluğuna göre başlatıcı ve efektör olarak sınıflandırılmıştır (Fan vd., 2005; Shi, 2004). Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2, -8, -9, -10), hücre ölümünü kolaylaştırmak için, N-uçlarında kalitik bir adaptöre sahiptirler. Başlatıcı kaspazlar, karmaşık bir süreç olan apoptotik yolda, kendi kendilerini aktifleştirdikten sonra, şelalenin devamını oluşturan efektör kaspazları (Kaspaz-3, -6, -7) aktifleştirirler (Tablo 4) (Thomas vd., 2017).

Tablo 4. Kaspaz ailesinin üyeleri (Fan vd., 2005).

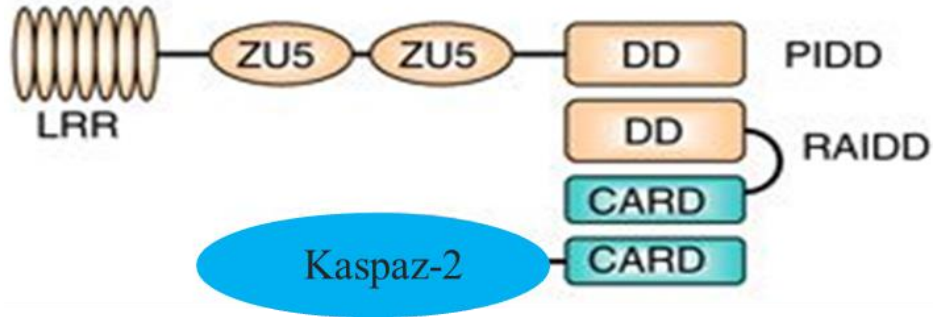
Üyeler	Alt üyeler	Peptid substratları
İnflamatör	Kaspaz-1	WEHD
	Kaspaz-4	(W/L)EHD, LEVD
	Kaspaz-5	(W/L)EHD
	Kaspaz-11	WEHD
	Kaspaz-12	-
	Kaspaz-13	WEHD
	Kaspaz-14	WEHD
Apoptotik	Kaspaz-2	VDVAD
	Kaspaz-8	LETD
	Kaspaz-9	(W/L)EHD
	Kaspaz-10	LEHD
	Kaspaz-3	DEVD
	Kaspaz-6	VQVD
	Kaspaz-7	DEVD

Kaspaz biyolojisinin daha iyi anlaşılması; her kaspazın nasıl aktifleştiği, hangi substratları parçaladıkları, her birinin hangi biyolojik fonksiyonları sürdürdüğü ve hangi hücrel içerikte oldukları gibi soruların aydınlatılmasına bağlıdır.

1.6.1. Kaspaz-2

Çoğu apoptozisin başlatılmasında önemli rollere sahip olan kaspaz proteaz ailesinin üyesi kaspaz-2, memelilerde ilk keşfedilen 2. kaspaz olmasına ve evrimsel süreçte en korunmuş kaspaz enzimi olmasına rağmen, işlevi ve biyolojik önemi hala tam olarak anlaşılmayan gizemli bir enzim olmaya devam etmektedir (Kitevska vd., 2014). N-ucu etkileşim bölgesi içeren diğer kaspazlar gibi kaspaz-2 de, hücre ölümünde rol alan p53'ü uyaran PIDDozom adındaki molekül içi bölgeye sahiptir (Şekil 4) (Li ve Yuan, 2008). Aynı zamanda içerdiği CARD bölgesi sayesinde, apoptozis sürecinde başlatıcı kaspaz olarak görev alır. Kaspaz-2, biyokimyasal reaksiyonlarda substrat olarak diğer kaspazların tercih ettiği tetra-peptid yerine bir penta-peptidi (VDVAD) tercih eder (Tang vd., 2011).

PIDDozom



Şekil 4. Kaspaz-2 enziminin domeinlerinin gösterimi (Li ve Yuan, 2008).
CARD: Kaspaz güçlendirme bölgesi, DD: Ölüm bölgesi, LRR: Lösin-zengini tekrarlar, PIDD: Ölüm bölgesi p53-uyarılabilir proteini.

Kaspaz-2, stres kaynaklı hücre ölüm yollarında önemli fonksiyonlara sahiptir (Tiwari vd., 2014). Örneğin, kaspaz-2'nin ekspresyon seviyesinin, bazı nöronal bozukluk

hastalığına sahip bireylerin beyinde yükseldiği gösterilmiştir (Zhao vd., 2016). Aynı zamanda, hücrede tümör baskılanma, DNA onarımı ve hücre döngüsünü düzenleme gibi apoptotik olmayan yollarda da potansiyel rollerine dair kanıtlar ortaya çıkmaktadır (Cullen ve Martin, 2009). Bu bulgulara rağmen, kaspaz-2 ile ilgili birçok soru var: Örneğin, kaspaz-2'nin hangi koşullar altında ve nasıl aktif hale geldiği tam olarak bilinmemektedir. Kaspaz-2'nin belirli şartlar altında apoptozis için zorunlu olup olmadığı veya öncelikle hücre döngüsü düzenlemesinde çalışıp çalışmadığı henüz belirlenmemiştir (Tang vd., 2011).

Kaspaz-2'nin aktivitesini belirlemek için çok sayıda hücre kültürü temelli çalışmalar da yapılmıştır (Hu vd., 2015; Vigneswara ve Ahmed, 2019). Pek çok proteaz gibi, kaspaz-2'nin fazla ekspresyonu hücreleri öldürebilmektedir (Kumar vd., 1994). Kaspaz-2'nin aktivasyonu ve apoptotik sinyalleri tetiklemesi, ER (endoplazmik retikulum) stresi, hücre ölüm ligandları veya DNA hasarına cevaben olabilir (Bronner vd., 2015).

Yapılan diğer çalışmalarda, bazı viral enfeksiyonlar sırasında konakçı hücredeki apoptozisi tetikleyen kaspaz-9, kaspaz-8 (Bitzer vd., 2002), kaspaz-3 (Wurzer vd., 2003), kaspaz-1 (Rubio ve Sanz-Rodriguez, 2016) ve kaspaz-2 (Choi vd., 2014) gibi düzenleyicilerin aktif olduğu belirlenmiştir.

1.7. Çalışmanın Amacı

AMEV'nin ve/veya AMEV ürünlerinin mikrobiyolojik ajan olarak kullanılabilmesi, genomunun tam olarak aydınlatılması ve genlerinin fonksiyonlarının bilinmesi ile mümkündür. Bu nedenle tezde amaç, biyoinformatik çalışmalarla kaspaz-2 geni olabileceği düşünülen ve üzerinde daha önce hiçbir moleküler çalışma yapılmamış olan *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e ait AMV063 ORF'si ürünün fonksiyonunu belirlemeye yönelik analizlerin yapılmasıdır.

Bu amaca yönelik belirlenen tez kapsamını;

1. *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e ait AMV063 proteininin ifadesi,
2. Homolog rekombinasyon ile virüs genomundan AMV063 kodlu ORF'nin silinmesi ile rekombinant virüs eldesi (*AmΔ063/gfp*),
3. AMV063 proteininin ve rekombinant virüsün duyarlı hücrelerdeki (CF-70-B2) apoptozis etkisinin, yaban tip virüs ile kıyaslanarak tespiti oluşturmaktadır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Virüs ve Hücrelerin Tedariği

Ladin Tomurcuk Böceğinden (*Choristoneura fumiferana*) geliştirilen CF-70-B2 hücreleri Dr. Sharon Hooey (Kanada)'den ve Çingene Güvesi (*Lymantria dispar*) böceğinden geliştirilen LD652 hücreleri Dr. Basil Arif (Kanada)'den tedarik edildi.

Yaban tip *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Dr. Basil Arif (Kanada)'den ve kontrol olarak kullanılan sferoidin geni silinmiş *gfp* geni içeren AMEV (*AmΔsph/gfp*) Dr. Richard W. Moyer (ABD)'den tedarik edildi.

2.1.1. Stoktan Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması

Daha önceden sıvı azotta %7'lik DMSO içeren besiyerimde stok olarak saklanan LD652 ve CF-70-B2 hücreleri, çalışma kapsamında kullanılmak üzere canlandırma işlemine tabi tutuldu. LD652 hücreleri, T-25 (25 cm²) hücre kaplarında, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma, Kat No: F-0643) içeren besiyerinde (%45 Grace's Insect Medium-GIBCO; %45 Excell420, SAFC-Biosciences) haftada iki kez pasajlanarak 28 °C'de büyütüldü. Pasaj işlemi sırasında hücrelerin mevcut besiyerisi atıldı. Tabana tutunmuş olan hücreler steril cam pastör pipet ile 5 ml taze besiyeri içerisinde yıkanarak çözüldü ve 1:5 (hücre:besiyeri) oranında yeni bir T-25 flaska aktarılarak inkübasyona bırakıldı.

CF-70-B2 hücreleri, %10 FBS içeren besiyerinde (%90 Grace's Insect Medium) haftada iki kez pasajlanarak 28 °C'de büyütüldü. Hücreler üst üste kümелendiği için, pasajlardan 2 saat sonra besiyeri tekrar değiştirilerek hücreler inkübasyona bırakıldı. Pasaj işlemi için, süspansiyon haline getirilen hücreler 1:2 (hücre:besiyeri) oranında yeni bir T-25 flaska aktarılarak inkübasyona bırakıldı.

2.1.2. AMEV Virüsünün Çoğaltılması

AMEV virüsünün çoğaltılması için, LD652 hücre kültürü kullanıldı (Perera vd., 2013). İlk olarak LD652 hücreleri hemositometre ile sayıldı ve 1×10^7 hücre olacak şekilde T-75 (75 cm^2 hacmindeki flasklar) kültür kaplarına bırakıldı. Hücrelerin tutunması için, kaplar 2 saat 28°C 'de inkübe edildi. Ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve yeni besiyeri içerisine enfeksiyon için hücre başına düşen virüs sayısı 3 (MOI: 3) olacak şekilde AMEV eklendi. Hücre virüs karışımı, 2 saat 3 rpm'de sallanmaya bırakıldı. Ardından enfeksiyon hacmi 10 ml'ye tamamlandı ve enfeksiyon belirtileri görününceye kadar 28°C 'lik etüvde inkübe edildi. Enfeksiyonun 6. günü hücreler toplandı. Hücre ve virüs karışımı 5000 rpm'de, 5 dakika, 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant daha sonraki enfeksiyonlarda ve deneylerde kullanılmak üzere 4°C 'de saklandı.

2.2. AMV063 Proteininin Prokaryotik Sistemde İfadesi

AMV063 proteininin ifade edilebilmesi için, öncelikle enfekte hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Gene özgü tasarlanan primerlerle, AMV063 dizisi genomik DNA'dan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Çoğaltılan AMV063 DNA'sı transfer vektöre klonlandı. Transfer vektördeki AMV063 dizisi, ifade vektörüne (pET28a) klonlandı ve DNA sırasının doğruluğu teyit edildi. Ardından *Escherichia coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde AMV063 proteini ifade edildi. İfade edilen protein, histidin (His) kuyruğu sayesinde saflaştırıldı ve proteinin doğruluğu SDS-PAGE analizini takiben Western Blot analizi ile teyit edildi. Saf AMV063 proteini fosfat tuzu tamponuna (PBS) karşı diyaliz edildi.

2.2.1. AMEV Enfekte Hücrelerden Genomik DNA İzolasyonu

LD652 hücreleri bölüm 2.1.2'de belirtildiği şekilde 6 gözlü kaplarında (2×10^6 hücre/kültür kabı gözü) AMEV ile enfekte edildi. Enfekte hücreler, 5. günün sonunda 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Hücreler 5000 rpm'de, 5 dakika, 4°C 'de santrifüj edildi. Pellette toplanan hücrelerden "DNeasy Blood and Tissue Kiti" (Qiagen, Kat. No:

69504-250) önerisine göre genomik DNA izolasyonu yapıldı. Çökelti 200 µl PBS içinde süspansiyon haline getirildi. Üzerine 200 µl Tampon AL, 20 µl proteinaz K ve 4 µl RNaz A (100 mg/ml) eklendi ve vortekslendi. Ardından süspansiyon, 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Tüpe 200 µl %96’lık etanol eklendi ve vortekslendi. Elde edilen karışım, kit içeriğinde bulunan filtreli kolonlara aktarıldı ve santrifüj yapılarak DNA’nın filtrede toplanması sağlandı. Ardından, filtrelere 500 µl Tampon AW1 yıkama solüsyonu eklendi ve santrifüj edilerek filtre yıkandı. Aynı işlem son yıkama aşaması olan Tampon AV2 ile de yapıldı. Filtre, 2 dakika ilave santrifüj aşaması ile kurutuldu. Filtrenin altına yeni mikrosantrifüj tüpü yerleştirildi ve filtrenin merkezine bırakılan 100 µl Tampon AE ile filtredeki DNA tüpte toplandı. Genomik DNA’nın miktar tayini, spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000) ile 260 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak sağlandı. Elde edilen 260 nm’deki 1 ünite absorbans değeri, 50 µg/ml DNA’ya karşılık gelmektedir.

2.2.2. AMEV Muhtemel Kaspaz-2 DNA Dizisinin (AMV063) Klonlama Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu

2.2.2.1. AMV063 DNA’sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

AMV063 DNA’sına özgü, ORF’nin başlangıç ve bitiş bölgelerini içeren ileri ve geri primerler tasarlandı. Primer tasarımı sırasında, daha sonra genin klonlanması aşamasında kullanmak amacıyla, primer sıralarına *Bam*HI ve *Eco*RI enzim kesim bölgeleri eklendi (Tablo 5).

Tablo 5. AMV063 DNA’sını çoğaltmak için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Sırası	Enzim
AMV063Fw	5’CGGGATCCGGTCATAATAATTCCAAAG-3’	<i>Bam</i> HI
AMV063Rv	5’GGAATTCTAAATTATAATTCATTTTTGTTAATGTAG-3’	<i>Eco</i> RI

Böylece, tasarlanan primerlerin ve kalıp olarak izole edilen virüs DNA'sının kullanıldığı PCR reaksiyonu sonucunda 617 baz çifti (bp) uzunluğunda DNA sırası elde edilebilecektir. PCR reaksiyonu sırasında iTaq DNA polimeraz (Intron, Kat. No: 25022) kullanıldı. iTaq DNA polimeraz ısıya dayanıklı, yüksek verimli ve ürünün 3' ucuna A nükleotidi ekleme özelliklerine sahiptir. Böylece, PCR ürünü ara vektöre (pGEM-T easy) T-A ligasyonu ile direk olarak klonlanabilecektir. PCR reaksiyonu, Tablo 7'da verilen koşullarda PCR cihazında (Code: 4375786, Applied Bio System, USA) gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünü, %1,2'lik agaroz (Sigma, Kat. No A4718) jelde 90 voltta 30 dakika yürütüldü ve UV transimülatör ile görüntülenip kaydedildi.

Tablo 6. AMV063 DNA'sını çoğaltmak için kullanılan PCR karışımının içeriği ve programı

PCR Karışımı	Hacim	PCR Programı
10x Tampon	5 µl	94 °C'de 2'
10 mM dNTP	5 µl	94 °C'de 20''
10 mM Fw Primer	1 µl	54 °C'de 10''
10 mM Rv Primer	1 µl	72 °C'de 50''
60 ng Kalıp DNA	1 µl	72 °C'de 7'
iTaq DNA polimeraz	0,5 µl	
ddH ₂ O	36,5 µl	
Toplam	50 µl	

} 35 döngü

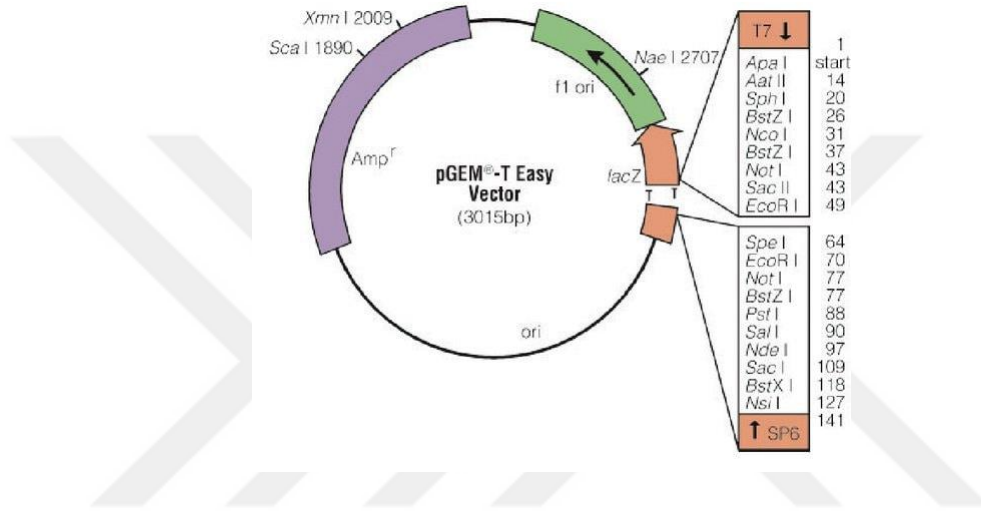
2.2.2.2. AMV063 DNA'sı PCR Ürününün Klonlama Vektörü pGEM-T Easy Vektöre Ligasyonu

Elde edilen PCR ürününün, doğrusal pGEM-T Easy vektörüne (Şekil 5) (Promega, Kat. No: A1360) ligasyonu için, ticari ligasyon kiti kullanılarak aşağıdaki reaksiyon hazırlandı.

Ligasyon Karışımı

10X Tampon	1,5 µl
pGEM-T Easy vektör	1 µl
PCR ürünü	3 µl
T4 Ligaz enzimi	1 µl
ddH ₂ O	8,5 µl
Toplam	15 µl olacak şekilde hazırlandı. Karışım gece boyu

(16 saat) 4 °C’de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 5. pGEM-T Easy vektörün haritası (URL-2)

2.2.2.3. Kalsiyum Klorür (CaCl₂) Metodu ile Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Bakteri suşlarını büyütmek için besiyeri hazırlandı. Bunun için, ticari Luria Bertani (LB) Broth (LabM, Kat. No: LAB169) besiyeri distile suda çözülüp cam şişede otoklavlandı ve daha sonraki kullanımlar için 4 °C’de muhafaza edildi. Katı Luria Bertani (LB) Agar (LabM, Kat. No: LAB168) besiyeri distile suda çözülerek erlenmayerde otoklavlandı. Besiyeri, sıcaklığı el ile tutulabilir ısıya düştüğünde ampisilin antibiyotiği (0,1 mg/ml) eklenerek petri kaplarına döküldü ve soğutulup donduruldu. LB agar petrilerinin kapakları kapatıldı ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edildi.

E. coli JM101 suşu, akşamdan 3 ml LB sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi. Sallayıcı inkübatörde, 200 rpm hızda, 37 °C’de ve 12-16 saat boyunca büyütüldü. Büyüyen *E. coli*’nin yoğunluğu, 1 ml’lik küvetler kullanılarak 600 nm dalga boyunda

spektrofotometre ile ölçüldü. Hücreler, yoğunluğu OD₆₀₀'de 0,1 olacak şekilde 30 ml LB sıvı besiyerine aşılandı. Kültür OD₆₀₀'de 0,45-0,55 oluncaya kadar 37 °C'lik sallayıcıda büyütüldü. Büyüyen hücreler 4500 rpm'de, 4 °C'de, 5 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 10 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ çözeltisi eklendi ve karışım süspansiyon haline getirilerek 30 dakika buzda bekletildi. Sürenin sonunda, karışım 4500 rpm'de, 4 °C'de, 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, kompetent hücre içeren pellet, 2 ml soğuk CaCl₂ çözeltisinde çözülerek 4 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

2.2.2.4. AMV063 DNA'sını İçeren Rekombinant Vektörün Kompetent Hücrelere Transformasyonu

Transformasyon için, 3 µl ligasyon ürünü 200 µl kompetent *E. coli* JM101 hücresi ile mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Karışım 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 2 dakika 45 °C'lik ısıtıcı blokta ısı şokuna maruz bırakılarak kompetent hücrelerin porlarının açılması ve rekombinant vektörün hücreye girmesi sağlandı. Ardından tüp tekrar buz üzerine alındı. Karışım 1 ml LB sıvı besiyeri ile steril cam tüpe aktarılarak 1-1,5 saat 37 °C'lik sallayıcıda büyümeye bırakıldı. Hücreler mikrosantrifüj tüpüne boşaltılıp 6000 xg'de 3 dakika çöktürüldü. Süpernatant, tüpün dibinde 50 µl kadar besiyeri kalacak şekilde döküldü. Pellet, kalan besiyeri içerisinde pipetlenerek çözüldü. Çözülen pellet, ampisilin (100 mg/ml) antibiyotiği 40 µl IPTG (izopiripil beta-D-tiyogalaktozid; 100 mM) ve 40 µl X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolilbeta-D-galakto-piranosid; 50 mg/ml) içeren LB agar petrisinin üzerine yayıldı. Petri 37 °C'lik etüvde 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden beyaz olanlar seçildi.

2.2.2.5. Plazmid DNA İzolasyonu

Seçilen koloniler, amfisilin antibiyotiği içeren 1 ml LB sıvı besiyeri içinde gece boyu büyütüldü. Büyüyen hücreler mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp 13.200 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibinde 50 µl kadar besiyeri kalacak şekilde süpernatant atıldı ve pellet kalan besiyerinde vortekslenerek çözüldü. Pelletin üzerine TENS solüsyonundan (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,8; 0,1 N NaOH; %0,5 SDS) 300 µl eklendi. Karışım 4-5 kez alt-üst edildi ve üzerine 150 µl sodyum asetat (3M, pH 5,2) çözeltisi

eklendi. Beş dakikada bir alt üst edilen karışım, 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından karışım, 13.200 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi. Plazmid DNA içeren süpernatant yeni tüpe aktarılarak üzerine 900 µl %95’lik etanol (EtOH) eklendi. Karıştırma işleminden sonra, 13.200 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Plazmidleri temizlemek amacıyla pellet üzerine, 500 µl %70’lik EtOH eklendi ve tekrar 13.200 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tüp steril kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Böylece plazmid içeren pellet alkol kalıntılarından kurtarıldı. Ardından pellete 30 µl distile su eklenerek çözünmesi için buz üzerinde 30 dakika bekletildi.

2.2.2.6. Transformasyonun Restriksiyon Analiziyle Doğrulanması

İzole edilen plazmidlerin AMV063 dizisini içerip içermediğini doğrulamak için, DNA dizisinin içinde bulunmayan ve pGEM-T vektöründe genin iki ucuna denk gelen iki bölgede bulunan *EcoRI* restriksiyon enzimi (10 U/µL, Kat. No:ER0275, Thermo Scientific) tercih edildi. İzole edilen plazmidlerden restriksiyon kesimi için karışım hazırlandı (Tablo 7). Plazmid DNA izolasyonu sırasında ortamda bulunan RNA’nın uzaklaştırılması için reaksiyon karışımında kullanılan distile su içerisine 1/1000 oranında RNaz (10 mg/mL, Thermo Scientific, Kat. No: EN0531) eklendi. Karışım 2 saat 37 °C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Kesim sonrası örnekler %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve AMV063 dizisinin varlığı, beklenen uzunluktaki bant sayesinde doğrulandı. Elde edilen plazmid, pGEM-AMV063 olarak etiketlendi ve stoklandı.

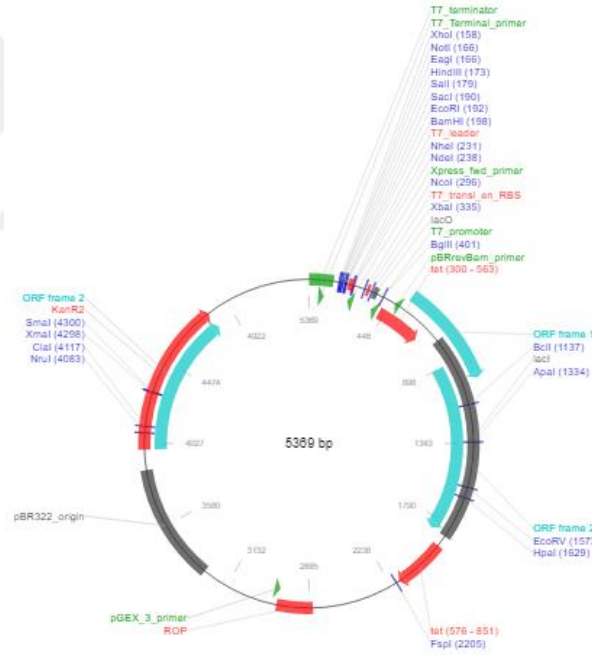
Tablo 7. *EcoRI* Restriksiyon enzimi ile kesim prosedürü

Restriksiyon Kesim Karışımı	Hacim
10X Tampon	1,5 µl
<i>EcoRI</i> (10 U/µL) enzimi	0,5 µl
Plazmid DNA	5 µl
RNaz (100 µg/ml) içeren ddH ₂ O	7,5 µl
Toplam	15 µl

2.2.3. Klonlama Vektöründeki AMV063 DNA'sının İfade Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu

2.2.3.1. Kit ile Plazmid DNA İzolasyonu

pGEM-AMV063 klonunun doğruluğu teyit edildikten sonra, AMV063 DNA sırasının klonlama vektöründen ifade vektörüne aktarılması gereklidir. Doğrulanan kolonilerden bir tanesi, ampisilin içeren 5 ml LB besiyerinde gece boyu 37 °C'lik sallayıcıda büyütüldükten sonra, ticari plazmid izolasyon kiti (Fermantas, Miniprep Gene Jet, Kat. No: K0502) kullanılarak bu klondan plazmid izolasyonu yapıldı. Aynı zamanda, *E. coli* hücrelerinde stoklanmış pET-28a vektörünün (Şekil 6) de izolasyonu yapıldı.



Şekil 6. pET-28a ifade vektörünün haritası (URL-3)

İzolasyon işlemi için, gece kültürleri mikrosantrifüj tüpünde 10.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Pellet, üzerine 250 µl "Cell Resuspension" solüsyonu eklenerek vortek ile çözüldü. Ardından 250 µl "Cell Lysis" solüsyonu eklendi ve tüp 4-5 kez alt üst edildi. Karışıma, 350 µl "Neutralization" solüsyonu eklendi, alt üst edildi ve 14.000 rpm'de 5

dakika santrifüj edildi. Süpernatant, kitin sağladığı GeneJet Mini filtreli toplama tüpüne aktarıldı ve 13.200 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı atıldı ve filtre yeni toplama tüpüne alındı. Filtrenin üzerine ayrı ayrı iki kere 500 µl “Wash” solüsyonu eklendi ve 13.200 rpm’de 1’er dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Filtre yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Filtrenin tam ortasına 30 µl “Elution” tamponu koyulup 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plazmidleri filtreden alttaki tüpe akıtmak için, örnekler 13.200 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Böylece izole edilen pGEM-AMV063 ve pET-28a plazmidlerinin konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü.

2.2.3.2. İzole Edilen pGEM-AMV063 ve İfade Vektörü pET28a’nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Kit ile izole edilen pGEM-AMV063, AMV063 dizisinin primerinin 5’ ucuna eklenen *Bam*HI (10 U/µl, NEB, Kat. No: R0136S) ve pGEM-T Easy vektörde AMV063 dizisinin klonlandığı yerden hemen sonra yer alan *Xho*I (10 U/µl, NEB, Kat. No: R0146) restriksiyon enzimleriyle kesildi. Klonlama bölgesinde her iki enzim için de kesme bölgesi bulunan pET28a vektör de aynı işleme tabi tutuldu. Kesim reaksiyonları 3’er tüp olacak şekilde hazırlandı (Tablo 8) ve 2 saat 37 °C’lik etüvde gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda sarkık uçlar oluşturuldu. Kesim ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Agaroz jel üzerinde AMV063 dizisine ve ifade vektörüne denk gelen DNA bantları lanset yardımıyla ince bir şerit halinde kesilerek agaroz jelden çıkartıldı.

Tablo 8. *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleriyle kesim prosedürü

Restriksiyon Kesim Karışımı	Hacim
10X NE Tampon	3 µl
<i>Xho</i> I (10 U/µL) enzimi	1 µl
<i>Bam</i> HI (10 U/µL) enzimi	1 µl
pGEM-AMV063 DNA (200 ng)	5 µl
ddH ₂ O	20 µl
Toplam	30 µl

2.2.3.3. Restriksiyon Enzimlerle Kesilen DNA'ların Agaroz Jelden Temizlenmesi

Agaroz Jelden çıkarılan DNA'ların temizleme işlemi için “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel, Kat. No: 740609.250) kiti kullanıldı. Kit önerisi ile jel kesitleri mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 500 µl NT1 tamponu eklendi ve 4-5 kez alt üst edildi. Karışım, daha önceden 50 °C'ye ayarlanan ısıtıcı bloğa yerleştirilip 10 dakika inkübe edildi. Tüp arada ters düz edilerek jelin erimesi sağlandı. Jel tamamen eridikten sonra karışım mikropipet ile kitin sağladığı filtreli toplama tüpüne aktarıldı. Karışım 11.000 xg'de 30 saniye santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı atıldı ve filtreye yıkama solüsyonu olan NT3 solüsyonundan 700 µl koyuldu. Tüp, 11.000 xg'de 30 saniye santrifüj edilerek yıkama işlemi 1 kez daha tekrar edildi. Filtreden geçen sıvı atıldıktan sonra tüp 11.000 xg'de 1 dakika boş olarak santrifüj edilerek kurutuldu. Toplama tüpü atıldı ve filtre yeni mikrosantrifüj tüpüne takıldı. Filtrenin tam ortasına denk gelecek şekilde 30 µl “Elution” tampon koyuldu, sıvının filtreye tam olarak nüfuz etmesi için 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 11.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilerek kesilmiş temiz DNA geri kazanıldı. DNA konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü.

2.2.3.4. AMV063 DNA'sının İfade Vektörü pET28a ile Ligasyonu

Jelden temizlenen AMV063 DNA'sını ifade vektörü pET28a'ya yapıştırmak için, mikrosantrifüj tüpünde ligasyon reaksiyonu hazırlandı (Tablo 9). Karışıma koyulacak DNA (AMV063 dizisi) ve vektörün (pET28a) nanogram hacmi, *in silico* ligasyon hesaplayıcı programa vektör ve eklenecek DNA baz uzunlukları yazılarak hesaplandı (URL-4). Ligasyon reaksiyonunda vektör:insört oranı önerilen 1:3 (50 ng/150 ng) oranında yapıldı. Hazırlanan karışım 4 °C'de gece boyu inkübe edildi. Böylece, pET28-AMV063 plazmidinin ligasyonu sağlandı.

Tablo 9. AMV063 DNA'sı ve pET28a vektörünün ligasyon reaksiyonu karışımı

Ligasyon Karışımı	Hacim
10X Tampon	1,5 µl
pET28a vektör (15 ng)	4 µl
AMV063 DNA'sı (25 ng)	2 µl
T4 Ligaz enzimi	1 µl
ddH ₂ O	6,5 µl
Toplam	15 µl

2.2.3.5. pET28-AMV063 vektörün *Escherichia coli* DH10β Kompetent Hücrelerine Transformasyonu

Geceden 3 ml LB besiyerine aşıl原因 *E. coli* DH10β hücrelerinden ertesi gün, Bölüm 2.2.2.3.'de belirtildiği gibi kompetent hücreler hazırlandı. pET28-AMV063 vektörün transformasyon işlemi Bölüm 2.2.2.4.'de belirtildiği gibi uygulandı ve kanamisin antibiyotiği içeren LB agar petri kaplarına yayma ekim yapıldı. Petriler 37 °C'de gece boyu inkübe edildi.

2.2.3.6. *Escherichia coli* DH10β Hücrelerine Transform Edilen pET28-AMV063 Vektörün Restriksiyon Analiziyle Doğrulanması

Transformasyondan sonra, oluşan kolonilerden gece kültürü hazırlandı. Kültürden TENS yöntemi ile plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve pET28-AMV063 plazmidlerin doğruluğu, *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleriyle kesilerek (Tablo 8) agaroz jel elektroforezi üzerinde doğrulandı. Ayrıca, izole edilen pET28-AMV063 plazmid DNA'sı 100-200 ng olacak şekilde MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi ve Sanger dizileme yöntemi ile genin nükleotid sırasının doğruluğu teyit edildi.

2.2.4. AMV063 DNA'sını İçeren İfade Vektörünün *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

Escherichia coli BL-21 (DE3) hücreleri Bölüm 2.2.2.3.'de belirtildiği gibi CaCl_2 yöntemi ile kompetent olarak hazırlandı. Transformasyon işlemi için kitle izole edilen pET28-AMV063 plazmid DNA'lardan 500 ng kullanıldı ve işlem bölüm 2.2.2'de belirtildiği gibi uygulandı. Transformasyondan sonra, hücreler kanamisin antibiyotigi içeren LB agar petri kaplarına yayma ekim yapıldı. Petriler 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. inkübasyondan sonra, *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerine transforme edilen rekombinant vektörün varlığı, Bölüm 2.2.2.'de belirtildiği gibi *XhoI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri kullanılarak restriksiyon analiziyle doğrulandı.

2.2.5. *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Hücrelerinde AMV063 Proteininin İfadesi

Escherichia coli BL-21 (DE3) hücrelerindeki AMV063 dizisinin protein ifadesi için, AMV063 dizisini içeren ve içermeyen kolonilerden 5 ml'lik besiyeri ile gece kültürü hazırlandı. Gece boyu büyümenin ardından hücrelerin yoğunluğu spektrofotometre ile OD_{600} 'de ölçüldü. Hücrelerin yoğunluğu 100 ml, OD_{600} 'de 0,1 olacak şekilde LB broth besiyeri ile seyreltildi. Kültür OD_{600} 'de 0,6-0,9 oluncaya kadar, yaklaşık 1,5 saat 37 °C'lik sallayıcıda 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür üzerine 100 µl IPTG (1 M) eklenerek protein ifadesi uyarıldı. Kültür 30 °C'lik sallayıcıda 200 rpm'de 4 saat boyunca büyütüldü. Hücreler 4 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülüp süpernatant atıldı.

2.2.6. AMV063 Proteininin His Kuyruğu Sayesinde Saflaştırılması

AMV063 proteini, pET28 vektöründen gelen 6 histidin (His) amino asidinden oluşan bir kuyrukla füzyon halinde üretildi. Çalışmanın devamında kullanılmak üzere, AMV063 proteininin ticari “MagneHis Protein Purification” sistem kiti (Promega, Kat. No: V8500) kullanılarak His kuyruk sayesinde saflaştırılması sağlandı.

Bölüm 2.2.5.'de elde edilen AMV063 proteinini içeren pellet 5 ml PBS içerisinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 550 µl of 1X “FastBreak Cell Lysis” tamponu ve 5 µl

DNazI eklendi. Tüp, döner mekanizmaya sabitlenip 20 dakika 20 rpm’de döndürülerek içeriğin tamamen karışması sağlandı. Sürenin sonunda süspansiyon üzerine 1 ml nikel parçacıkları ve 200 µl imidazol (1 M) eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika alt üst yaparak karıştırıldı. Manyetik desteğe yerleştirilen tüp, burada 30 saniye bekletildi. Süpernatant, nikel parçacıklara değmeden dikkatli bir şekilde pipetle mikrosantrifüj tüpüne alındı. Tüp manyetik destekten alındı ve nikel parçacıklar üzerine 500 mM NaCl içeren 750 µl “MagneHis™ Binding/Wash” tampon eklendi ve iyice karıştırıldı. Tüp yeniden manyetik desteğe yerleştirilerek 30 saniye bekletildi ve süpernatant atıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Tüp destekten alındıktan sonra nikel parçacıklar üzerine 500 µl “MagneHis™ Elution” tampon ve 100 µl imidazol (1 M) eklendi, pipetlenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletilen tüp yeniden manyetik desteğe yerleştirildi. Protein içeren süpernatant, yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak -20 °C’de saklandı.

2.2.7. AMV063 Proteinin İfadesinin SDS-PAGE ile Gösterilmesi

SDS-PAGE analizi için dikey jel elektroforezi kullanıldı (Bio-Rad, Kat. No: 1658004). Bir jel için, 5 ml %12’lik ayırma ve 1 ml %5’lik yığma olmak üzere, iki farklı jel hazırlandı.

5 ml %12’lik Ayırma Jeli

1,6 ml dH₂O
2 ml akrilamid:bisakrilamid (%30)
1,3 ml 1,5 M Tris (pH:8,8)
0,05 ml SDS (%10)
0,05 ml amonyum persülfat (%10)
0,002 ml TEMED

1 ml %5’lik Yığma Jeli

0,68 ml dH₂O
0,17 ml akrilamid:bisakrilamid (%30)
0,13 ml 1 M Tris (pH 6,8)
0,01 ml SDS (%10)
0,01 ml amonyum persülfat (%10)
0,001 ml TEMED

Ayırma jelini oluşturan malzemeler distile su içinde karıştırıldı. En son reaksiyonun katalizörü olan TEMED eklendi ve ayırma jeli, cam kasetler arasına üstte 2 cm yer kalacak şekilde dolduruldu. Jelin yüzey pürüzünü düzleştirmek için jel üzerine 2 ml izopropanol döküldü ve ayırma jeli 45 dakika oda sıcaklığında donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra izopropanol kasetler arasından alındı. Camların arası kurutma kağıdı ile iyice kurutuldu.

Ayırma jelinin üzerine, %5'lik yığma jeli hazırlandı ve kaset tamamen dolduruldu. Yığma jelinin üzerine, 1 mm kalınlığında kuyucuklar oluşturan 10 gözlü tarak yerleştirildi ve jel 30 dakika donmaya bırakıldı. Üst jel de donduktan sonra tarak çıkartıldı. Jel elektroforez tankına alınarak üzerine yürütme tamponu dolduruldu.

500 ml Yürütme Tamponu (pH 8,3)

1,5 gr Tris

7,2 gr Glisin

5 ml %10 SDS

Son hacim dH₂O ile 500 ml

Bölüm 2.2.6.'da belirtildiği gibi, *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ifadesi sağlanan AMV063 proteini saf olarak elde edildikten sonra, proteinin 20 µl'si yeni bir tüpe alındı. Hazırlanan 2x yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve protein, 5 dakika, 95 °C'ye ayarlı ısıtıcı blokta kaynatıldı.

1 ml 2x Protein Yükleme Tamponu

150 µl Tris-HCl (1 M) (pH 6,8)

400 µl %10 SDS

250 µl Gliserol

140 µl Bromofenol blue boyası

60 µl β-merkaptoetanol

Hazırlanan örnekler ve standart protein markırı (PAGE ruler ladder, ThermoFisher Scientific, Kat. No: 26616) jele yüklenerek elektroforez başlatıldı. Örnekler 20 dakika 80 V'de, ardından 1,5 saat 120 V'de yürütüldü. Yürütme sonrasında jel fiksasyon ve renk giderme solüsyonu (50 ml metanol, 10 ml asetik asit, 40 ml dH₂O) ile birlikte bir küvet içerisinde 30 dakika 50 rpm'de sallanarak fikse edildi.

Fiksasyondan sonra, jel boyama kabına alındı ve 40 dakika CBB boyası (10 mg Coomassie brilliant blue, 5 ml %95'lik EtOH, 10 ml %85'lik fosforik asit ve dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır) ile muamele edildi. Boyama sonrası fazla boyanın jelden akıtılması için, jel 3 kez 10'ar dakika fiksasyon ve renk giderme solüsyonunda yıkandı. Böylece,

AMV063 proteininin ifadesi, SDS-PAGE jeli üzerinde ~27 kDa'lık bandın mevcudiyetine göre doğrulandı.

2.2.8. AMV063 Proteininin Western Blot Analizi

Bölüm 2.2.7'de belirtilen yöntem ile %12'lik ayırma ve % 5'lik yığma jeli içeren SDS-PAGE jeli hazırlandı, His kuyruğu sayesinde saflaştırılan protein örnekleri jele yüklendi ve yürütüldü. Yürütme sonrasında jel elektroblotlama işlemi için hazırlandı. Jel boyutunda kesilen 4 whatman kağıdı, 20 ml metanol ve 80 ml elektroblotlama solüsyonu (48 mM Tris-HCl, 39 mM Glisin, % 0,0375 SDS) içeren karışım ile ıslatıldı. Jel boyutunda kesilen PVDF (Polivinilidendiflorid) membran ise önce 1 dakika methanol ile, ardından methanol:elektroblotlama tamponu (1:4) ile muamele edildi. Elektroblotlama cihazına; ıslatılan 2 tane whatman kağıdı, membran, jel ve tekrar 2 whatman kağıdı üst üste konularak sandviç yapısı oluşturuldu. Cihaz, 20 mA akımda, 1,5 saat çalıştırılarak proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Nitroselüloz membran, %5 süt tozu ve %0,05 Tween-20 içeren 50 ml PBS bloklama solüsyonu içerisine alınarak, 45 rpm'de 37 °C'lik sallayıcıda 1 saat sallandı. Ardından bloklama solüsyonu döküldü. Membran %0,5 süt tozu ve %0,05 Tween20 içeren 500 ml PBS yıkama solüsyonu içerisinde 10'ar dakikalık 3 tur halinde sallayıcıda yıkandı. Yıkama işleminden sonra, 50 ml'lik tüp içerisine 5 ml yıkama solüsyonu ve 2,5 µl anti-His antikoru (Sigma, Kat. No: H1029) eklendi. Membran, tüpün cidarına yerleştirildi ve döndürerek karıştıran cihazda 3 saat döndürüldü. Ardından membran tüpten alınarak, yeniden 3 kere 10'ar dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yeniden, 50 ml'lik tüpün içerisine 5 ml yıkama solüsyonu ve bu kez 2,5 µl anti-fare IgG-Alkalın fosfataz antikoru (Sigma, Kat. No: A3462) eklendi. Membran tüpün cidarına yerleştirilerek cihazda 2 saat daha döndürüldü. Membran 3 kere 10'ar dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra membran 2 kere 10'ar dakika AP solüsyonu (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) ile yıkandı. Yıkama solüsyonu atılarak membran üzerine 10 ml AP ve 100 µl NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium ve Bromochloroindolyl fosfat, Roche, 11681451001) içeren karışım döküldü ve bantlar görünür olana kadar sallandı. Bantlar görünür hale geldiğinde, membran su ile yıkandı ve reaksiyon durduruldu.

2.2.9. Diyaliz Yöntemiyle AMV063 Proteininin Temizlenmesi

Kit yardımıyla saflaştırılan proteinin, kit içeriğinde bulunan kimyasallardan temizlenmesi için diyaliz metodu uygulandı. Yarı geçirgen zar olan diyaliz membran (10 kDa MWCO (Molecular weight cut-off)) yaklaşık 15 cm uzunluğunda kesildi ve beherde %2 NaHCO₃ ve 1 mM EDTA içeren 500 ml distile su içerisinde 10 dakika kaynatıldı. Daha sonra diyaliz zarı distile su içerisine alındı ve 10 dakika daha kaynatılarak kullanıma hazır hale getirildi. Diyaliz membranının bir ucu toka ile tutturulup açık olan uçtan saf AMV063 proteini zarın içine dolduruldu. Ardından zarın bu ucu da toka ile tutturuldu. Beher içerisine PBS tamponu ve manyetik karıştırıcı koyulduktan sonra protein içeren zar behere koyuldu. AMV063 proteini, karıştırıcı blok üzerinde 20 rpm’de döndürülerek ve 6 saatte bir PBS tamponu yenisi ile değiştirilerek diyaliz işlemine tabi tutuldu. Böylece, saflaştırma sırasında kullanılan imidazol ve küçük moleküler ağırlığa sahip proteinler, AMV063 proteininden uzaklaştırıldı.

2.3. Muhtemel Kaspaz ORF’si (AMV063) Silinmiş Rekombinant Virüsün Oluşturulması

Bir genin fonksiyonunu veya virüs için yaşamsal olarak önemli olup olmadığını analiz etmek için ilk basamak o genin genomdan silinmesidir. Genetik mühendisliğinde yaygın gen silme yöntemlerinden biri homolog rekombinasyondur. Homolog rekombinasyon, benzer veya aynı DNA dizisine sahip genler arasında meydana gelen genetik değişimdir (Alberts vd., 2002) Homolog rekombinasyon için sırasıyla AMV063 ORF’sinin yukarı kısmını, *gfp* genini ve AMV063 ORF’sinin aşağı kısmını içeren rekombinant vektör (pBS-ΔAMV063/*gfp*) oluşturuldu. LD652 hücrelerine virüs enfeksiyonunu takiben rekombinant vektörün transfeksiyonu yapıldı. Rekombinasyon, virüsteki AMV063 ORF’sinin işaret geni *gfp* (green floresan protein) ile yerinin değiştirilmesiyle gerçekleştirildi. Rekombinant virüs seçildi ve saflaştırılması için plak deneyi yapıldı.

2.3.1. AMV063 ORF'sinin Yukarı ve Aşağı Sıralarının ve *gfp* Dizisinin PCR ile Çoğaltılması

AMV063 ORF'sinin yukarısında ve aşağısında yaklaşık ~500 bp DNA dizilerini çoğaltacak şekilde, bu dizilere özgü primerler, restriksiyon enzim kesim bölgeleri de eklenerek tasarlandı (Tablo 10).

Tablo 10. AMV063 dizisinin yukarı ve aşağı bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Sırası	Enzim
AMV063upFw	5'- <u>TCTAGAGACGAATGTACTGTAAATGAACTT</u> -3'	<i>XbaI</i>
AMV063upRv	5'- <u>GGATCCCTTTGGAATTATTATGACCCA</u> -3'	<i>BamHI</i>
AMV063dFw	5'- <u>AAGCTTCCTTCACATATTATGATATCTACAT</u> -3'	<i>HindIII</i>
AMV063dRv	5'- <u>GGTACCCTACTACCATGAATCAAAATTTG</u> -3'	<i>KpnI</i>

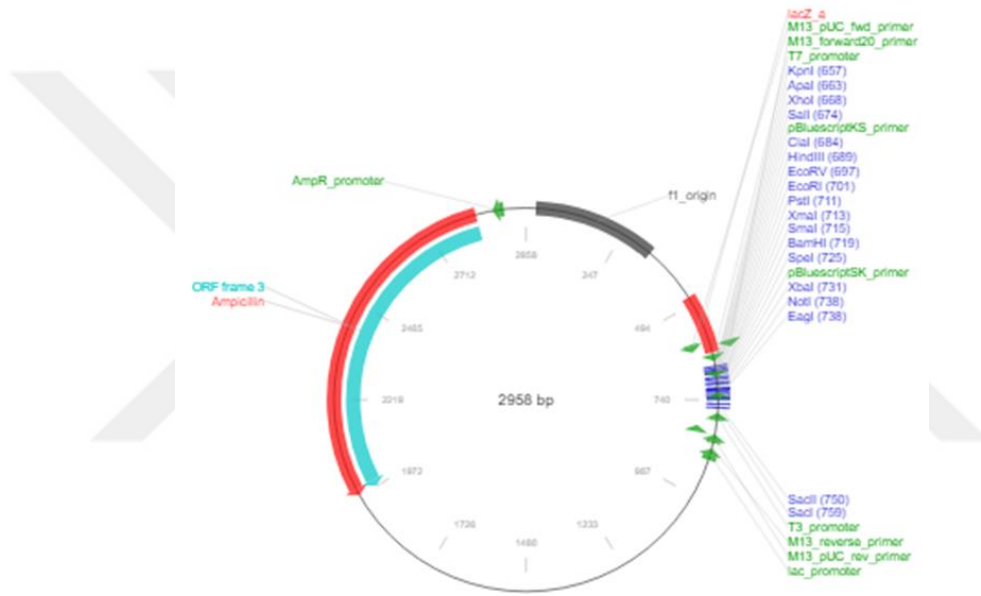
Her iki dizi için PCR reaksiyon içeriği, Bölüm 2.2.1.'de elde edilen genomik DNA kalıp olmak üzere Bölüm 2.2.2.1.'de belirtildiği gibi hazırlandı. AMV063 ORF'sinin yukarı ve aşağı sıraları, iTaq DNA polimeraz (Intron, Kat. No: 25022) ile uygun koşullarda hazırlanan PCR reaksiyonuyla çoğaltıldı. PCR reaksiyonu Tablo 6'da verilen koşullarda, primer bağlanma sıcaklığı 58 °C'ye değiştirilerek gerçekleştirildi. PCR ile çoğaltılan DNA'lar %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde 30 dakika yürütülüp görüntülenerek doğrulandı.

2.3.2. AMV063 ORF'sinin Yukarı ve Aşağı Sıralarının Klonlanması

AMV063 ORF'sinin yukarı ve aşağı sıralarının çoğaltılmasından sonra, her bir dizinin pGEM-T Easy vektöre klonlanması, transformasyonu ve doğrulanması (pGEM-AMV063up ve pGEM-AMV063down), Bölüm 2.2.2.'deki gibi yapıldı. *gfp* DNA dizisi, mevcut laboratuvar stoklarından (pGEM-*gfp*) çoğaltıldı ve tez kapsamında kullanıldı.

2.3.3. *gfp* DNA'sını İçeren Transfer Vektörünün Oluşturulması

Homolog rekombinasyon çalışmasında kullanılmak üzere, transfer vektörü oluşturmak için pBluescript SK(-) vektörü kullanıldı (Şekil 7). pGEM-AMV063up içeren doğrulanmış kolonilerden ve pBlueScript SK(-) vektörü içeren *E. coli* hücrelerinden kit ile plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Plazmidler *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile Bölüm 2.2.2.6.'de belirtilen kesim reaksiyonu yöntemine göre kesildi.



Şekil 7. pBlueScript SK(-) vektörün haritası (URL-5)

Kesim sonucunda pBlueScript SK(-) vektörünün 5 µl'si %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, kullanılan DNA'nın tamamının kesildiği doğrulandı. Tamamı kesilen pBlueScript SK(-) vektörü, sıvı halde jelsiz temizlemeye imkan sağlayan "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up" (Macherey-Nagel, Kat. No: 740609.250) kiti ile temizlendi. Kesim ürününün üzerine 2 katı hacimde 180 µl NTI Tampon eklendi ve karışım filtreli kolonlara aktarıldı. Ardından Bölüm 2.2.3.3.'de belirtilen jelden temizleme protokolünün devamı uygulandı.

pGEM-AMV063up plazmidin ise kesim ürününün tamamı %1'lik agaroz jel elektroforezi kuyucuklarına yüklenerek yürütüldü. Oluşan bantlardan yukarı dizisine ait olan bant, jel üzerinden ince bir bant halinde kesildi ve bölüm 2.2.3.3.'deki gibi temizlendi.

Kesilmiş pBluescript SK(-) vektörü ve yukarı dizisinin DNA'sı, T4 ligaz enzimi kullanılarak ligasyona tabi tutuldu. Karışıma koyulacak DNA dizisi (yukarı bölge) ve vektörün (pBluescript SK(-)) nanogram hacmi, *in silico* ligasyon hesaplayıcı programa vektör ve DNA dizisi baz uzunlukları yazılarak hesaplandı (URL-4). Ligasyon reaksiyonu önerilen 1:3 pBluescript SK(-):AMV063up oranı kullanılarak Tablo 9'da verilen şekilde hazırlandı.

Gece boyu 4 °C'de inkübe edilen ligasyon ürününün 3 µl'si CaCl₂ yöntemi ile hazırlanan kompetent *E. coli* DH10β hücrelerine transforme edildi. Sallayıcıdaki, 1 saatlik büyüme sonrasında hücreler, 40 µl IPTG ve 40 µl X-gal ile kaplanan ampisilinli (100 mg/ml) LB agar petrilere yayma ekim yapıldı. Gece boyu 37 °C'de büyüyen mavi-beyaz kolonilerden, 5-6 beyaz koloni seçilerek Amp⁺ besiyerinde büyütüldü. Seçilen kolonilerden TENS yöntemi ile plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmidler *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi ve AMV063 ORF'sinin yukarı DNA'sının pBluescript SK(-) vektöründeki varlığı doğrulandı. Elde edilen vektör, pBS-AMV063up olarak isimlendirildi ve stoklandı.

pBluescript SK(-) vektöründe yukarı dizisinin yanına aşağı dizisini klonlamak için; doğrulanan pBS-AMV063up ve pGEM-AMV063down içeren kolonilerden gece kültürü hazırlandı ve ertesi gün kit ile her iki plazmidin de izolasyonu yapıldı. Her plazmid, AMV063down dizisinin uçlarında bulunan *Kpn*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile 37 °C'lik etüvde 2 saat kesildi. Kesim sonrasında karışımlar %1'lik agaroz jel elektroforezinde 30 dakika yürütüldü ve görüntülendi. pBS-AMV063up vektörüne ait olan tek bant jelden kesildi. Biri pGEM-T vektöre diğeri AMV063 aşağı bölgesine ait olan iki bant ise AMV063down dizisine ait olanı kesildi. Her iki bant da Bölüm 2.2.3.3.'de belirtilen yöntem takip edilerek temizlendi. pBS-AMV063up:AMV063down oranı, 1:3 oranında olacak şekilde Tablo 9'daki gibi ligasyon karışımı hazırlandı. Gece boyu 4 °C'de inkübe edilen ligasyon ürününün 3 µl'si CaCl₂ yöntemi ile hazırlanan kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine transform edildi. Hücreler 1 saatlik büyüme sonrasında 40 µl IPTG ile kaplanan Amp⁺ LB agar petrilere yayma ekim yapıldı. Transformasyondan sonra, 37 °C'de gece boyu büyüyen ve ilk klonlama sonrasında vektörün beta-galaktosidaz geni bozulduğu için hepsi beyaz olan kolonilerden 5-6 koloni seçilerek Amp⁺ besiyerinde büyütüldü. Seçilen kolonilerden TENS yöntemi ile plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmidler hem AMV063up dizisine (*Xba*I ve *Bam*HI) hem de AMV063down dizisine ait (*Hind*III ve

KpnI) restriksiyon enzimleriyle ayrı ayrı kesildi. Kesim ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenerek hem AMV063up dizisinin hem de AMV063down dizisinin pBluescript SK(-) vektörü içindeki, varlığı doğrulandı. Elde edilen yeni vektör, pBS-AMV063updown olarak isimlendirildi ve stoklandı.

Doğrulan pBS-AMV063updown içeren kolonilerden ve pGEM-*gfp* kolonilerinden gece kültürü hazırlandı ve kit ile her iki plazmid için DNA izolasyonu yapıldı. Plazmid DNA'lar, kesme dizisi pBluescript SK(-) vektöründe AMV063up ve AMV063down dizilerinin klonlandığı bölgelerinin arasında ve pGEM- *gfp* vektörü üzerinde *gfp* dizisinin iki ucunda bulunan, *EcoRI* restriksiyon enzimi ile 37 °C'lik etüvde 2 saat kesildi. Kesim sonrasında örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Agaroz jelde pBS-AMV063updown vektörüne ve *gfp* genine ait olan bantlar kesilerek temizlenmek üzere mikrosantrifüj tüplere alındı. Jel kesitleri "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up" kiti ile Bölüm 2.2.3.3.'de belirtilen yöntemle göre temizlendi. Temizlenen vektör (pBS-AMV063updown) ve *gfp* dizisi için 1:3 oranında olacak şekilde Tablo 9'daki gibi ligasyon karışımı hazırlandı ve karışım gece boyu 4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra ligasyon hacminin 3 µl'si CaCl₂ yöntemi ile hazırlanan kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edildi. Gece boyu 37 °C'de büyütülen kolonilerin plazmidleri *EcoRI* enzimi ile kesilerek *gfp* geninin varlığı %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulandı. Elde edilen plazmid, pBS-Δ063/ *gfp* olarak isimlendirildi ve stoklandı.

2.3.4. Transfer Vektörün LD652 Hücrelerine Transfeksiyonu

LD652 hücreleri 6 gözlü kaba, göz başına $9,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde bırakıldı. Hücreler tutunmaları için 2 saat etüvde bekletildi. Hücreler tutunduktan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve yerine 900 ml enfeksiyon sıvısı (6 µl AMEV virüs ($7,76 \times 10^8$ pfu/ml) ve 894 µl FBS içermeyen besiyesi) MOI = 5 olacak şekilde eklendi. Hücreler, oda sıcaklığında, 3 rpm hızındaki sallayıcı üzerinde, 2 saat virüslerin hücreye tutunması için inkübe edildi. Diğer yandan, transfeksiyon karışımı hazırlandı. Bunun için önce, 5 µg pBS-Δ063/*gfp* DNA'sı ve 15 µl lipofektin, ayrı ayrı 100'er µl FBS katkısız besiyerinde seyreltildi. Seyreltilen solüsyonlar, birbirine karıştırıldı ve oda sıcaklığında 40 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonuna doğru, enfeksiyon yapılan hücrelerin üzerinden

sıvılar alındı. Hücreler katkısız besiyeriyle yıkandı ve 800 µl katkısız besiyeri eklenen transfeksiyon karışımı (200 µl), hücrelerin üzerine bırakıldı. İnkübasyon, 5 saat 28 °C'lik etüvde yapıldı. Sürenin sonunda, besiyeri hacmi, FBS'li besiyeriyle 3 ml'ye tamamlanarak inkübasyona devam edildi. Homolog rekombinasyon ile GFP ışıması yapan virüsleri görebilmek için, inkübasyonun 4. gününden itibaren inverted floresan mikroskop (Auxovert, Zeiss Kat. No: 16312) ile GFP varlığı araştırıldı. Yeterince GFP proteinini görüldüğünde, hücreler 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak 4 °C, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve GFP üreten virüsler süpernatantta toplandı. Böylece, Am-Δ063/*gfp* olarak kodlanan GFP'li virüsü içeren süpernatant, 4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.5. Rekombinant Virüsün Çoğaltılması

Homolog rekombinasyondan sonra, AMV063 ORF'si yerine *gfp* geni içeren Am-Δ063/*gfp* rekombinant virüsün çoğaltılması için, LD652 hücreleri kullanıldı. Hücre kültür kabının her iki gözüne $9,5 \times 10^5$ LD652 hücresi bırakıldı ve kap, 2 saat hücrelerin tutunması için etüvde bekletildi. Hücreler tutunduktan sonra, üzerlerindeki besiyeri atılıp, bir göze kontrol amacıyla 1 ml FBS içeren besiyeri ve diğer göze 1 ml virüs karışımı (100 µl GFP'li virüs süpernatantı ve 900 µl FBS içeren besiyeri) eklendi. Kültür kabı oda sıcaklığında 2 saat 3 rpm'de sallanarak virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. Sürenin sonunda, her göze taze besiyeri eklenerek, hacim 3 ml'ye tamamlandı ve kültür kabı 28 °C'lik enfeksiyon etüvüne bırakıldı. Enfeksiyon belirtileri yaklaşık 4-5 gün sonra inverted floresan mikroskop altında bakılarak tayin edildi. GFP'li virüs yoğunluğunun arttığı 6. günde hücreler mikrosantrifüj tüpüne alındı, 4 °C'de, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve GFP üreten virüsler süpernatantta toplanarak yeni mikrosantrifüj tüpünde ve 4 °C'de saklandı.

2.3.6. Rekombinant AMEV Virüsünün (Am-Δ063/*gfp*) Saflaştırılması

Rekombinant virüsün saflaştırılması için plak deneyi uygulandı. Deney için, düşük erime sıcaklığına sahip agaroz kullanılarak (Sigma Aldrich, Kat. No: A9045) %2,5'luk agaroz hazırlandı. Önce, 1,2 g agaroz ve 50 ml distile su 100 ml'lik erlenmayerde

kariştırılarak 1 dakika mikrodalga fırında kaynatıldı, ardından otoklavda steril edildi ve plak deneylerinde kullanılabilecek kadar 4 °C’de saklandı.

LD652 hücreleri, 6 gözlü kültür kabının her bir gözüne $9,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde bırakıldı ve hücrelerin tutunması için etüve yerleştirildi. Tutunma işleminden sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri atıldı. Steril kabin içerisinde 5 mikrosantrifüj tüpünün her birine 900 µl LD652 besiyeri koyuldu. Birinci tüpe 100 µl rekombinant AMEV virüs süspansiyonundan koyuldu. Sonraki tüplere bir önceki tüpten 100 µl karişım alınarak 10 kat seyreltik virüs karişımları elde edildi. Son tüpteki hacmi de 1 ml yapmak için 100 µl sıvı çöpe atıldı. Üzerinden büyüme besiyeri atılan 6 gözlü kültür kabındaki hücrelere, hazırlanan 1’er ml virüs karişımı eklendi. Kontrol için ayrılan son göze, sadece 1 ml besiyeri eklendi. Kültür kabı oda sıcaklığında 2 saat 3 rpm’de sallanarak virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. Bu sırada, 4 °C’de saklanan agaroz, sterilliği bozulmadan, mikrodalga fırında eritildi, 42 °C’ye ayarlı su banyosuna alındı ve sıcaklığı 42 °C’ye getirildi. Aynı zamanda besiyeri ve agarozu kariştırmak için kullanılacak olan erlenmayer de su banyosuna alınarak ısıtıldı. Hücrelerin üzerine eklenecek agaroz+besiyeri karişımı, ısınmış olan erlenmayer içinde 1:1 oranında kariştırılarak hazırlandı. Tutunma işleminin sonunda, hücrelerin üzerindeki sıvı alındı. Agaroz+besiyeri karişımının ısısının, hücreleri yakmayacak ve dökerken donmayacak şekilde olduğu kontrol edildi. Karişım her göze 2,5 ml olacak şekilde hücrelere direk temas ettirmeden (kültür kabının yan çeperinden) pay edildi. Agaroz tamamen katılaştıktan sonra, kültür kabının kapağı kapatılarak nemli peçeteye sarılı halde kilitli torba içerisinde enfeksiyon etüvüne alındı. Yaklaşık 4-5 günün ardından inverted floresan mikroskop altında GFP ışımları görünmeye başladı.

İnkübasyonun 6. gününde, 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltiklerinden mikroskop altında AmΔ063/*gfp* virüslü plak seğimi yapıldı. Bunun için, GFP ışımasının olduğu ama yaban tip virüsün az olduğu bölge, cam kalemi ile kültür kabının altından ışaretlenmeye çalışıldı. Belirlenen alandaki rekombinant virüsleri çoğaltmak için, 10 µl’lik pipet ucu ile agaroz delindi ve kültür kabının dibinden hücre-virüs süspansiyonu alındı. Alınan örnek, 1 ml besiyeri içerisinde çözüldü ve sonraki plak deneylerinde kullanılmak üzere 4 °C’de saklandı. Deney 4. plak işlemine kadar yeni seyreltikler hazırlanarak devam ettirildi (Tablo 11).

Mikroskop altında yaban tip virüs görülmeyen 4. plak işleminin 10^{-2} seyreltiğinden toplanan hücreler 4 °C, 5000 rpm 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant enfeksiyon için saklandı. Daha önce yapılan 3. plak işlemi sonrasında saklanan pelletten ve bu 4. plak

pelletinden, kit ile genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar ve AMV063 ORF'si ve *gfp* genine özgü primerler kullanılarak, rekombinasyonun doğrulanması amacıyla PCR reaksiyonu uygulandı. Tablo 6'daki gibi hazırlanan PCR reaksiyonu ürünleri, %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi.

Rekombinant virüsün saflığının garantilenmesi amacıyla yapılan 5. plak işleminden sonra, floresan mikroskop altında hiçbir floresan ışıma görülmedi.

Tablo 11. Rekombinant virüs saflaştırmada kullanılan plak sayıları

Plak sayısı	Seyreltme oranları	Sonraki plakta kullanılan seyreltik
1. plak	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}	10^{-2}
2. plak	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}	10^{-3}
3. plak	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}	10^{-2}
4. plak	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}	10^{-2}

2.3.7. Rekombinant AMEV (*AmΔ063/gfp*) Virüsün Büyük Hacimlerde Çoğaltılması

Rekombinant (*AmΔ063/gfp*) virüsleri ve kontrol virüs olarak kullanılacak olan daha önce sferoidin geni çıkartılan AMEV virüsleri (*AmΔsph/gfp*) çoğaltmak için, 8'er adet T75 flask kullanıldı. Her flaska 9×10^6 LD652 hücreleri bırakıldı. Hücreler tabana tutunmaları için iki saat etüvde inkübe edildi. Eski besiyeri atılarak hücrelerin üzerine, 250 µl virüs solüsyonlarından ve 1750 µl besiyeri bırakılarak virüslerin hücreye tutunması sağlandı. Enfeksiyon sonrası, flasklar içindeki besiyeri hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Flasklar, hücrelerde ışıma görününceye kadar enfeksiyon etüvünde bekletildi. Enfeksiyonun 6. günü hücreler, 50 ml'lik steril tüplerde toplanıp 4 °C, 5000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Virüs içeren süpernatantlar, steril tüplerde 4 °C'de saklandı. Böylece, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere hem *AmΔ063/gfp* hem de *AmΔsph/gfp* virüs solüsyonları elde edildi.

2.3.8. Çoğaltılan Virüs Miktarlarının Belirlenmesi

Rekombinant (*AmΔ063/gfp*) ve kontrol grup (*AmΔsph/gfp*) virüslerin konsantrasyonlarını tayin etmek için, EPDA (End Point Dilution Assay, Son Nokta Seyreltme Deneyi) yöntemi kullanıldı. İlk olarak 10 mikrosantrifüj tüpü, 1'den 10'a kadar etiketlendi. Her tüpe 90 µl besiyeri eklendi. Ardından ilk tüpe çoğaltılan stok virüsten 10 µl eklenerek iyice karıştırıldı. Sonraki tüpe bir önceki tüpten 10 µl karışım eklenerek 10 katlık seri seyreltikler oluşturuldu. Son tüp olan 10. tüpe virüs karışımı eklenmedi. Her tüpe 90 µl $1,5 \times 10^6$ hücre/ml olarak ayarlanan LD652 hücresi koyuldu ve virüs hücre karışımı elde edildi. Karışımlar, 60 gözlü Terasaki kaplarına her satırdaki gözlere aynı karışımdan 6 tekrar olacak şekilde 10'ar µl olarak dağıtıldı. Terasaki kabı, ıslak peçete arasına sarılarak ve kilitli torbaya yerleştirilerek, enfeksiyon etüvünde inkübe edildi. Enfeksiyonun 5. gününde, floresan mikroskop altında, kabın her gözü floresan ışımının var olup olmasına göre tarandı ve ışımının varlığına göre artı (+) ve eksi (-) olarak not edildi. Her satırdaki 6 tekrarın yüzde olarak virüs pozitif oranları hesaplandı (6 gözün 2 tanesinde virüs ışması var ise $2/6 \times 100 = 33,3$ olarak hesaplandı). Virüsün ml'deki konsantrasyonu (pfu/ml) EPDA standart formülü kullanılarak hesaplandı. Böylece, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere hem *AmΔ063/gfp* hem de *AmΔsph/gfp* virüs solüsyonlarındaki virüs miktarları belirlendi.

Standart formül, 1 ml'de plak oluşturan ünite (pfu/ml) = $10^{(a+x)} \times 100/\text{ml}$

n = enfekte olmuş virüs yüzdesinin 50 veya üzerinde olduğu en seyreltik değer

a = logaritma n,

b = n. seyreltik değerinin yüzdelik değeri

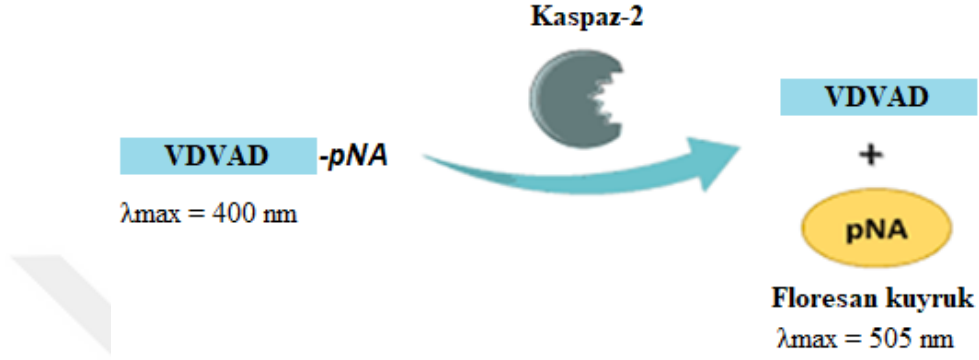
c = n. seyreltik değerinin altındaki yüzdelik değer

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

2.4. AMV063 Proteininin ve *AmΔ063/gfp* Virüsün Kaspaz-2 Aktivitesinin Araştırılması

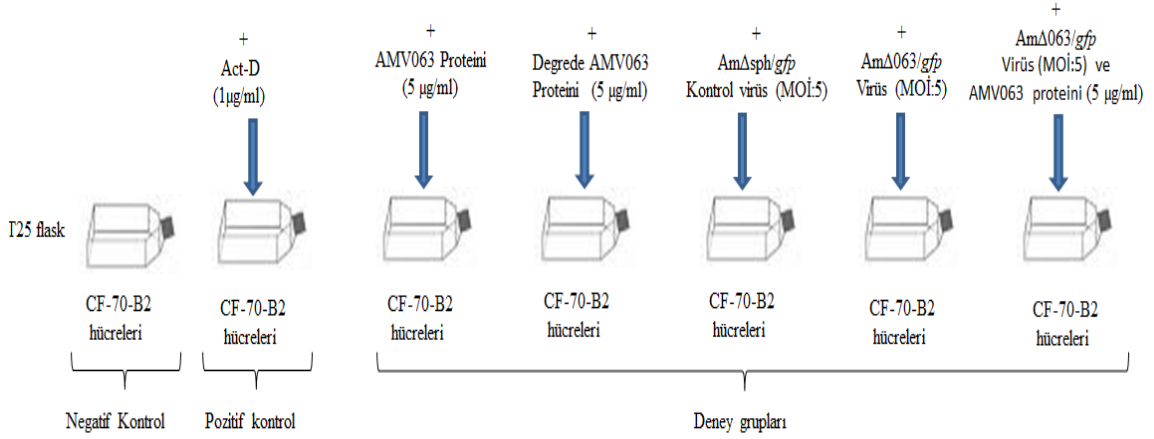
Kaspaz-2 proteazları apoptozisin erken aşamalarında aktifleşen bir enzimdir. Hücrede ifadesi arttığında apoptozisi uyaran kaspaz-2 proteazının aktivite testleri, temelde kaspaz-2'nin substratı olan VDVAD (Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp) peptidin parçalamasının tespitine dayanır. VDVAD peptidi, ucuna bağlanan bir floresan prob (pNA, p-nitroanilid)

sayesinde mavi ışık yayar ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$), kaspaz-2'nin VDVAD substratını parçalaması sonucu peptidin ucundaki floresan prob pNA ayrılır ve bu kez sarı-yeşil renk floresan ışığa ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$) yayar (Şekil 8). Kaspaz-2 aktivitesine bağlı ışımalar florometre ile ölçülerek ortamdaki kaspaz-2 aktivitesi tespit edilir (Kitevska vd., 2014).



Şekil 8. Kaspaz-2'nin aktivitesinin florometrik tayini (URL-6).

AMV063 proteininin kaspaz-2 aktivitesini test etmek için, “Caspase-2 Fluorometric Assay” Kit (Biovision, Kat. No: K116-100) kullanıldı. Öncelikle, CF-70-B2 hücreleri T25 flasklarına $1,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde bırakıldı. Hücreler 2 saat tutunduktan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak rekombinant (*AmΔ063/gfp*) virüs, kontrol grubu (*AmΔsph/gfp*) virüs ve AMV063 proteinin farklı kombinasyonları ile aşağıdaki gibi (Şekil 9) muamele edilerek 2 saat oda sıcaklığında 3 rpm’de sallandı. Apoptozisin pozitif kontrolü olarak hücreler apoptozise sebep olduğu bilinen aktinomisin D (Serva, Kat. No: 160022) kullanıldı (Paul vd., 2007). Ardından hücreler besiyeri ile 5 ml’ye tamamlanıp 48 saat için enfeksiyon etüvüne bırakıldı. İnkübasyonun ardından, hücreler 15 ml’lik tüplere aktarılıp 4 °C’de, 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, hücrelerin sitopatik etkileri inverted ışık mikroskobu ile görüntülenip 40X büyütme gücünde fotoğrafları çekilerek kaydedildi.



Şekil 9. CF-70-B2 hücrelerinin AMV063 proteini ve AmΔ063/*gfp* virüs ile muamelesi

Pellet, kaspaz-2 kitinin içinde bulunan 50 µl “Cell Lysis” Tampon ile çözüldü. Tüpler 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Buzda bekleyen tüplere 10 mM DTT içeren 50 µl 2x “Reaction” Tampon eklendi ve mikropipet ile karıştırıldı. Bu kez tüplere 5 µl VDVAD-AFC (1 mM) substrat eklenerek yeniden karıştırıldı. Tüpler 37 °C’lık etüvde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, örnekler 96 gözlü siyah plakaya, 3 tekrar olarak dağıtıldı. Spektrofotometrede 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon filtresi ile florometrik ölçüm yapıldı. Deney farklı zamanlarda 3 tekrar olacak şekilde yapıldı. Elde edilen değerler, SPSS (Versiyon 23) istatistik programı yardımıyla varyans analizine tabi tutuldu. Önem derecesi olarak $p>0,05$ kullanıldı.

2.5. AMV063 Proteininin ve AmΔ063/*gfp* Virüsünün Apoptozis Etkisinin TUNEL Testi ile belirlenmesi

Apoptozisin en önemli özelliklerinden biri, nükleazların nükleer DNA’yı düzgün kırıklar haline getirmesidir. Bu enzimler, hücre ölümü programını yürüten protein ailesi olan kaspazlar tarafından aktive edilir. TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP kırık uç etiketleme) testi, apoptotik hücreleri tespit etmek için DNA’nın parçalanması özelliğinden yararlanan bir yöntemdir. Bu yöntemde, terminal deoksinükleotidil transferaz adı verilen bir enzim, dUTP nükleotitlerinin, parçalanmış

DNA'nın serbest 3' uçlarına eklenmesini kataliz eder. Floresan veya renk üretebilen kimyasal etiketlerle etiketlenmiş dUTP'ler kullanılarak, apoptotik hücreler özel olarak tanımlanabilir (Alberts vd., 2002; Liu vd., 2016).

TUNEL testi için, “TiterTACS In Situ Detection” Kiti (R&D system, Kat. No: 4822-96-K) ve üretici firmanın önerdiği yöntemler kullanıldı. Apoptozise duyarlı CF-70-B2 hücreleri T25 flaska bırakıldı. Hücreler 2 saat tutunduktan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı. AMV063 protein ve virüs kombinasyonları Şekil 9’da belirtilen miktarlara göre dağıtılarak muamele yapıldı. Ardından, hacim besiyeri ile 5ml’ye tamamlanarak 48 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, hücreler oda sıcaklığında 500 xg’de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant atılarak hücreler yeniden santrifüjde PBS ile yıkandı ve süpernatant atıldı. Hücreler, %3,7 formaldehit içeren tampon ile çözülerek oda sıcaklığında 7 dakika fikse edildi. Sürenin sonunda, yeniden 5 dakika 500 xg’de santrifüjlenen hücreler, bir kez de PBS ile yıkanarak yeniden santrifüjlendi. Hücrelerin üzerinden PBS atıldıktan sonra, fiksasyona maruz bırakılan hücrelerin üzerine %100 metanol eklendi ve oda ısısında 20 dakika bekletildi. Ardından hücresel örneklerin üzerindeki metanol atıldı ve PBS ile 2 kez yıkandı. Santrifüjlenen hücrelerin pelleti PBS ile çözüldü. Hücreler sayıldı ve her göze 1×10^5 hücre olacak şekilde, 96 gözlü plakaya dağıtıldı. Kuyu başına 50 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Ardından plaka, 3 dakika 1000 xg’de santrifüj yapıldı ve hücrelerin üzerindeki tampon atıldı. Gözler 200 µl distile su ile yıkandı. Her yıkama sonrası plaka santrifüjlendi. “TACS-Nuclease” solüsyonu kullanılarak pozitif kontrol oluşturuldu. PBS ile yıkanan örnekler 50 µl %3’lük hidrojen peroksit (H_2O_2) eklendi. H_2O_2 muamelesinden sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen gözler yıkandı ve kuyucuk başına 150 µl “TdT Labeling” tampon eklendi. Yeniden, 5 dakika inkübasyonun ardından santrifüjle süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından örnekler 50’şer µl “Labeling Reaction Mix” eklenerek 1 saat nemli ortamda ve ışık geçirmeyen kap içerisinde 37 °C’de inkübe edilerek işaretlenme sağlandı. İşaretlemeyi durdurmak için 150 µl “TdT Stop” tampon eklenerek 5 dakika beklendi. Plaka santrifüj edilerek tamponlar atıldı ve örnekler 2 kez daha PBS ile yıkandı. Ardından örnekler 50 µl “Strep-HRP” solüsyonu ile 10 dakika muamele edildi ve 4 kez PBS ile yıkandı. Plakanın gözlerine, 100 µl “TACS-Sapphire” solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. En son, 100 µl HCl (0,2 M) ile reaksiyon durduruldu ve plaka okuyucuda 450 nm’de absorbans ölçüldü. Elde edilen değerler, SPSS (Versiyon 23) istatistik programı yardımıyla varyans analizine tabi tutuldu. Önem derecesi olarak $p < 0,05$ kullanıldı.

3. BULGULAR

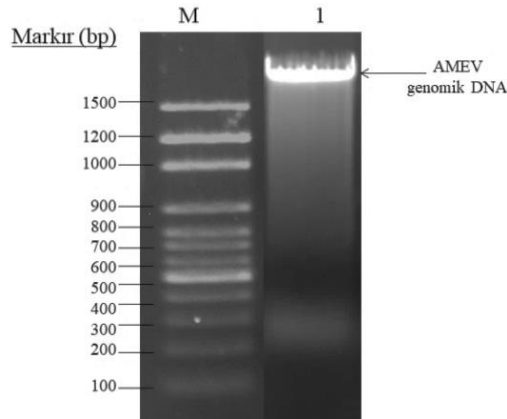
3.1. Virüslerin LD652 Hücrelerinde Çoğaltılması ve Miktarlarının Tayini

Tez çalışması boyunca kullanılacak yaban tip (AMEV), kontrol (*AmΔsph/gfp*) ve rekombinant (*AmΔ063/gfp*) virüslerin eldesi için, AMEV virüsünün enfekte ettiği bilinen LD652 hücre hattı kullanıldı. Dr. Basil Arif (Kanada) sayesinde temin edilen AMEV virüsün miktarı, $7,76 \times 10^8$ pfu/ml olarak belirtildi.

3.2. AMV063 Proteinin Prokaryotik Sistemde İfadesi

3.2.1. Enfekte Hücrelerden Genomik DNA İzolasyonu

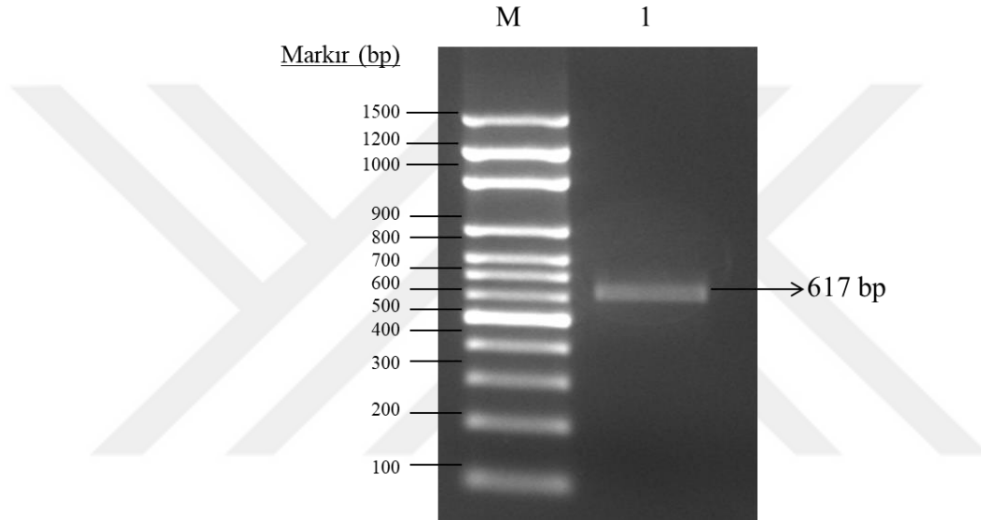
AMEV virüsü ile enfekte edilen LD652 hücreleri enfeksiyon sonrası santrifüj edildi. Süpernatant yeni enfeksiyonlar için saklanırken, pellet deneylerde kullanılacak genomik DNA'nın izolasyonu için kullanıldı. Qiagen kit önerisine göre yapılan genomik DNA izolasyonu sonrasında, DNA konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçüldü ve %0,7'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 10).



Şekil 10. AMEV genomik DNA izolasyonunun agaroz jeldeki görüntüsü. M, 100 bp'lik markır (Biobasics), 1: AMEV genomik DNA'sının 5 µl'sinin görüntüsü.

3.2.2. AMV063 Dizisinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması

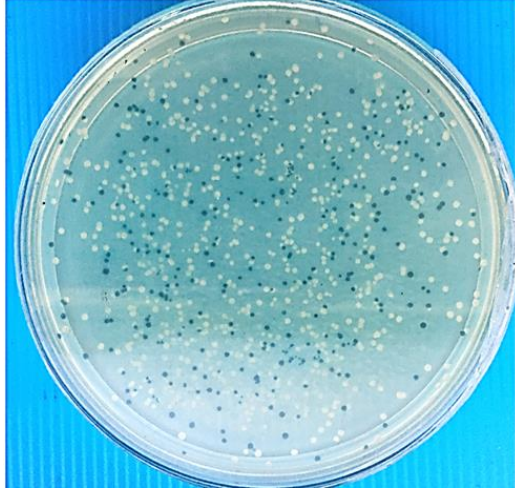
AMV063 dizisi, izole edilen genomik DNA'dan iTaq DNA polimeraz kullanılarak Applied Biosystem PCR cihazı ile çoğaltıldı. PCR ürünü, %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve UV transimülatör ile görüntülendi (Şekil 11). Jel üzerinde 617 bp'lik tek bandın varlığı, PCR reaksiyonunun başarısını gösterdi.



Şekil 11. AMV063 dizisinin PCR yöntemi ile oğaltılması. M: 100 bp'lik markır (Biobasics), 1: AMV063FW ve AMV063RV primerleri ile çoğaltılan AMV063 dizisi.

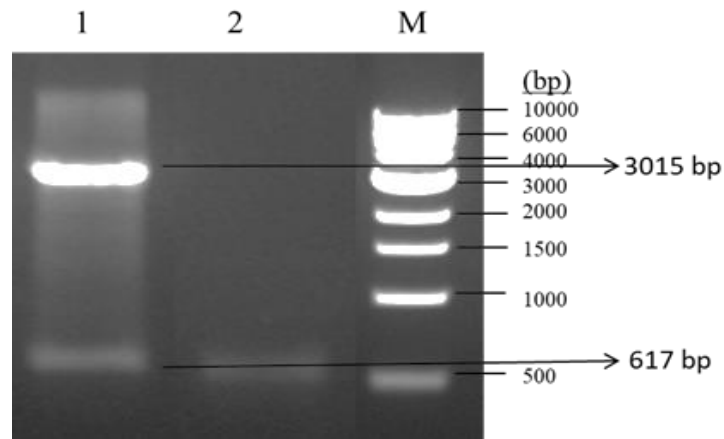
3.2.3. AMV063 Dizisinin Klonlama Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu

PCR reaksiyonu sırasında, çoğaltılan DNA dizilerinin 3' ucuna A nükleotidleri eklendiği için sarkık hale gelen AMV063 DNA dizisinin, 3' ucunda T nükleotidleri içeren pGEM-T Easy vektörü ile ligasyonu kolayca sağlandı. Transformasyon için CaCl_2 metodu ve *Escherichia coli* JM101 kompetent hücreleri kullanıldı. Transformasyon sonrası AMV063 DNA dizisi, vektörde *lacZ* bölgesinin arasına girdiği için, AMV063 DNA dizisini içeren transformantlar beyaz koloni oluşturdu (Şekil 12).



Şekil 12. pGEM-T Easy Vektörüne klonlanan AMV063 DNA'sının transformasyonu. Geni taşımayan vektör, mavi kolonileri ve AMV063 DNA'sını taşıyan vektör, beyaz kolonileri oluşturur.

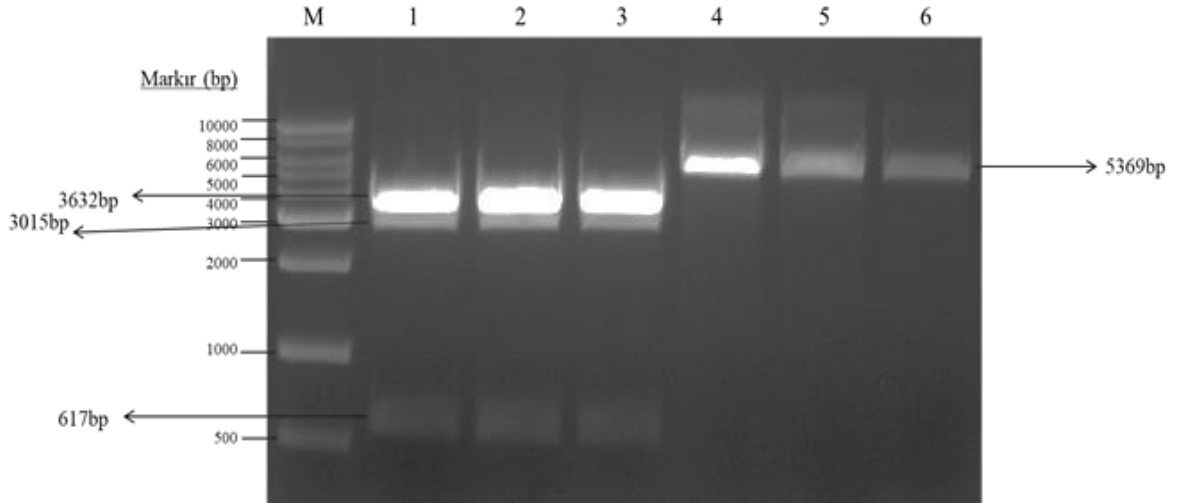
Doğru transformantlar seçildi, plazmid DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi ve AMV063 DNA dizisinin varlığı agaroz jel elektroforezinde beklenen 617 bp'lik bandın mevcudiyeti sayesinde doğrulandı (Şekil 13). Ayrıca, kontrol olarak kullanılan AMV063 DNA'sının PCR ürünü ile restriksiyon kesimi sonucu oluşan bandın aynı hizada olması da doğrulayıcı niteliktedir. Jel üzerinde görüntülenen 3015 bp'lik ağır bant, vektöre aittir.



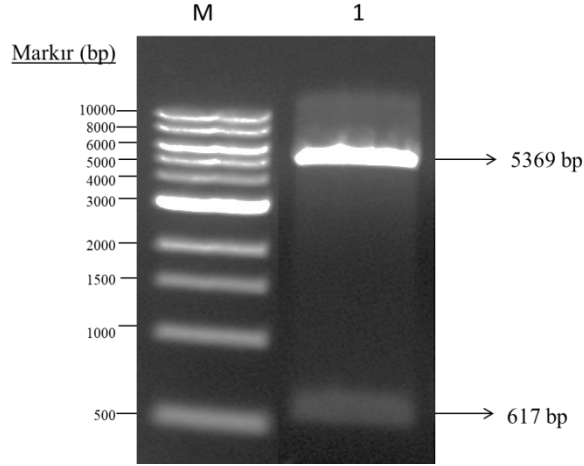
Şekil 13. pGEM-T Easy Vektörüne klonlanan AMV063 DNA dizisinin restriksiyon analizi. 1: *EcoRI* enzimi ile kesim sonrasında üstteki bant pGEM-T vektörü (3015 bp) ve alttaki bant AMV063 DNA'sı, 2: AMV063 DNA'sının PCR ürünü, kontrol olarak kullanıldı, M1: 1000 bp markır (Promega).

3.2.4. Klonlama Vektöründeki AMV063 Dizisinin İfade Vektörüne Klonlanması ve Transformasyonu

pGEM-AMV063 vektörü içerdiği doğrulanan ve boş pET-28 vektörü içeren kolonilerden, ayrı ayrı kit ile plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmid DNA'lar *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile çift kesime tabi tutuldu. Reaksiyon süresinin sonunda DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 14). Jelden kesilip temizlenen AMV063 DNA dizisinin pET-28 vektörüne ligasyonu, ürünün *E. coli* DH10 β kompetent hücrelerine transformasyonu ve kanamisin antibiyotiğine göre seçilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidler, *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon enzimleri ile çift kesime tabi tutuldu ve agaroz jel elektroforezi ile AMV063 DNA dizisinin pET28 vektörü içindeki varlığı teyit edildi (Şekil 15). AMV063 DNA dizisinin varlığı agaroz jel elektroforezinde beklenen 617 bp'lik bandın mevcudiyeti sayesinde doğrulandı. Jel üzerinde görüntülenen 5369 bp'lik ağır bant, pET28 vektöre aittir. Elde edilen vektör pET28-AMV063 olarak isimlendirildi.



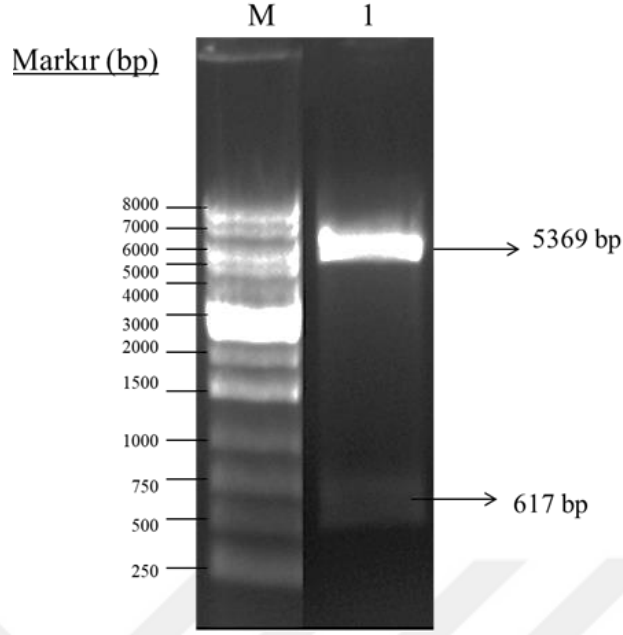
Şekil 14. pGEM-AMV063 ve pET-28 vektörünün *Bam*HI ve *Xho*I enzimleri ile kesimi. M: 1 kb markır (Promega), 1-2-3: Kesilmiş pGEM-AMV063 vektör. Üstteki bant, kesilmeden kalan pGEM-AMV063 (3632 bp), ortadaki bant pGEM-T (3015 bp) ve alttaki bant AMV063 DNA'sı (617 bp), 4-5-6: Kesilmiş pET-28 vektör (5369 bp).



Şekil 15. pET-28 vektörüne klonlanan AMV063 DNA'sının restriksiyon analizi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Kesilmiş pET-28-AMV063 vektörü. Kesim ile oluşan üst bant, pET-28 vektöre (5369 bp) ve alt bant, AMV063 DNA'sına (617 bp) aittir.

3.2.5. Hazırlanan İfade Vektörünün *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu ve Proteinin İfadesi

pET-28-AMV063 vektörün *E. coli* DH10 β kompetent hücrelerine transformasyonu doğrulandıktan sonra, bu kolonilerden gece kültürü hazırlandı. Taze kültürlerden kit ile pET-28-AMV063 plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmid DNA'lar, proteinin ifadesi için CaCl₂ yöntemi ile kompetent yapılan *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerine transform edildi. Kanamisinli ortamda büyüyen kolonilerden, plazmid izolasyonu yapıldı ve plazmidler *Xho*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilerek pET-28-AMV063 vektörün *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerindeki varlığı, Şekil 16'deki gibi agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı.



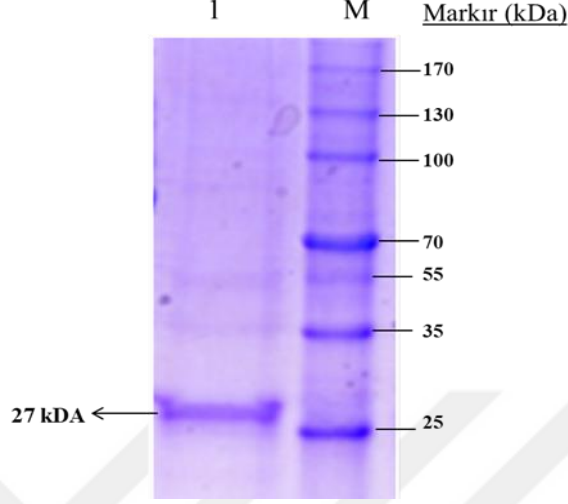
Şekil 16. *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerindeki pET-28-AMV063 vektörünün varlığının restriksiyon analizi ile doğrulanması. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Kesilmiş pET-28-AMV063 vektörü. Kesim ile oluşan üst bant, pET-28 vektöre (5369 bp) ve alt bant, AMV063 DNA'sına (617 bp) aittir.

AMV063 proteininin *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ifadesi için, pET-28-AMV063 vektörü ve boş pET-28a vektörü içeren *E. coli* BL-21 (DE3) hücreleri kullanıldı. Gece boyu büyütülen bakteri kültürleri, AMV063 proteininin üretimi için teşvik edildi. Çalışmanın sonunda bakteriyel pellet elde edildi.

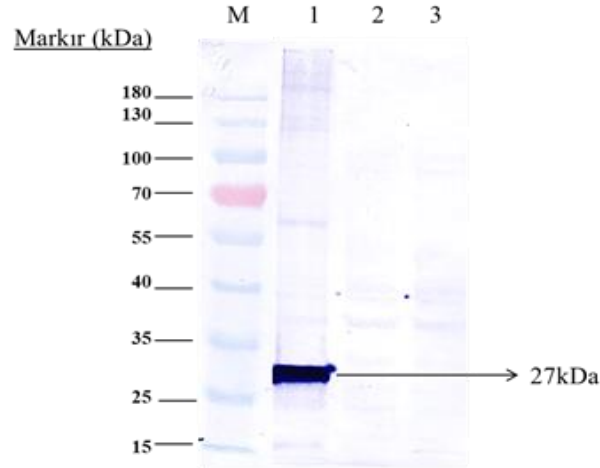
3.2.6. AMV063 Proteininin Saflaştırılması ve Western-Blot analizi

AMV063 proteini, pET-28 vektörde bulunan diziler sayesinde, 6 ilave histidin aminoasidiyle birlikte ifade edildi. Böylece, AMV063 proteini His kuyruk sayesinde “MagneHis Protein Purification System” kiti ile izole edildi. Proteinin temizlenmesi için yapılan diyaliz işleminden sonra, AMV063 proteini SDS-PAGE’de yürütüldü. Saflaştırılan protein CBB boyası ile boyanarak görüntülendi (Şekil 17). Western-Blot analizi için saf AMV063 proteini SDS-PAGE’de yürütüldü, membrana aktarıldı, birincil ve ikincil antikolarla muamele edildi ve renklendirilip görüntülendi. Buna göre, Western-Blot

analizi sonucunda PVDF membran üzerinde His kuyruğa (3,2 kDa) bağlı AMV063 proteini (22,8 kDa) görüntülendi (Şekil 18).



Şekil 17. AMV063 proteininin CBB boyası ile boyanarak görüntülenmesi. 1: His kuyruğu ile saflaştırılan AMV063 proteinleri, M: Markır (Fermantas, PAGE ruler).

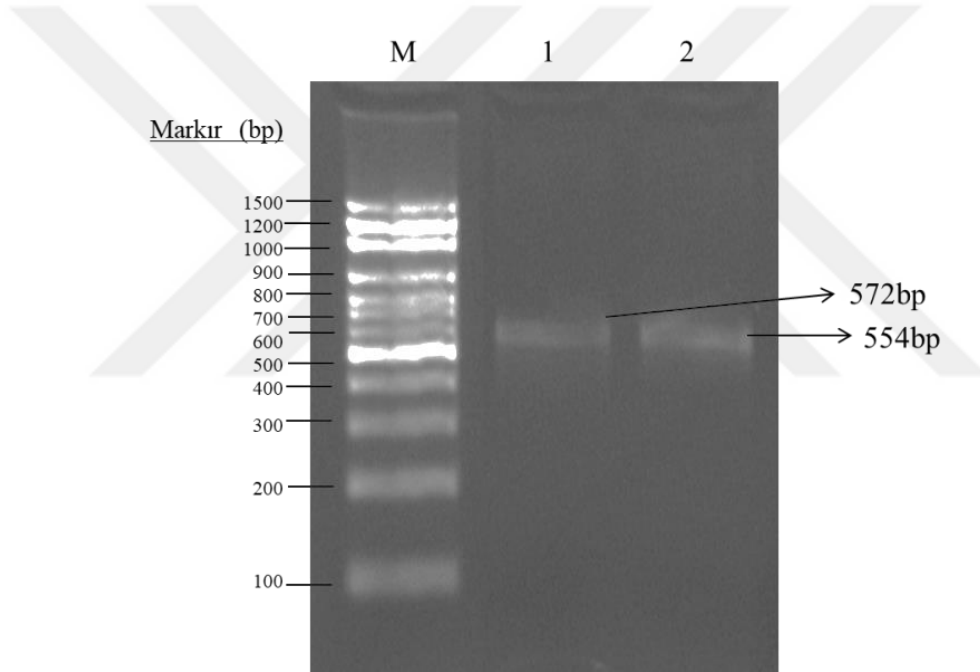


Şekil 18. AMV063 proteininin Western-Blot analizi. M: markır (PAGE ruler), 1: pET-28-AMV063 içeren *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ifade edilen AMV063 protein bandı, 2: Negatif kontrol. Boş pET-28 vektörü içeren *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ifade edilen proteinler, 3: Negatif kontrol. Vektör içermeyen *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ifade edilen proteinler.

3.3. Muhtemel Kaspaz Geni (AMV063) Silinmiş Rekombinant Virüsün Oluşturulması

3.3.1. AMV063 Yukarı ve Aşağı Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması

AMV063 DNA'sının askı bölgelerini oluşturan yukarı ve aşağı DNA dizileri, iTaq DNA polimeraz ile Applied Biosystem PCR cihazı kullanılarak çoğaltıldı. PCR ürünleri %1,2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 19).

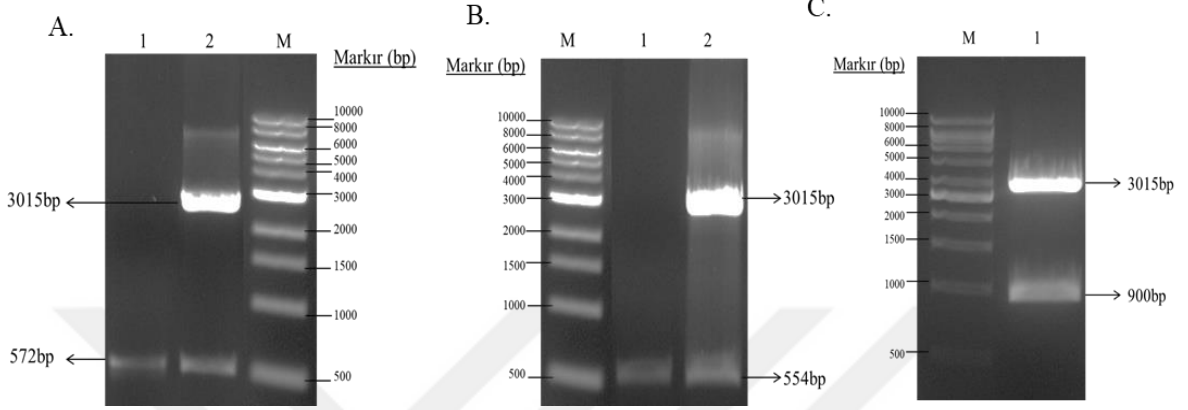


Şekil 19. AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin PCR ile çoğaltılması. M: 100 bp markır (Biobasics), 1: AMV063 yukarı dizisi (572 bp), 2: AMV063 aşağı dizisi (554 bp).

3.3.2. AMV063 Yukarı ve Aşağı Dizilerinin Klonlanması

PCR ile çoğaltılan AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin, T4 ligaz enzimi ile pGEM-T Easy vektörüne ayrı ayrı ligasyonu sağlandı. Ligasyon ürünleri, ayrı ayrı kompetent hücrelere transform edildi. Klonlanan AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin ve daha önce

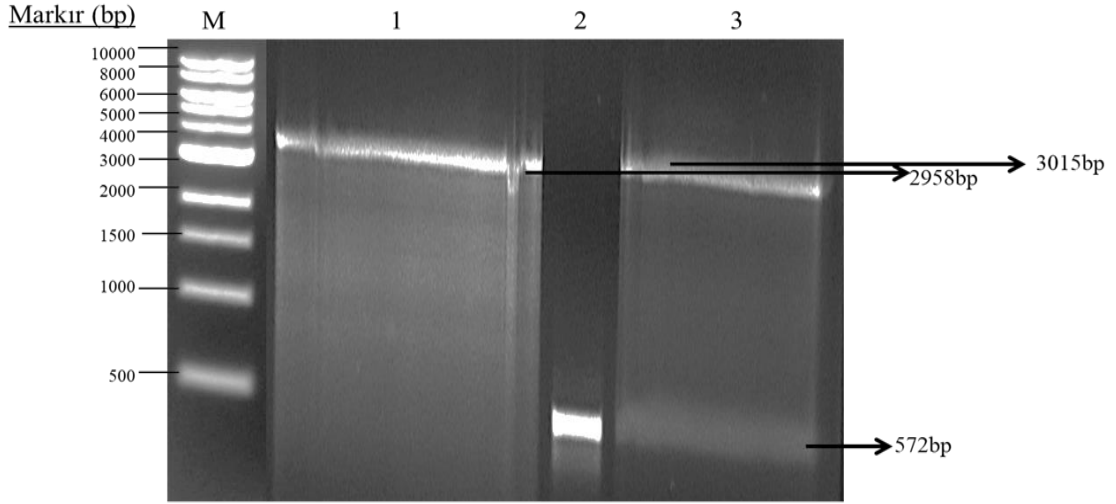
klonlandığı bilinen *gfp* DNA dizisinin pGEM-T Easy vektördeki varlığı, plazmidler izole edilip dizilerine özel restriksiyon enzimleriyle kesilerek agaroz jel elektroforezinde doğrulandı (Şekil 20).



Şekil 20. pGEM-T vektöründeki AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin ve *gfp* DNA dizisinin restriksiyon enzimleriyle kesimi. A. pGEM-T vektörüne klonlanan AMV063 yukarı dizisinin restriksiyon analizi, 1: Pozitif kontrol, AMV063 yukarı dizisinin PCR ürünü (572 bp), 2: Üst bant pGEM-T vektörü (3015 bp) ve alt bant AMV063 yukarı dizisi (572 bp), M: 1 kb markır (Biolabs). B. pGEM-T vektörüne klonlanan AMV063 aşağı dizisinin restriksiyon analizi, 1: Pozitif kontrol, AMV063 aşağı dizisinin PCR ürünü (554 bp), 2: Üst bant pGEM-T vektörü (3015 bp) ve alt bant AMV063 aşağı dizisi (554 bp), M: 1 kb markır (Biolabs). C. pGEM-T vektörüne klonlanan *gfp* dizisinin restriksiyon analizi, M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Üst bant pGEM-T vektörü (3015 bp) ve alt bant *gfp* dizisi (900 bp).

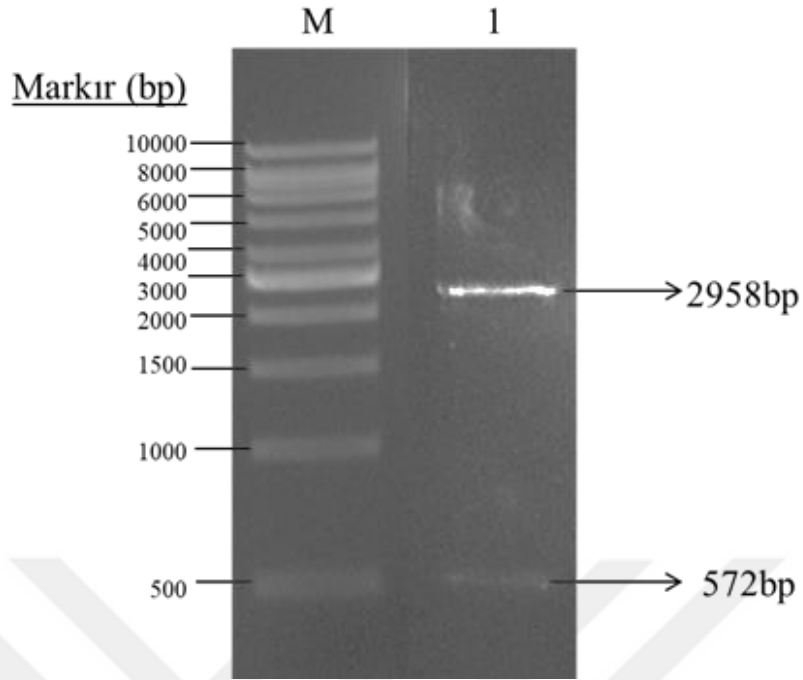
3.3.3. *gfp* İşaret Dizisini İçeren Transfer Vektörünün Oluşturulması

AMV063 yukarı ve aşağı dizilerinin ve *gfp* DNA dizisinin pGEM-T vektörlerinde oldukları doğrulandıktan sonra, bu plazmidler (pGEM-AMV063up, pGEM-AMV063down ve pGEM-*gfp*) kit ile izole edildi. Önce pGEM-AMV063up ve pBluescript SK(-) vektörleri *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesilen DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi (Şekil 21).



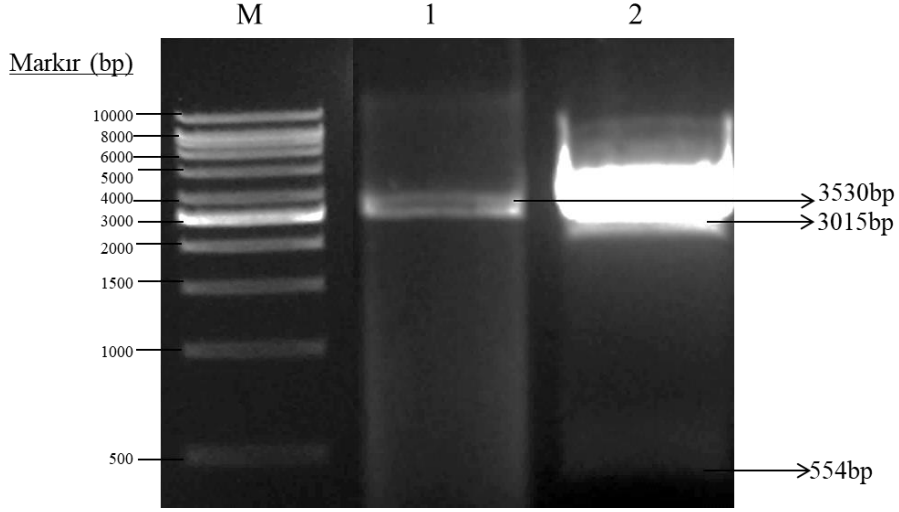
Şekil 21. pGEM-AMV063up ve pBluescript SK(-) vektörünün *Bam*HI ve *Xba*I enzimleri ile restriksiyon kesimi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: pBluescript SK(-) vektörü (2958 bp), 2: Pozitif kontrol, AMV063 yukarı dizisinin PCR ürünü, 3: Üst bant pGEM-T vektörü (3015 bp) ve alt bant AMV063up DNA dizisi (572 bp).

Klonlama için gereken sarkık uçlu DNA'lar, jelden geri kazanılarak ligasyon reaksiyonuna tabi tutuldu. Ligasyon ürünü, *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edildi, oluşan mavi beyaz kolonilerden beyaz olanlar ampisilin direncine göre seçildi. Seçilen kolonilerde AMV063 ORF'sinin yukarı dizisini içeren pBluescript SK(-) vektörün varlığı restriksiyon analizi ile doğrulandı (Şekil 22). Elde edilen pBS-AMV063up vektör, AMV063'ün aşağı dizisinin ve *gfp* dizisinin eklenmesi için kullanıldı.

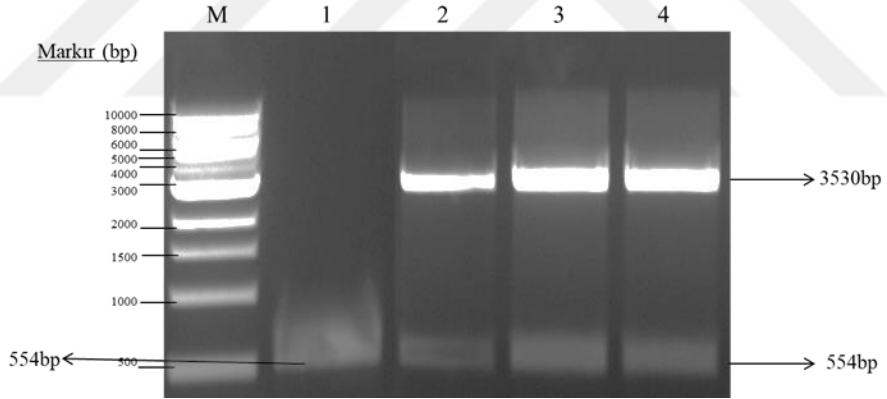


Şekil 22. pBluescript SK(-) vektörüne klonlanan AMV063 yukarı dizisinin restriksiyon kesimi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Üst bant pBluescript SK(-) vektörü (2958 bp) ve alt bant AMV063 yukarı dizisi (572 bp).

Daha sonra, pBS-AMV063up vektör ve pGEM-AMV063down vektör, *KpnI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleyle kesildi. Böylece, AMV063 aşağı dizisi, AMV063 yukarı dizisinin (Şekil 23) yanına klonlandı (Şekil 24). Elde edilen pBS-AMV063updown vektör, *gfp* dizisinin eklenmesi için kullanıldı.

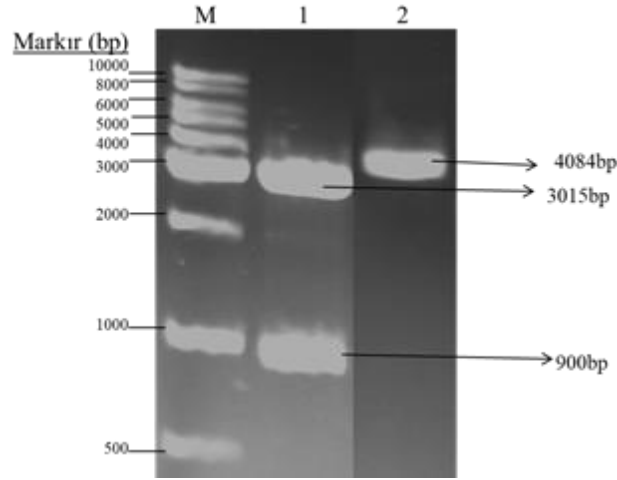


Şekil 23. pBS-AMV063up ve pGEM-AMV063down vektörünün *KpnI* ve *HindIII* enzimleri ile restriksiyon kesimi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: pBS-AMV063up vektörü (3530 bp), 2: Üst bant pGEM-T vektörü (3015 bp) ve alt bant AMV063 aşağı dizisi (572 bp).

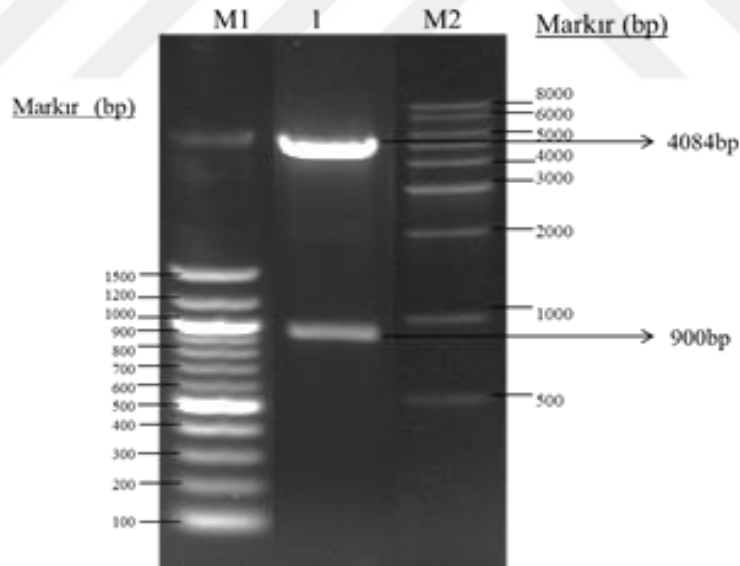


Şekil 24. pBS-AMV063up vektörüne klonlanan AMV063 aşağı dizisinin restriksiyon kesimi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Pozitif kontrol. AMV063 aşağı dizisinin PCR ürünü, 2-3-4: Üst bant pBS-AMV063up vektörü (3530 bp) ve alt bant AMV063 aşağı dizisi (554 bp).

Son olarak, pBS-AMV063updown ve pGEM-*gfp* vektörler *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi ve *gfp* dizisi, AMV063 DNA'sını yukarı ve aşağı bölgelerinin arasına klonlandı. (Şekil 25). pBS-AmΔ063/*gfp* olarak adlandırılan yeni vektörde, *gfp* dizisinin pBluescript SK(-) vektöründeki varlığı, *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesilerek doğrulandı (Şekil 26).



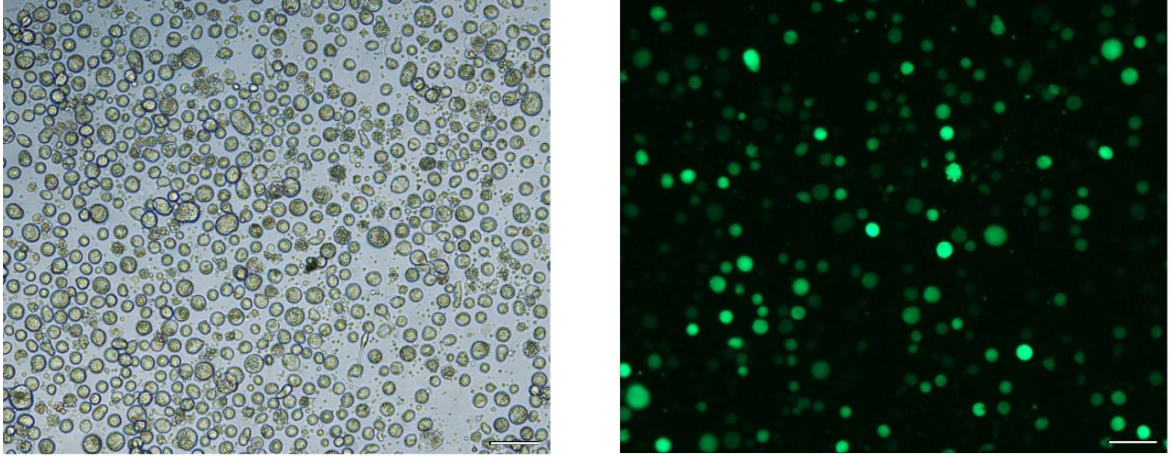
Şekil 25. pBS-AMV063updown ve pGEM-*gfp* vektörün *EcoRI* enzimi ile restriksiyon kesimi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Üst bant pGEM-T (3015 bp) ve alt bant *gfp* dizisi (900 bp), 2: pBS-AMV063updown vektör (4084 bp).



Şekil 26. pBS-AMV063updown vektörüne klonlanan *gfp* dizisini restriksiyon kesimi. M1: 100 bp markır (Biolabs), 1: Üst bant pBS-AMV063updown vektörü (4084 bp) ve alt bant *gfp* dizisi (900 bp).

3.3.4. Transfer Vektörün LD652 Hücrelerine Transfeksiyonu

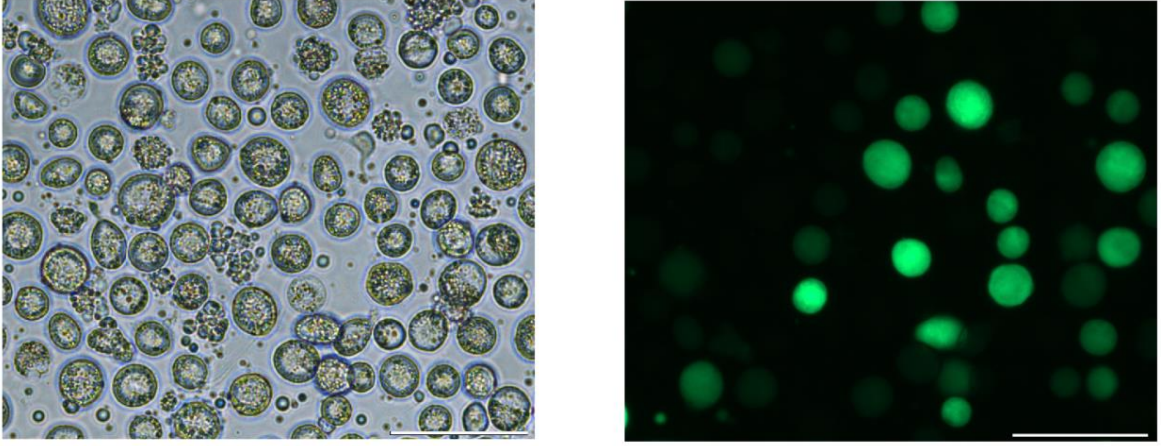
Homolog rekombinasyon ile AMEV genomundan AMV063 ORF'sini silmek için; LD652 hücrelerine yaban tip AMEV ile enfeksiyon ve pBS-Am Δ 063/*gfp* transfer vektörü ile transfeksiyon yapıldı. Uygun inkübasyon süresinin ardından, AMV063 ORF'nin silindiği ve yerine *gfp* geninin girdiği, inverted floresan mikroskop sayesinde, GFP proteininin yeşil floresan ışımlarının tespit edilmesiyle belirlendi (Şekil 27). Yeterli floresan ışımaya görüldüğünde, hücreler santrifüjlenip transfeksiyon sıvısı, oluşan rekombinant Am Δ 063/*gfp* virüsün çoğaltılması ve AMEV virüsten ayrılarak saflaştırılması çalışmaları için 4 °C'de saklandı.



Şekil 27. Am Δ 063/*gfp* virüs ile enfekte edilmiş LD652 hücrelerinin mikroskop görüntüleri. Solda AMEV enfeksiyonundan sonra, LD652 hücrelerindeki granül oluşumunun 100X büyütme gücündeki ışık mikroskobu görüntüsü ve sağda LD652 hücrelerinin GFP ışımaya görüntüsüdür. Ölçek aralığı 10 mikrometredir.

3.3.5. Rekombinant AMEV Virüsünün (Am Δ 063/*gfp*) Saflaştırılması ve Virüs Miktarının Belirlenmesi

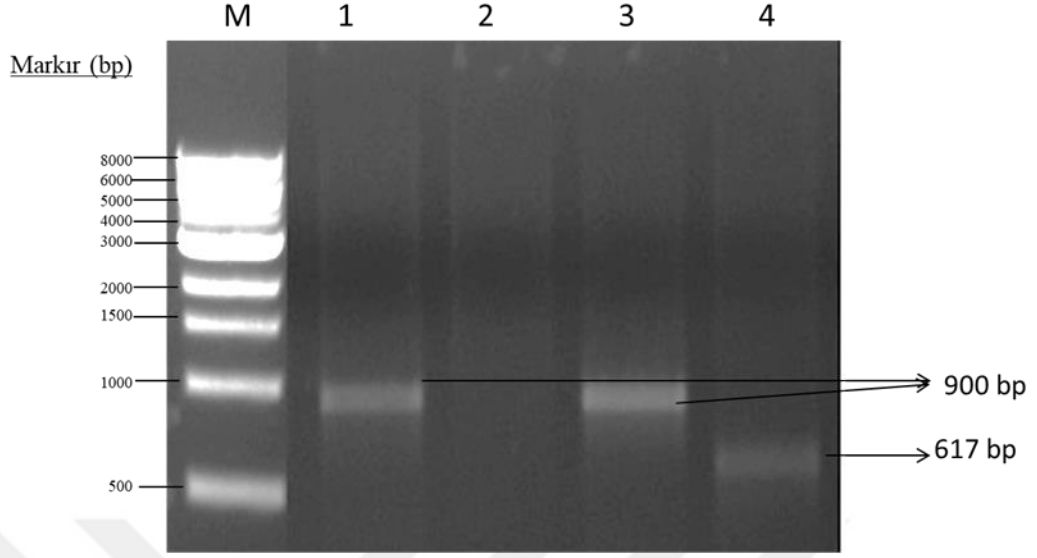
Homolog rekombinasyon ve pBS-Am Δ 063/*gfp* transfer vektörü sayesinde, rekombinant AMEV virüs (Am Δ 063/*gfp*) oluşturuldu (Şekil 28).



Şekil 28. Rekombinant AMEV ile enfekte edilen LD652 hücrelerinin mikroskop görüntüleri. Solda AmΔ063/*gfp* ile enfekte edilmiş LD652 hücrelerinin 200X büyütme gücünde ışık mikroskobu, solda GFP ışıma görüntüsü verilmiştir. Ölçek aralığı 10 mikrometredir.

Hem yaban tip AMEV hem de rekombinant AmΔ063/*gfp* virüs içeren transfeksiyon karışımı, ardışık 4 plak deneyi için kullanıldı. Rekombinant virüsün saflığını kontrol etmek için, AMV063 ORF'si ve *gfp* dizisine özgü primerler kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucunda beklendiği gibi, AMEV DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı reaksiyonda yalnız AMV063 ORF'sine ait bant ve AmΔ063/*gfp* virüs DNA'sının kullanıldığı reaksiyonda yalnızca *gfp* dizisine ait bant belirlendi (Şekil 29).

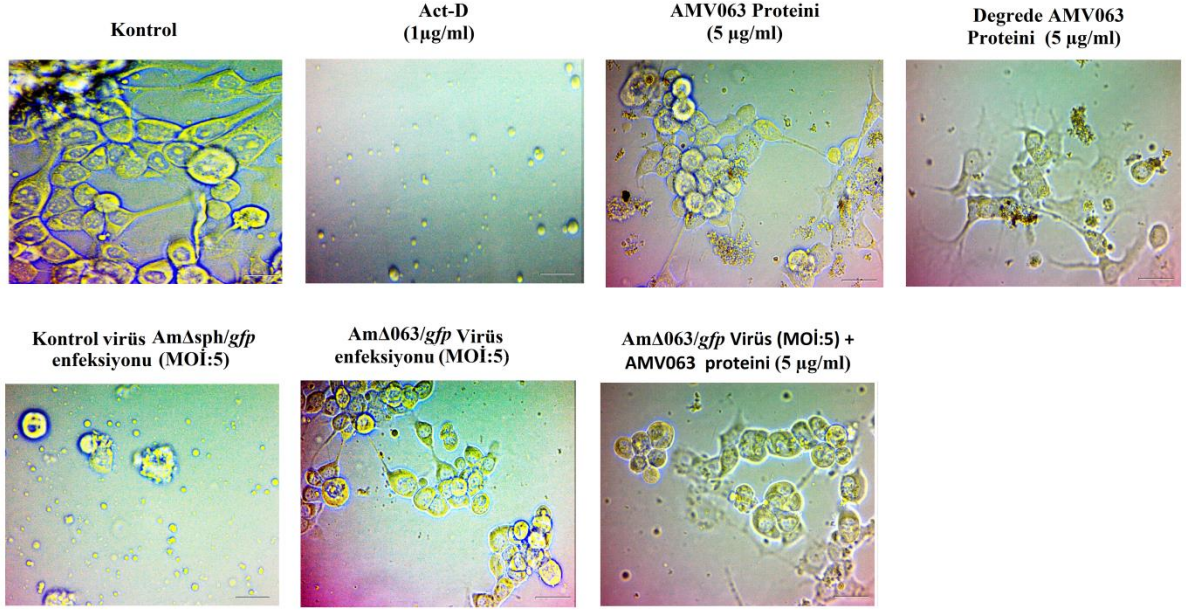
Ancak, rekombinant virüsün saflığının garantilenmesi amacıyla yapılan 5. plak işleminden sonra, floresan mikroskop altında hiçbir floresan ışıma görülmedi. Bu durumda, rekombinant AmΔ063/*gfp* virüsün hayatta kalabilmesi için birkaç tane de olsa ortamda AMEV virüse ihtiyaç olduğu ve silinen AMV063 ORF'sinin virüs için elzem olduğu sonucuna varıldı. Bu durumda, 4. plak deneyinden sonra AMV063 dizisinin tespit edilememesi, ortamda AMV063 kalıbının yok denecek kadar az olması ile ilişkilendirildi (Şekil 29). Bu yüzden, en saf rekombinant AmΔ063/*gfp* virüs stokunu içeren ve 4. plak işlemi sonrası çoğaltılan virüs solüsyonu, çalışmanın devamında kullanıldı. Bu rekombinant virüs stokunun yoğunluğu EPDA yöntemi ile hesaplandı. EPDA formülüne göre, AmΔ063/*gfp*'nin virüs yoğunluğu $3,32 \times 10^7$ pfu/ml olarak belirlendi. Aynı çalışma kapsamında, kontrol virüs AmΔsph/*gfp*'nin miktarı da $5,88 \times 10^6$ pfu/ml olarak tespit edildi. Elde edilen virüs süspansiyonları sonraki deneylerde kullanıldı.



Şekil 29. Plak deneyi sonucunda saflaşan rekombinant AmΔ063/*gfp* virüsün PCR analizi. M: 1 kb markır (Biolabs), 1: Virüsün 4. plağından izole edilen DNA'dan çoğaltılan *gfp* dizisinin bandı, 2: Virüsün 4. plağından izole edilen DNA'dan çoğaltılan AMV063 dizisinin bandı, 3: Virüsün 3. plağından izole edilen DNA'dan çoğaltılan *gfp* dizisinin bandı, 4: Virüsün 3. plağından izole edilen DNA'dan çoğaltılan AMV063 dizisinin bandı.

3.4. AMV063 Proteininin Kaspaz-2 Aktivitesi

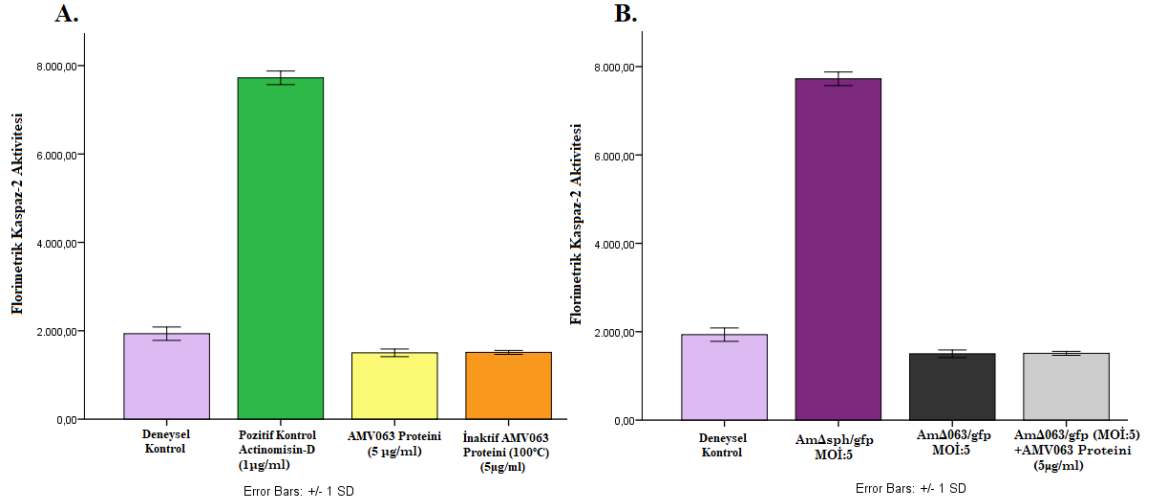
AMV063 proteini farklı virüs ve CF-70-B2 hücre karışımlarına verilerek (Şekil 9), 48. saatte, hücrelerin sitopatik etki görüntüleri, ışık mikroskobu kullanılarak 200X büyütme gücüyle görüntülendi ve kaydedildi (Şekil 30).



Şekil 30. Muamelerden sonra, CF-70-B2 hücrelerinin görünümü. AMV063 proteini hücrelere verildikten 48 saat sonra meydana gelen sitopatik etkiler, ışık mikroskopuyla 200X büyütme gücüyle görüntülendi. Ölçek aralığı 10 mikrometredir.

AMV063 ORF'si ürünü proteinin kaspaz-2 aktivitesi için 48. saatte test edildi. Bunun için, "Caspase-2 Fluorometric Assay" Kit kullanılarak ortamdaki kaspaz-2'ye ait floresan substratın miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi ve kontrollerle kıyaslandı (Şekil 31).

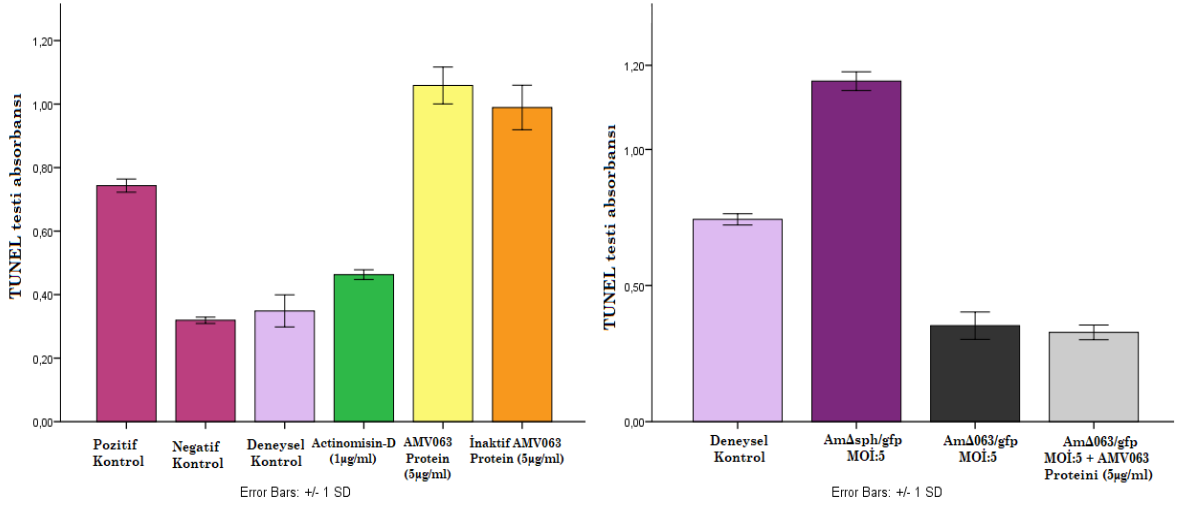
Kaspaz deneyi sonucunda elde edilen AMV063 proteini (5 µg/ml) ve bozunmuş AMV063 proteini (5 µg/ml) ile muamele sonuçları, SPSS veri analizi kullanılarak kontrollerle ve birbiriyle istatistiksel olarak kıyaslandı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi. AmΔ063/gfp virüs (MOI:5) ve AmΔ063/gfp virüs (MOI:5)+ AMV063 proteini (5 µg/ml) ile muamele sonuçları da SPSS veri analizi kullanılarak kontrol AmΔ063/gfp virüsle (MOI:5) ve birbiriyle istatistiksel olarak kıyaslandı. Buna göre, AMV063 proteininin kaspaz aktivitesi tespit edilemedi. Diğer yandan, AMV063 ORF'si çıkarılan virüsün kaspaz aktivitesi, kontrole göre önemli miktarda azaldı.



Şekil 31. AMV063 Proteinini ve AmΔ063/*gfp* virüs ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinin kaspaz-2 aktivite grafikleri. A: CF-70-B2 hücrelerinin, AMV063 proteinini ve inaktif AMV063 proteinleri ile 48 saat muamelesinden sonra kaspaz-2 enzim aktivitelerini ve B: CF-70-B2 hücrelerinin, AmΔ063/*gfp* virüsü ve AmΔ063/*gfp* virüs+AMV063 protein karışımları ile 48 saat muamelesinden sonra kaspaz-2 enzim aktivitelerinin kontrol AmΔsph/*gfp* virüs ile karşılaştırılmasını göstermektedir.

3.5. AMV063 Proteininin Apoptotik Etkisinin TUNEL Testi ile Belirlenmesi

Genomik DNA’da kırıklar oluşumu apoptozisin son evresi olduğu için AmΔ063/*gfp* virüs ve AMV063 protein karışımları ile muamele edilen CF-70-B2 hücreleri (Şekil 9), apoptozis aktivitesinin belirlenmesi için 48. saatte TUNEL testine tabi tutuldu. Bunun için, “TiterTACS In Situ Detection” Kit kullanılarak TdT enziminin ortamdaki DNA kırıklarına bağlanmasına ait ışımının miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi ve kontrollerle kıyaslandı (Şekil 32).



Şekil 32. AMV063 Proteini ve AmΔ063/*gfp* virüs ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinin TUNEL aktivite grafikleri. A: CF-70-B2 hücrelerinin, AMV063 proteini ve inaktif AMV063 proteinleri ile 48 saat muamelesinden sonra TUNEL aktivitesinin ışına miktarlarını (absorbans) ve B: CF-70-B2 hücrelerinin, AmΔ063/*gfp* virüsü ve AmΔ063/*gfp* virüs+AMV063 protein karışımları ile 48 saat muamelesinden sonra kontrol AmΔsph/*gfp* virüs ile karşılaştırılmasının TUNEL ışına miktarlarını (absorbans) göstermektedir.

TUNEL sonucunda elde edilen AMV063 proteini (5 μ g/ml) ve bozunmuş AMV063 proteini (5 μ g/ml) ile muamele sonuçları, SPSS veri analizi kullanılarak kontrollerle ve birbiriyle istatistiksel olarak kıyaslandı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi. AmΔ063/*gfp* virüs (MOI:5) ve AmΔ063/*gfp* virüs (MOI:5)+ AMV063 proteini (5 μ g/ml) ile muamele sonuçları da SPSS veri analizi kullanılarak kontrol AmΔ063/*gfp* virüsle (MOI:5) ve birbiriyle istatistiksel olarak kıyaslandı. Buna göre, AMV063 proteininin TUNEL aktivitesi tespit edilemedi. Diğer yandan, AMV063 ORF'si çıkarılan virüsün TUNEL aktivitesi, kontrole göre önemli miktarda azaldı.

4. TARTIŞMA

Poksvirüsler, yalnızca konakçı hücrenin sitoplazmasında çoğalabilen, doğrusal çift zincirli DNA (dsDNA) virüsleridir. Bu karmaşık yapılı DNA virüsleri, çok sayıda virüs proteinlerini kodlayan yaklaşık 130-375 kbp büyüklükte genoma sahiptir (Moss, 2013). Poksvirüslerin yaşam döngüsü de oldukça karmaşıktır (Witte, 1982). Bir virüs konakçı hücreye girdikten sonra; erken, ara ve geç genlerin geçici olarak transkript edildiği şelaleyi başlatır (Yang vd., 2011). Erken genlerin transkripsiyonu; erken promotor aktivasyonuna bağlı olan erken transkripsiyon faktörleriyle nükleokapsitte meydana gelir ve erken mesajcı RNA'lar olarak porlardan sitoplazmaya gönderilir (Moss, 2013). Poksvirüs alt grubu olan AMEV'de de; erken, ara ve geç genlerin farklı sürelerle transkript edildiği bir süreç mevcuttur. AMEV'e ait 63. ORF'nin geç gen olabileceği daha önce ortaya atılmıştır (Bawden vd., 2000).

Çoğu poksvirüs konakçı hücrenin bağışıklığından kaçma fonksiyonlarına sahip proteinleri kodlar (Shisler, 2015; Smith vd., 2013). Enfeksiyon sırasında ifade edilen bu bağışıklık kaçınma proteinlerinin birçoğu (IAP proteinleri), hücrel apoptotik yolları inhibe eder (Vandergaast vd., 2015). Apoptozis inhibitör proteinleri (IAP), ilk önce bakulovirüslerde tanımlanmış ayrı bir kaspaz inhibitörleri ailesidir (Hughes, 2002). Konakçı hücrenin savunma mekanizmasına karşı, poksvirüs ailesine ait Vaksinya virüsün SPI-1 ve SPI-2 (Shisler vd., 1999), Miksoma virüsünün SERP1 (Macen vd., 1993) ve SERP2 (Messud-Petit vd., 1998), Molluscum Contagiosum virüsünün MC163 ve MC066 (Coutu vd., 2017), Shope Fibroma virüsünün ise S131 (Cao vd., 2002) ve T2 (Schreiber ve McFadden, 1994) proteinlerinin apoptozisi inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Ayrıca MsEPV'nin MSV248 ve MSV242 proteinlerinin (Afonso vd., 1999), AcMNPV'nin P35 (Stennicke vd., 2002) ve AMEV'in AMV021 proteininin apoptozis inhibitör proteinleri olabileceği (Bawden vd., 2000) literatürde belirtilmiştir. Buna ek olarak bazı durumlarda, apoptozis viral patogeneze ile ilişkilendirilir (Hinshaw vd., 1994; Ren vd., 2005; Thoulouze vd., 1997). Bunun sebebi, konak savunmasından ziyade virüsün enfeksiyondan sonra çoğalabilmesi için konak hücreden çıkışını kolaylaştırmaktır (Perera vd., 2013). Bu durumlarda, apoptozis enfeksiyonun geç evrelerinde görülür ve geç genlerin ürünleri ile kontrol edilir (Haller vd., 2014). AMEV'in 63. ORF'sinin geç gen

olması (Bawden vd., 2000) ve protein kinazlar ile etkileşmesi (Danismazoglu vd., 2018), AMV063 proteininin kaspaz-2 ve apoptozis aktivitesi olabileceğini desteklemektedir.

Fonksiyonel analiz çalışmalarında bir genin fonksiyonunun belirlenmesi ve virüs için elzem olup olmadığının anlaşılması için o genin genomdan silinmesi gerekir (W. Zhang vd., 2016). Silinme işlemi, bakteriyel plazmidler veya sentetik oligonükleotitler kullanılarak, homolog rekombinasyon ile *in vivo* olarak tasarlanabilir. Homolog rekombinasyon ile genetik mühendisliği çalışmaları, U2OS (Puget vd., 2005) ve RG37 (Dumay vd., 2006) hücreleri gibi birçok memeli hücrelerinde ve virüsler (King vd., 2007; Ozgen vd., 2014; Yousefi vd., 2012) üzerinde de çalışıldı. Daha önce *Chilo iridescent* virüsün 157L geni (Ozgen vd., 2014) ve AMEV'in protein kinaz geni olduğu düşünülen AMV197 ORF'si virüs genomundan homolog rekombinasyon ile silindi (Muratoglu vd., 2016). Bu çalışmada benzer teknikler kullanılarak AMV063 ORF'si virüs genomundan homolog rekombinasyon ile silindi. Plak deneyleri ilerledikçe rekombinant virüsün tespit edilememesi, AMV063 DNA dizisinin AMEV virüsü için elzem olduğunu gösterdi.

Fonksiyonu bilinmeyen bir proteinin hücresel görevini belirlemenin bir başka yolu ise bu proteini rekombinant olarak üretilip *in vitro* veya *in vivo* şartlarda etkisine bakmaktır. Virüslere ait gen ürünleri ile yapılan çalışmalarda üretilen rekombinant proteinler, ya hücre kültürüne muamele edildi (Means vd., 2007; Paul vd., 2007) ya da direk organizmaya (Cakici vd., 2015; Ozgen vd., 2014) yedirildi. Bu tez kapsamında saf olarak üretilen AMEV virüsüne ait rekombinant AMV063 proteini, virüsün enfekte ettiği böcek hücre kültürlerine direk olarak muamele edildi. Hücre kültürüne verilen protein konsantrasyonu daha önce böcek hücre kültürlerine verilen protein konsantrasyonlarına göre belirlendi (Chitnis vd., 2008; Paul vd., 2007).

Protein üretimi için doğru sistemi seçmek; konakçı hücrelerin büyüme hızına ve kültürüne, hedef genin ifade seviyesine ve sentezlenen proteinin, translasyon sonrası işlemesine bağlıdır. Hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekte yüksek miktarda protein üretimi için en yaygın kullanılan sistem, prokaryotik ifade sistemidir (Porowinska vd., 2013). Son yıllarda *Bacillus* türleri de prokaryotik ifade sistemi olarak kullanılmasına rağmen, bu sistem öncelikle *E. coli* bakterilerine dayanmaktadır (Baneyx, 1999; Jana ve Deb, 2005; Makrides, 1996; Stevens, 2000; Zerbs vd., 2014). Bu çalışmada, AMV063 proteininin fazla miktarda, hızlı ve ucuz ifadesi için *E. coli*'nin BL-21 (DE3) alt türü başarılı bir şekilde kullanıldı.

Ökaryotik protein ifade sistemlerinin aksine, prokaryotik ifade sistemlerinde proteinlerin dördüncü yapılarını oluşturan katlanma modifikasyonları yoktur. Proteinlerin aktivitelerini etkileyen translasyon sonrası modifikasyonlar; fosforilasyon, ubikuitinasyon, nitrosilasyon, glutatyonilasyon, SUMOlasyon ve asetilasyondur (Ribet ve Cossart, 2010). Kaspazların da enzimatik aktivitesini gösterebilmeleri için, fonksiyonel kimyasal grupların veya proteinlerin bağlanması gereklidir. Translasyon sonrası modifikasyonlar, kaspazların yapısını değiştirerek işlevlerini önemli ölçüde değiştirir ve hücre ölümünde çok önemlidir. Apoptotik yanıtın gücünü düzenleyen bu modifikasyonlardan fosforilasyon, başlatıcı ve efektör kaspazlarda farklı organizmalar arasında yüksek oranda korunmuştur (Nutt vd., 2005). Kaspaz-2'nin aktivasyonu ve enzimatik aktivitesi için, protein yapısında birkaç fosforilasyona ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir (Zamaraev vd., 2017). Kontrol virüs *AmΔsph/gfp* ile enfeksiyon sonrasında hücrelerde görülen kaspaz-2 aktivitesinin *E. coli* bakterisinde üretilen AMV063 proteini ile muamele sonrasında görülmemesinin nedeni, AMV063 proteininin prokaryotik ifade sisteminde ürettirildiği için fosforilasyonunun sağlanamaması ve bu yüzden aktifleşememesine bağlandı.

Yapılan araştırmalarda AMEV ile enfekte edilen CF-70-B2 hücrelerinin kaspaz aktivasyonu ve apoptozis özelliğinin LD652 hücrelerininkinden daha fazla olduğu gösterildi (Perera vd., 2013). Bu yüzden, tez kapsamında apoptozis ve kaspaz-2 aktivite deneyleri için apoptozise duyarlı CF-70-B2 hücreleri kullanıldı.

Bir kaspazın, saf bir protein olarak ya da hücrel bir karışımda izlenmesi, substrat parçalanması ölçülerek elde edilebilir. Birçok kaspaz için kromojenik veya florojenik substratlar mevcuttur. Bu substratlar, genellikle her kaspaz için tercih edilen dört aminoasit motifinden ve parçalandığında, spektrofotometrik veya florimetrik araçlar kullanılarak tespit edilebilen bir kromofor veya bir florofor üreten parçadan oluşur (McStay ve Green, 2014). Perera vd. tarafından yapılan araştırmada AMEV ile enfekte edilen LD652 ve CF-70-B2 hücrelerinin apoptozis özelliklerini belirlemek için kaspaz-3/7 testi kullandı (Perera vd., 2013). Bu tezde de muhtemel kaspaz-2 proteini olduğu düşünülen AMV063 ORF'si ürününün hücreler üzerindeki kaspaz aktivitesini belirlemek için kaspaz-2 florometrik test kullanıldı.

Kaspaz-2 proteini yapısal olarak CARD, p10 (küçük katalitik ünite) ve p20 (büyük katalitik ünite) domainlerine sahiptir (Lavrik vd., 2005). Interpro protein sınıflandırma arayüzü kullanılarak, AMV063 ORF'sinin aminoasit dizisi kaspaz-2'nin protein yapısı ile karşılaştırıldı. AMV063 ORF'sinin 286-423 arasındaki aminoasitlerin *Acinetobacter*

baumannii bakteri türüne ait kaspaz proteininin p10 katalitik ünitesi ile ve 116-237 arasındaki aminoasitlerin ise *Colletotrichum fiorinae* türüne ait kaspaz proteininin p20 katalitik ünitesi ile çakıştığı belirlendi (Fuentes-Prior ve Salvesen, 2004; URL-7). Bu analiz AMV063 ORF'sinin kaspaz olduğunu desteklemektedir.

Kaspaz-2 aktivite deneyinde, *AmΔsph/gfp* virüs ile muamele edilen hücrelerin kaspaz aktivitesi *AmΔ063/gfp* virüs ile muamele edilenlerle kıyaslandığında, *AmΔ063/gfp* virüsünün plak deneyleri ile saflaştırma aşamasında rekombinant virüsün %100 saf olarak elde edilememesine rağmen anlamlı oranda fazladır (Şekil 31).

SPSS analizine göre, AMV063 proteini (5 µg/ml) ve bozunmuş AMV063 proteini (5 µg/ml) ile muamele edilmiş hücrelerin kaspaz-2 ve TUNEL aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). Bu durum AMV063 proteininin aktif protein olarak işlev göremediğini gösterdi. Buna göre, AMV063 protein ile muamele edilen hücrelerde meydana gelen ölümler kaspaz-2 bağımlı değildir. Rekombinant *AmΔ063/gfp* virüsü ile muamele edilen hücrelerin kaspaz-2 ve TUNEL aktiviteleri, AMV063 dizisine sahip *AmΔsph/gfp* virüsü ile muamele edilene göre istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı derecede azdır. Bu sonuca göre, hücrelerde meydana gelen kaspaz-2 aktivitesi ve apoptotik ölümün, kontrol *AmΔsph/gfp* virüste mevcut olan AMV063 dizisinin kaspaz aktivitesinden kaynaklandığı kanıtlandı.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması ile AMEV'e ait AMV063 ORF'sinin, kaspaz-2 aktivitesi ve apoptotik özelliği belirlendi. Ayrıca, AMEV genomundan AMV063 DNA dizisi silindiği AmΔ063/*gfp* virüs ve kontrol virüsün kaspaz-2 aktivitesi ve apoptotik etkisi karşılaştırıldı.

1. Virüs yoğunlukları; yaban tip (AMEV) için $7,76 \times 10^8$ pfu/ml, kontrol virüs (AmΔsph/*gfp*) için $5,88 \times 10^6$ pfu/ml ve rekombinant virüs (AmΔ063/*gfp*) için $3,32 \times 10^7$ pfu/ml olarak belirlendi.
2. AMV063 proteininin prokaryotik sistemde ifadesi sağlandı.
 - a. AMV063 proteini, *E. coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ifade edildi ve konsantrasyonu 72 µg/ml olarak belirlendi.
 - b. AMV063 proteini His kuyruğu sayesinde saflaştırıldı ve diyaliz membran ile temizlendi. Proteinin saflığı, CBB boyama ile jel üzerinde ve Western blot membranı üzerindeki ~27 kDa'luk tek bant sayesinde doğrulandı.
3. AMV063 DNA'sının, AMEV genomundan homolog rekombinasyon ile silinmesi sağlandı ve rekombinant virüsün saflaştırılması için plak deneyi yapıldı.
 - a. Saflaştırma işleminin 4. plak deneyinden sonra, elde edilen AMEV ve AmΔ063/*gfp* virüs DNA'ları kullanılarak PCR yapıldı. Beklendiği gibi, AMEV DNA'sında AMV063 dizisinin varlığı ve *gfp* dizisinin yokluğu ve AmΔ063/*gfp* DNA'sında AMV063 dizisinin yokluğu ve *gfp* dizisinin varlığı gösterildi.
 - b. Saflaştırma için uygulanan plak deneylerinin 5.'sinde, GFP ışması yapabilen AmΔ063/*gfp* virüsün tespit edilememesi, AMV063 ORF'sinin virüs için elzem olduğunu ve AmΔ063/*gfp* virüsün çoğalabilmesi için, ortamda çok az bir miktarda da olsa yaban tip virüse ihtiyaç duyulduğunu gösterdi.
4. AMV063 proteini ve 100 °C'de kaynatılan AMV063 proteini ile muamele edilen CF-70-B2 hücrelerinde, kaspaz-2 ve TUNEL aktivitesi aynı olduğundan, saflaştırılan proteinin aktivitesi tespit edilemedi.
5. Oluşturulan rekombinant AmΔ063/*gfp* ve kontrol virüs, apoptozise duyarlı CF-70-B2 hücreleri ile muamele edildiğinde, beklediği gibi AMV063 DNA'sı silinen (AmΔ063/*gfp*) virüsün kaspaz-2 ve apoptozis etkisi kontrol tip virüse göre anlamlı oranda azaldı. Bu durum AMV063 proteinin doğal sisteminde üretildiğinde kaspaz-2 aktivitesi olduğunu kanıtlar niteliktedir.

6. ÖNERİLER

Bu tez kapsamında AMV063 ORF'sinin fonksiyonel analizine yönelik yapılan moleküler çalışmalara rağmen genin fonksiyonunun tam olarak belirlenebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Aydınlatılabilecek hususlar aşağıda verilmiştir:

1. Kaspaz-2'nin aktifleşmesi için hangi bölgelerden proteolitik olarak kesilmesi veya fosforillenmesi gerektiği bilgisi araştırılıp, AMV063 proteininde bu bölgeler belirlenebilir ve elde edilen bilgiler sonraki çalışmalarda kullanılabilir.
2. AMV063 proteininin Bakülovirüs gibi ökaryotik protein ifade sisteminde üretilerek doğru katlanması sağlanabilir ve proteinin aktivitesi test edilebilir.
3. Ökaryotik sistemde üretilerek saf olarak elde edilen AMV063 proteini, virüsün enfekte ettiği böceklerle yedirilebilir ve ağızdan alındığında AMV063 proteininin böcek hücreleri üzerindeki apoptozis etkisi araştırılabilir.
4. Kaspaz-2'nin kanser hücreleri üzerinde tümör baskılama özelliği olduğu kanıtlandığı için, AMV063 proteininin metastatik meme kanseri, karaciğer kanseri gibi yaygın kullanılan kanser hücre kültürleri üzerindeki etkisi belirlenebilir.
5. AMEV virüsünün apoptotik yolağı ve kaspaz aktivitesinde rol oynayabilecek başka genlerin fonksiyonu aydınlatılabilir. Bu kapsamda, apoptosiz inhibitör proteini olarak bilinen AMV021 ORF'si ve AMV063 ORF'si ürünü proteinlerin etkileşimi tespit edilebilir.
6. AMV063 dizisi silinen rekombinant virüs ve yaban tip karşılaştırılarak AMV063 dizisinin virüsün replikasyonundaki etkisi araştırılabilir.

7. KAYNAKÇA

- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. ve Carstens, E. B., 2014. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses, Arch Virol, 159,10, 2831-2841.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Oma, E., Kutish, G. F. ve Rock, D. L., 1999. The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus, J Virol, 73,1, 533-552.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F. ve Rock, D. L., 2000. The genome of fowlpox virus, J Virol, 74,8, 3815-3831.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. ve K., R., 2002. Chapter 5: DNA Replication, Repair, and Recombination, Molecular Biology of the Cell (4th ed.), New York: Garland Science. 845.
- Arif, B., 1984. The entomopoxviruses, Adv Virus Res, 29, 195-213.
- Arif, B., 1995. Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses, J Gen Virol, 76, 1-13.
- Arif, B. ve Pavlik, L., 2013. Insect cell culture: virus replication and applications in biotechnology, J Invertebr Pathol, 112 Suppl, S138-141.
- Arif B., K. E., 1991. Viruses of Invertebrates, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 179.
- Baneyx, F., 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, Curr Opin Biotechnol, 10,5, 411-421.
- Bawden, A. L., Glassberg, K. J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W. ve Moyer, R. W., 2000. Complete genomic sequence of the *Amsacta moorei* entomopoxvirus: analysis and comparison with other poxviruses, Virology, 274,1, 120-139.
- Becker, M. N., Greenleaf, W. B., Ostrov, D. A. ve Moyer, R. W., 2004. *Amsacta moorei* entomopoxvirus expresses an active superoxide dismutase, J Virol, 78,19, 10265-10275.
- Best, S. M. ve Bloom, M. E., 2004. Caspase activation during virus infection: more than just the kiss of death?, Virology, 320,2, 191-194.
- Bitzer, M., Armeanu, S., Prinz, F., Ungerechts, G., Wybranietz, W., Spiegel, M., Bernlohr, C., Cecconi, F., Gregor, M., Neubert, W. J., Schulze-Osthoff, K. ve Lauer, U. M., 2002. Caspase-8 and Apaf-1-independent caspase-9 activation in Sendai virus-infected cells, J Biol Chem, 277,33, 29817-29824.
- Brojatsch, J., Naughton, J., Adkins, H. B. ve Young, J. A., 2000. TVB receptors for cytopathic and noncytopathic subgroups of avian leukosis viruses are functional death receptors, J Virol, 74,24, 11490-11494.

- Bronner, D. N., Abuaita, B. H., Chen, X., Fitzgerald, K. A., Nunez, G., He, Y., Yin, X. M. ve O'Riordan, M. X., 2015. Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage, Immunity, 43,3, 451-462.
- Broyles, S. S., 2003. Vaccinia virus transcription, J Gen Virol, 84,Pt 9, 2293-2303.
- Buller, R. M. ve Palumbo, G. J., 1991. Poxvirus pathogenesis, Microbiol Rev, 55,1, 80-122.
- Cakici, F. O., Ozgen, I., Bolu, H., Erbas, Z., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2015. Highly effective bacterial agents against *Cimbex quadrimaculatus* (Hymenoptera: Cimbicidae): isolation of bacteria and their insecticidal activities, World J Microbiol Biotechnol, 31,1, 59-67.
- Cao, J. X., Teoh, M. L., Moon, M., McFadden, G. ve Evans, D. H., 2002. Leporipoxvirus Cu-Zn superoxide dismutase homologs inhibit cellular superoxide dismutase, but are not essential for virus replication or virulence, Virology, 296,1, 125-135.
- Chejanovsky, N. ve Gershburg, E., 1995. The wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells, Virology, 209,2, 519-525.
- Chitnis, N. S., D'Costa, S. M., Paul, E. R. ve Bilimoria, S. L., 2008. Modulation of iridovirus-induced apoptosis by endocytosis, early expression, JNK, and apical caspase, Virology, 370,2, 333-342.
- Choi, E. J., Kim, S. M., Shin, J. H., Kim, S., Song, K. J. ve Kee, S. H., 2014. Involvement of caspase-2 activation in aurora kinase inhibitor-induced cell death in axin-expressing L929 cells, Apoptosis, 19,4, 657-667.
- Conrad, S. J. ve Liu, J., 2019. Poxviruses as Gene Therapy Vectors: Generating Poxviral Vectors Expressing Therapeutic Transgenes, Methods Mol Biol, 1937, 189-209.
- Cooper, D. M., Granville, D. J. ve Lowenberger, C., 2009. The insect caspases, Apoptosis, 14,3, 247-256.
- Coutu, J., Ryerson, M. R., Bugert, J. ve Brian Nichols, D., 2017. The Mollusum Contagiosum Virus protein MC163 localizes to the mitochondria and dampens mitochondrial mediated apoptotic responses, Virology, 505, 91-101.
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T. ve Ryan, K. M., 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis, Cell, 126,1, 121-134.
- Cuconati, A. ve White, E., 2002. Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection, Genes Dev, 16,19, 2465-2478.

- Cullen, S. P. ve Martin, S. J., 2009. Caspase activation pathways: some recent progress, Cell Death Differ, 16,7, 935-938.
- Danismazoglu, M., Nalcacioglu, R., Muratoglu, H. ve Demirbag, Z., 2018. The protein-protein interactions between Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) protein kinases (PKs) and all viral proteins, Virus Res, 248, 31-38.
- De Silva, F. S., Lewis, W., Berglund, P., Koonin, E. V. ve Moss, B., 2007. Poxvirus DNA primase, Proc Natl Acad Sci U S A, 104,47, 18724-18729.
- Diven, D. G., 2001. An overview of poxviruses, J Am Acad Dermatol, 44,1, 1-16.
- Dubovi, N. J. M. a. E. J., 2016. Fenner's Veterinary Virology, Academic Press, Fifth Edition, 978-0-12-800946-8.
- Dumay, A., Laulier, C., Bertrand, P., Saintigny, Y., Lebrun, F., Vayssiere, J. L. ve Lopez, B. S., 2006. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation, Oncogene, 25,22, 3196-3205.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol Pathol, 35,4, 495-516.
- Everett, H. ve McFadden, G., 2002. Poxviruses and apoptosis: a time to die, Curr Opin Microbiol, 5,4, 395-402.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. ve Liang, J., 2005. Caspase family proteases and apoptosis, Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 37,11, 719-727.
- Fink, S. L. ve Cookson, B. T., 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, Infect Immun, 73,4, 1907-1916.
- Fleisher, T. A., 1997. Apoptosis, Ann Allergy Asthma Immunol, 78,3, 245-249; quiz 249-250.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S. ve Orlandini, S. Z., 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis, J Cell Physiol, 182,1, 41-49.
- Fuentes-Prior, P. ve Salvesen, G. S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition, Biochem J, 384, 2, 201-232.
- Fulda, S. ve Debatin, K. M., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, Oncogene, 25,34, 4798-4811.
- Goodwin, R. H. ve Milner, R. J., 1991. Entomopoxvirinae. In "Atlas of Invertebrate Viruses" CRC Press, Boca Raton, FL., 259-285.

- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H. R. ve Hengartner, M. O., 1999. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline, Development, 126,5, 1011-1022.
- Guo, F. B. ve Yu, X. J., 2007. Re-prediction of protein-coding genes in the genome of *Amsacta moorei* entomopoxvirus. Journal of Virological Methods, 146, 389-392.
- Hall, R. L. ve Hink, W. F., 1990. Physical mapping and field inversion gel electrophoresis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA, Arch Virol, 110,1-2, 77-90.
- Haller, S. L., Peng, C., McFadden, G. ve Rothenburg, S., 2014. Poxviruses and the evolution of host range and virulence, Infect Genet Evol, 21, 15-40.
- Hinshaw, V. S., Olsen, C. W., Dybdahl-Sissoko, N. ve Evans, D., 1994. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses, J Virol, 68,6, 3667-3673.
- Hu, H. I., Chang, H. H. ve Sun, D. S., 2015. Differential regulation of caspase-2 in MPP(+)-induced apoptosis in primary cortical neurons, Exp Cell Res, 332,1, 60-66.
- Hughes, A. L., 2002. Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts, Infect Genet Evol, 2,1, 3-10.
- Inan, C., Muratoglu, H., Arif, B. M. ve Demirbag, Z., 2018. *Amsacta moorei* entomopoxvirus encodes a functional heparin-binding glycosyltransferase (AMV248), Virus Genes, 54,3, 438-445.
- Jana, S. ve Deb, J. K., 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*, Appl Microbiol Biotechnol, 67,3, 289-298.
- Julien, O. ve Wells, J. A., 2017. Caspases and their substrates, Cell Death Differ, 24,8, 1380-1389.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br J Cancer, 26,4, 239-257.
- King, L. A., Hitchman, R. ve Possee, R. D., 2007. Recombinant baculovirus isolation, Methods Mol Biol, 388, 77-94.
- Kitevska, T., Roberts, S. J., Pantaki-Eimany, D., Boyd, S. E., Scott, F. L. ve Hawkins, C. J., 2014. Analysis of the minimal specificity of caspase-2 and identification of Ac-VDTTD-AFC as a caspase-2-selective peptide substrate, Biosci Rep, 34,2.
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G. ve Jenkins, N. A., 1994. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme, Genes Dev, 8,14, 1613-1626.

- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. ve Kobayashi, Y., 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages, J Immunol, 171,9, 4672-4679.
- Laliberte, J. P. ve Moss, B., 2010. Lipid membranes in poxvirus replication, Viruses, 2,4, 972-986.
- Lavrik, I. N., Golks, A. ve Krammer, P. H., 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death, J Clin Invest, 115,10, 2665-2672.
- Levin, S., Bucci, T. J., Cohen, S. M., Fix, A. S., Hardisty, J. F., LeGrand, E. K., Maronpot, R. R. ve Trump, B. F., 1999. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists, Toxicol Pathol, 27,4, 484-490.
- Li, J. ve Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond, Oncogene, 27,48, 6194-6206.
- Liu, C. C., Hao, D. J., Zhang, Q., An, J., Zhao, J. J., Chen, B., Zhang, L. L. ve Yang, H., 2016. Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment, Cancer Chemother Pharmacol, 78,6, 1113-1130.
- Macen, J. L., Upton, C., Nation, N. ve McFadden, G., 1993. SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation, Virology, 195,2, 348-363.
- MacLachlan, N. J. ve Dubovi, E. J., 2011. Poxviridae, Fenner's Veterinary Virology, 4th Edition, 151-165.
- Majno, G. ve Joris, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, Am J Pathol, 146,1, 3-15.
- Makrides, S. C., 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli, Microbiol Rev, 60,3, 512-538.
- McFadden, G., 2005. Poxvirus tropism, Nat Rev Microbiol, 3,3, 201-213.
- McStay, G. P. ve Green, D. R., 2014. Assaying caspase activity in vitro, Cold Spring Harb Protoc, 2014,7, 774-777.
- Means, J. C., Penabaz, T. ve Clem, R. J., 2007. Identification and functional characterization of AMVp33, a novel homolog of the baculovirus caspase inhibitor p35 found in Amsacta moorei entomopoxvirus, Virology, 358,2, 436-447.
- Messud-Petit, F., Gelfi, J., Delverdier, M., Amardeilh, M. F., Py, R., Sutter, G. ve Bertagnoli, S., 1998. Serp2, an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus, J Virol, 72,10, 7830-7839.
- Moroziewicz, D. ve Kaufman, H. L., 2005. Gene therapy with poxvirus vectors, Curr Opin Mol Ther, 7,4, 317-325.

- Moss, B., 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development, Science, 252,5013, 1662-1667.
- Moss, B., 2013. Poxvirus DNA replication, Cold Spring Harb Perspect Biol, 5,9.
- Muratoglu, H., Nalcacioglu, R., Arif, B. M. ve Demirbag, Z., 2016. Genome-wide analysis of differential mRNA expression of Amsacta moorei entomopoxvirus, mediated by the gene encoding a viral protein kinase (AMV197), Virus Res, 215, 25-36.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. ve Summers, M. D, 1995. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Virus Taxonomy, Sixth edition(Springer-Verlag.).
- Nutt, L. K., Margolis, S. S., Jensen, M., Herman, C. E., Dunphy, W. G., Rathmell, J. C. ve Kornbluth, S., 2005. Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2, Cell, 123,1, 89-103.
- Oliveira, G. P., Rodrigues, R. A. L., Lima, M. T., Drumond, B. P. ve Abrahao, J. S., 2017. Poxvirus Host Range Genes and Virus-Host Spectrum: A Critical Review, Viruses, 9,11.
- Ozgen, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z., Vlak, J. M., van Oers, M. M. ve Nalcacioglu, R., 2014. Construction and characterization of a recombinant invertebrate iridovirus, Virus Res, 189, 286-292.
- Ozsahin, E., Sezen, K. ve Demirbag, Z., 2015. Amsacta moorei entomopoxvirus encodes a functional esterase (amv133) with protease activity, Intervirology, 58,1, 41-48.
- Paul, E. R., Chitnis, N. S., Henderson, C. W., Kaul, R. J., D'Costa, S. M. ve Bilimoria, S. L., 2007. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract, Arch Virol, 152,7, 1353-1364.
- Perera, S., Krell, P., Demirbag, Z., Nalcacioglu, R. ve Arif, B., 2013. Induction of apoptosis by the Amsacta moorei entomopoxvirus, J Gen Virol, 94, 8, 1876-1887.
- Pickup, D. J., 2015. Extracellular Virions: The Advance Guard of Poxvirus Infections, PLoS Pathog, 11,7, e1004904.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. ve D'Orazi, G., 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, Aging (Albany NY), 8,4, 603-619.
- Porowinska, D., Wujak, M., Roszek, K. ve Komoszynski, M., 2013. [Prokaryotic expression systems], Postepy Hig Med Dosw (Online), 67, 119-129.
- Prasad, V. ve Srivastava, S. , 2016. Insect Viruses, Ecofriendly Pest Management for Food Security, 411–442.

- Puget, N., Knowlton, M. ve Scully, R., 2005. Molecular analysis of sister chromatid recombination in mammalian cells, DNA Repair (Amst), 4,2, 149-161.
- Ren, L., Yang, R., Guo, L., Qu, J., Wang, J. ve Hung, T., 2005. Apoptosis induced by the SARS-associated coronavirus in Vero cells is replication-dependent and involves caspase, DNA Cell Biol, 24,8, 496-502.
- Ribet, D. ve Cossart, P., 2010. Post-translational modifications in host cells during bacterial infection, FEBS Lett, 584,13, 2748-2758.
- Roberts, D. W. a. G., R. R. , 1968. A poxlike virus from *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arctiidae), J Invertebr Pathol, 12, 141-143.
- Rubio, N. ve Sanz-Rodriguez, F., 2016. Overexpression of caspase 1 in apoptosis-resistant astrocytes infected with the BeAn Theiler's virus, J Neurovirol, 22,3, 316-326.
- Schreiber, M. ve McFadden, G., 1994. The myxoma virus TNF-receptor homologue (T2) inhibits tumor necrosis factor-alpha in a species-specific fashion, Virology, 204,2, 692-705.
- Schultz, K. L. ve Friesen, P. D., 2009. Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection, J Virol, 83,21, 11123-11132.
- Sezer K., ve Demirbag Z., 2005. Entomopoksvirüsler ve Biyolojik Kontrol Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29, 4, 280-286.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. ve Kumar, S., 2015. Old, new and emerging functions of caspases, Cell Death Differ, 22,4, 526-539.
- Shi, Y., 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view, Protein Sci, 13,8, 1979-1987.
- Shisler, J. L., 2015. Immune evasion strategies of molluscum contagiosum virus, Adv Virus Res, 92, 201-252.
- Shisler, J. L., Isaacs, S. N. ve Moss, B., 1999. Vaccinia virus serpin-1 deletion mutant exhibits a host range defect characterized by low levels of intermediate and late mRNAs, Virology, 262,2, 298-311.
- Smith, G. L., Benfield, C. T., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S. W., Ferguson, B. J. ve Sumner, R. P., 2013. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity, J Gen Virol, 94,Pt 11, 2367-2392.
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A. ve Salvesen, G. S., 2002. Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition, Trends Biochem Sci, 27,2, 94-101.
- Stevens, R. C., 2000. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology, Structure, 8,9, R177-185.

- Tang, Y., Wells, J. A. ve Arkin, M. R., 2011. Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis, J Biol Chem, 286,39, 34147-34154.
- Thomas, C. N., Berry, M., Logan, A., Blanch, R. J. ve Ahmed, Z., 2017. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration, Cell Death Discov, 3, 17032.
- Thoulouze, M. I., Lafage, M., Montano-Hirose, J. A. ve Lafon, M., 1997. Rabies virus infects mouse and human lymphocytes and induces apoptosis, J Virol, 71,10, 7372-7380.
- Tiwari, M., Sharma, L. K., Vanegas, D., Callaway, D. A., Bai, Y., Lechleiter, J. D. ve Herman, B., 2014. A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2: modulation of autophagy, Autophagy, 10,6, 1054-1070.
- Turner, P. C. ve Moyer, R. W., 2002. Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models, Virus Res, 88,1-2, 35-53.
- URL-1, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/27/01/2020>.
- URL-2, <https://www.fishersci.com/shop/products/promega-pgem-t-pgem-t-easy-vector>.
- URL-3, <https://www.addgene.org/vector-database/2565/>.
- URL-4, http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html.
- URL-5, <https://www.addgene.org/vector-database/1952/>.
- URL-6, <https://bioquochem.com/product/caspase-3-colorimetric-assay-kit/>.
- URL-7, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR029030/protein/UniProt/?page>.
- Vago, C., 1963. molecular biology of entomopoksvirus.pdf, Journal of Insect Pathology 5, 275~76.
- Van Opdenbosch, N. ve Lamkanfi, M., 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease, Immunity, 50,6, 1352-1364.
- Vandergaast, R., Mitchell, J. K., Byers, N. M. ve Friesen, P. D., 2015. Insect inhibitor-of-apoptosis (IAP) proteins are negatively regulated by signal-induced N-terminal degrons absent within viral IAP proteins, J Virol, 89,8, 4481-4493.
- Vigneswara, V. ve Ahmed, Z., 2019. Pigment epithelium-derived factor mediates retinal ganglion cell neuroprotection by suppression of caspase-2, Cell Death Dis, 10,2, 102.
- Vijayarathna, S., Chen, Y., Kanwar, J. R. ve Sasidharan, S., 2017. Standardized Polyalthia longifolia leaf extract (PLME) inhibits cell proliferation and promotes apoptosis:

- The anti-cancer study with various microscopy methods, Biomed Pharmacother, 91, 366-377.
- Walsh, D., 2017. Poxviruses: Slipping and sliding through transcription and translation, PLoS Pathog, 13,11, e1006634.
- Wang, S. ve Shuman, S., 1995. Vaccinia virus morphogenesis is blocked by temperature-sensitive mutations in the F10 gene, which encodes protein kinase 2, J Virol, 69,10, 6376-6388.
- Williams, T., Bergoin, M. ve van Oers, M. M., 2017. Diversity of large DNA viruses of invertebrates, J Invertebr Pathol, 147, 4-22.
- Winter, J., Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1995. The effect of inhibitors on the growth of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in *Lymantria dispar* (gypsy moth) cells, Virology, 211,2, 462-473.
- Wittek, R., 1982. Organization and expression of the poxvirus genome, Experientia, 38,3, 285-297.
- Wong, G. H. ve Goeddel, D. V., 1994. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways, J Immunol, 152,4, 1751-1755.
- Wurzer, W. J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S. ve Ludwig, S., 2003. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation, EMBO J, 22,11, 2717-2728.
- Yagami, T., Yamamoto, Y. ve Koma, H., 2019. Pathophysiological Roles of Intracellular Proteases in Neuronal Development and Neurological Diseases, Mol Neurobiol, 56,5, 3090-3112.
- Yamada, H., Shibuya, M., Kobayashi, M. ve Ikeda, M., 2011. Identification of a novel apoptosis suppressor gene from the baculovirus *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus, J Virol, 85,10, 5237-5242.
- Yang, Z., Reynolds, S. E., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F. ve Moss, B., 2011. Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication, J Virol, 85,19, 9899-9908.
- Yousefi, A., Fotouhi, F., Hosseinzadeh, S., Kheiri, M. T., Farahmand, B., Montazeri, S. ve Mousavi, F., 2012. Expression of antigenic determinants of the haemagglutinin large subunit of novel influenza virus in insect cells, Folia Biol (Praha), 58,4, 151-156.
- Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Prokhorova, E. A., Zhivotovsky, B. ve Lavrik, I. N., 2017. Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation, Trends Cell Biol, 27,5, 322-339.