

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* MUHTEMEL GLİKOZİL
TRANSFERAZ GENİNİN (AMV248) YAPISAL VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Cihan İNAN

**ARALIK 2016
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* MUHTEMEL GLİKOZİL TRANSFERAZ
GENİNİN (AMV248) YAPISAL VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

Cihan İNAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (BİYOLOJİ)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15 / 11 / 2016

Tezin Savunma Tarihi : 14 / 12 / 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Trabzon 2016

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Cihan İNAN Tarafından Hazırlanan**

***AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS* MUHTEMEL GLİKOZİL TRANSFERAZ
GENİNİN (AMV248) YAPISAL VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 15 /11 /2016 gün ve 1676 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

.....

Üye : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

.....

Üye : Prof. Dr. Dilek BALIK

.....

Üye : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Amsacta moorei entomopoxvirus* Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (*amv248*) Yapısal ve Fonksiyonel Analizi” isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Bu tezde *Amsacta moorei entomopoxvirus*’ün hücreye tutunma mekanizması ilk defa çalışılmış ve önemli bulgular elde edilmiştir.

Tez çalışmamda danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve tecrübesini her zaman ilgiyle paylaşan değerli hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a sonsuz teşekkürleri bir borç bilirim.

Tezin her aşamasında her türlü yardımı ve desteğini benden esirgemeyen, özellikle rekombinant virüs oluşturulmasında büyük katkıları olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na en içten duygularla teşekkür ederim. Tez süresince çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez izleme jüri üyesi sayın hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Biyoloji Bölümü mikrobiyoloji grubu hocalarıma, tez süresince yardımlarından dolayı Ardahan ESKİ, Mehtap DANIŞMAZOĞLU, Aydın YEŞİLYURT, Dönüş GENCER, Zeynep BAYRAMOĞLU’na ve aynı laboratuvarı paylaştığım bütün laboratuvar arkadaşlarıma, çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Biyoloji Bölümü laboratuvarlarını ve imkanlarını kullanmama izin veren Biyoloji Bölüm Başkanlığı’na teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan aileme, desteğini ve güvenini her zaman hissettiren, biricik eşim Burcu İNAN’a sonsuz minnet ve şükranlarımla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince 113Z219 numaralı proje kapsamında destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ediyorum.

Cihan İNAN
Trabzon 2016

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Amsacta moorei entomopoxvirus* Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (*amv248*) Yapısal ve Fonksiyonel Analizi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
14/12/2016

Cihan İNAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Poksvirüsler	2
1.3. Entomopoksvirüsler.....	3
1.3.1. Entomopoksvirüslerin Genel Özellikleri	4
1.3.2. Entomopoksvirüslerde Sferoid Yapısı	5
1.3.3. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	6
1.3.4. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'ün Transkripsiyon Özellikleri	7
1.3.5. <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'ün Hücreye Girişi	8
1.4. Glikozil Transferazlar.....	13
1.4.1. Viral Glikozil Transferazlar	13
1.4.2. Entomopoksvirüs Glikozil Transferaz Proteinleri	14
1.5. Tezin Amacı	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Kullanılan Hücre Kültürü ve Virüs	17
2.2. Kullanılan Virüslerin Hücre Kültüründe Çoğaltılmaları ve Konsantrasyonlarının Tayini	17
2.2.1. Virüsler ve Hücre Kültüründe Çoğaltılmaları	18
2.2.2. Çoğaltılan Virüslerin Konsantrasyonlarının Tayini	18
2.3. <i>amv248</i> Geninin Yapısının ve Transkripsiyonunun Aydınlatılması	19
2.3.1. <i>amv248</i> Geninin Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi.....	19
2.3.2. <i>amv248</i> Geninin Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi	21
2.3.3. <i>amv248</i> Geninin Translasyona Uğramayan 5' ve 3' Bölgelerinin (5'/3' UTR) Belirlenmesi	22

2.3.3.1.	<i>amv248</i> Geninin 5' ve 3' UTR Analizleri İçin Primerlerin Tasarlanması	22
2.3.3.2.	<i>amv248</i> Geninin 5' ve 3' UTR Analizleri İçin RNA İzolasyonu	23
2.3.3.3.	Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 5' Ucunun Rastgele Çoğaltılması (5'-RACE)	23
2.3.3.4.	<i>amv248</i> Geninin 5' UTR'sine Ait DNA'ların Analizi	25
2.3.3.5.	Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 3' Ucunun Rastgele Çoğaltılması (3'-RACE)	28
2.3.3.6.	<i>amv248</i> Geninin 3' UTR'sine Ait DNA'ların Analizi	29
2.4.	Biyoinformatik Analizle Proteinin Üç Boyutlu Yapısının Oluşturulması ve Konak Hücre Tutunma Motiflerinin Belirlenmesi	29
2.4.1.	Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (<i>amv248</i>) Biyoinformatik Analizi	29
2.4.2.	AMV248 Proteininin Üç Boyutlu Yapısının Belirlenmesi	29
2.4.3.	AMV248 Proteininin Konak Hücre Bağlanma Motiflerinin Belirlenmesi	30
2.5.	Rekombinant AMV248 Proteininin Bakülovirüs Vektör Sisteminde İfadesi	30
2.5.1.	AMV248 Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması	31
2.5.2.	Genin pFastBac HTb Ara Transfer Vektörüne Klonlanması	33
2.5.3.	Genin Bac-to-Bac® Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması	34
2.5.4.	Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması	35
2.5.5.	Rekombinant AMV248 Proteininin Hücre Kültüründe Üretilmesi	36
2.6.	AMV248 Yapısal Proteininin İmmün Nötralizasyonunun Virüs Replikasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	38
2.7.	Rekombinant Proteinin Heparine Bağlanma Kapasitesinin Araştırılması	39
2.7.1.	AMV248 Rekombinant Proteininin Heparin Kolondan Geçirilmesi	39
2.7.2.	HiTrap Heparin HP Kolondan Geri Kazanılan Proteinin Konsantre Edilmesi ...	41
2.7.3.	Heparine Tutunan Rekombinant Proteinin Görüntülenmesi	41
2.8.	Virüslerin Hücre Yüzeylerine Bağlanma Özelliklerinin Araştırılması	41
2.8.1.	Virüslerin Heparine Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi	42
2.8.2.	Virüs Enfeksiyonlarının Çözülebilir Glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ile İnhibisyonunun Belirlenmesi	42
2.8.3.	Virüslerin Enzimatik Olarak Yüzey GAG'ları Çıkarılan Hücrelere Bağlanma Etkilerinin Belirlenmesi	43
2.9.	<i>amv248</i> Kodlu Genin AMEV Genomundan Silinmesi	43
2.9.1.	<i>gfp</i> İçeren Rekombinant Transfer Vektörünün Oluşturulması	44
2.9.2.	Transfer Vektörünü Oluşturmak İçin Çoğaltılan DNA'ların Birleştirilmesi	45
2.9.3.	Rekombinant Virüsün Oluşturulması	48
2.9.3.1.	pBS-AmΔgt/ <i>gfp</i> 'nin Yaban Tip AMEV Enfeksiyonu Sonrası Ld652 Hücrelerine	

Transfeksiyonu.....	48
2.9.3.2. Rekombinant AMEV'in Seçimi ve Saflaştırılması	49
2.9.3.3. Rekombinant Virüs Stokunun Hazırlanması.....	50
2.9.3.4. <i>amv248</i> 'in AMEV Genomundan Silindiğinin PCR ile Doğrulanması	50
2.10. Oluşturulan Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Replikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi	51
2.10.1. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) DNA Replikasyonunun Belirlenmesi	52
2.10.2. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Enfektivitesinin Belirlenmesi	54
2.10.3. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Protein Profilinin Belirlenmesi	54
2.10.4. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Transkripsiyon Özelliğinin Belirlenmesi..	54
3. BULGULAR	56
3.1. Virüslerin Hücre Kültüründe Çoğaltılması ve Konsantrasyonlarının Tayini	56
3.1.1. Virüslerin Çoğaltılması	56
3.1.2. Enfeksiyonlarda Kullanılan Virüslerin Konsantrasyonlarının Tayini	57
3.2. <i>amv248</i> Geninin Yapısı ve Transkripsiyonu	57
3.2.1. <i>amv248</i> Geninin Transkripsiyon Zamanı.....	57
3.2.2. <i>amv248</i> Geninin Transkripsiyon Sınıfı	59
3.2.3. <i>amv248</i> Geninin Translasyona Uğramayan 5' ve 3' Bölgeleri (5'/3' UTR)	61
3.2.3.1. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 5' Ucu.....	61
3.2.3.2. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 3' Ucu.....	63
3.3. Proteinin Üç Boyutlu Yapısı ve Konak Hücre Tutunma Motiflerinin Biyoinformatik Analizi	64
3.3.1. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (<i>amv248</i>) Biyoinformatik Analizi	64
3.3.2. AMV248 Proteinin Sinyal Peptit İçeriği.....	66
3.3.3. AMV248 Proteinin Transmembran Domein İçeriği	66
3.3.4. AMV248 Proteininin Üç Boyutlu Yapısı.....	67
3.3.5. AMV248 Proteininin Konak Hücre Bağlanma Motifleri	68
3.4. Rekombinant AMV248 Proteininin Bakülovirüs Vektör Sisteminde İfadesi	70
3.4.1. <i>amv248</i> Genini PCR ile Çoğaltma ve Ara Vektöre Klonlama.....	70
3.4.2. Klonların Restriksiyon Analizi	71
3.4.3. Klonların Dizi Analizi.....	71
3.4.4. <i>amv248</i> Geninin pFastBac HTb Ara Transfer Vektöre Klonlanması	72
3.4.5. Genin Bac-to-Bac® Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması	73
3.4.6. Üretilen Rekombinant AMV248 Proteininin Saflaştırılması.....	74
3.4.7. Proteinin PVDF Membrana Aktarılması ve Western Blot Analizi	74

3.5.	AMV248 Yapısal Proteininin İmmün Nötralizasyonunun Virüs Replikasyonuna Etkisi.....	75
3.5.1.	İmmün Nötralizasyon Sonrası Oluşan Yavru Virüslerin Konsantrasyonları.....	75
3.6.	Oluşturulan Rekombinant AMV248 Proteini ile Hücre Yüzey Matriksinin Etkileşme Özelliği.....	77
3.7.	Virüslerin Hücre Yüzeylerine Bağlanma Özellikleri	78
3.7.1.	Virüslerin Heparine Bağlanma Kapasitesi	78
3.7.2.	Virüs Enfeksiyonlarının Çözülebilir Glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ile İnhibisyonu.....	79
3.7.3.	Virüslerin Enzimatik Olarak Yüzey GAG'ları Çıkarılan Hücrelere Bağlanma Özelliği.....	80
3.8.	Glikozil Transferaz Geni (<i>amv248</i>) Çıkartılmış Rekombinant Virüs Oluşturma	81
3.8.1.	<i>gfp</i> İçeren Rekombinant Transfer Vektörü	81
3.8.2.	Oluşturulan Transfer Vektörün Ld652 Hücrelerine Transfeksiyonu	84
3.8.3.	Rekombinant Virüsün Saflaştırılması, Üretimi ve Konsantrasyon Tayini	84
3.8.4.	<i>amv248</i> 'in AMEV Genomundan Silindiğini Doğrulama	85
3.9.	Rekombinant Virüsün (<i>AmΔgt/gfp</i>) Replikasyon Özellikleri.....	88
3.9.1.	Rekombinant Virüsün (<i>AmΔgt/gfp</i>) DNA Replikasyonu	88
3.9.2.	Rekombinant Virüsün (<i>AmΔgt/gfp</i>) Enfektivitesi	88
3.9.3.	Rekombinant Virüsün (<i>AmΔgt/gfp</i>) Protein Profili	89
3.9.4.	Rekombinant Virüsün (<i>AmΔgt/gfp</i>) Transkripsiyonel Analizi	90
4.	TARTIŞMA.....	92
5.	SONUÇLAR.....	102
6.	ÖNERİLER	105
7.	KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

AMSACTA MOOREI ENTOMOPOXVIRUS MUHTEMEL GLİKOZİL TRANSFERAZ
GENİNİN (*AMV248*) YAPISAL VE FONKSİYONEL ANALİZİ

Cihan İNAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2016, 113 Sayfa

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV), gen terapi, ifade vektörü ve biyopestisit olarak kullanılma potansiyeli olan önemli bir böcek virüsüdür. DNA dizi ve biyoinformatik analizler sonucu genomunda belirlenen *amv248* kodlu ORF'nin muhtemel bir glikozil transferaz kodladığı önerilmiştir. Böylece *amv248*'in konak seçiciliğinde rol oynayan, virüs replikasyonunun için zorunlu bir yapısal protein kodladığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında AMEV glikozil transferaz geninin yapısı ve virüsün konağa tutunmasındaki rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *amv248*'in transkripsiyonunun AMEV enfeksiyonunu takiben 3 ila 6 saatler arasında başlayan *ara* gen sınıfına ait bir gen olduğu; 126 baz 5' ve 50-84 baz aralığında 3' transasyona uğramayan bölge içerdiği belirlenmiştir. AMV248 proteininin 3 boyutlu yapısı tahmin edilerek muhtemel konak bağlanma aminoasitleri belirlenmiş ve 30 kDa'luk rekombinant protein üretilip heparine bağlandığı gösterilmiştir. Proteine özgü antikor hizmet alımı ile üretilmiş ve bu antikor ile virüsün immün nötralizasyonu gösterilmiştir. Ayrıca virüsün hücre yüzey matriks bileşenlerinden heparine bağlandığı, enfeksiyonun çözülebilir glikozaminoglikanlar ile inhibe edilebildiği ve yüzey GAG'ları çıkarılan hücrelerin enfeksiyonunda azalma görüldüğü belirlenmiştir. Son olarak *amv248* genini içermeyen rekombinant virüs üretilmiş ve kontrol virüs ile replikasyon, enfeksiyon özellikleri, protein profili ve yavru virüs üretimi bakımından fark gözlenmezken, gen ifade seviyesinde fark olduğu qPCR metodu ile belirlenmiştir. Sonuç olarak virüsün konak hücreye tutunma ve enfeksiyon başlama mekanizmasıyla ilgili önemli bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Amsacta moorei entomopoxvirus*, *amv248*, Glikozil transferaz, Virüs tutunması

PhD Thesis

SUMMARY

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS OF *AMSACTA MOOREI* *ENTOMOPOXVIRUS* PUTATIVE GLYCOSYLTRANSFERASE GENE (AMV248)

Cihan İNAN

Karadeniz Technical University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

2016, 113 Pages

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) is an important insect virus which has potential usage as gene expression and therapy vectors and biopesticide. Based on DNA sequencing and bioinformatics analysis, it was suggested that *amv248* encodes a putative glycosyltransferase. This suggests that *amv248* encodes a structural protein which may play a role at host specificity of the virus and essential for initiation of virus replication.

In this thesis, it was aimed to identify the function and structure of *amv248* gene. Within the scope of these studies, it was concluded that transcription of *amv248* started between 3 and 6 hours post infection, and it belongs to *intermediate* class of virus gene expression; the 5' and 3' untranslated regions of gene were determined as 126 bases and between 50-84 bases, respectively. The 3D structure of the protein was generated by bioinformatics analysis, and putative host cell binding aminoacids were determined. A 30 kDa recombinant protein of the gene was expressed and shown that it binds to heparine. Specific antibody against protein was produced and virus was immunoneutralized using this antibody. Also it was shown that virus binds to a cellular matrix compound, heparine, viral infection was inhibited by glycoaminoglycans (GAGs) and viral infection reduced after digestion of GAGs from cell surface. Finally, *amv248* knocked-out virus was constructed, and while no differences was found between control and recombinant virus regarding virus replication, infection, protein profile and progeny virus yield; significant change was detected at transcriptional level. In conclusion, important findings regarding to virus-host cell attachment and infection mechanism were determined in this study.

Keywords: *Amsacta moorei entomopoxvirus*, *amv248*, Glycosyltransferase, Virus attachment

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Poxviridae familyasının taksonomik dağılımı	3
Şekil 2.	Tipik bir entomopoksvirüsün şematik görünümü.....	5
Şekil 3.	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> (AMEV) sferoid yapıları	5
Şekil 4.	Poksvirüslere ait viriyon tipleri	8
Şekil 5.	Vaksinya virüs viriyon yapıları ve yapısal proteinleri.....	9
Şekil 6.	Vaksinya virus enfeksiyon mekanizması.....	10
Şekil 7.	Glikozil transferaz enzimlerinin çalışma prensibi.	13
Şekil 8.	Virüs konsantrasyon tayini	19
Şekil 9.	<i>amv248</i> 'in transkripsiyon sınıfının belirlenmesi.	21
Şekil 10.	<i>amv248</i> geninin 5' RACE analizi.	23
Şekil 11.	Bac-to-Bac Bakülovirüs vektör sistemi.	31
Şekil 12.	HiTrap HP Heparin kolon ile proteinlerin heparin bağlanma kapasitesinin belirlenmesi.....	39
Şekil 13.	Rekombinant virüsün oluşturulması.	48
Şekil 14.	Yaban tip <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> (AMEV) ve rekombinant virüs (AMVΔsph/gfp) ile <i>Lymantria dispar</i> (Ld652) hücrelerinin enfeksiyonu.	56
Şekil 15.	<i>amv248</i> geninin transkripsiyon zamanını belirlemek için izole edilen toplam RNA örnekleri.	58
Şekil 16.	<i>amv248</i> geninin transkripsiyon zamanı	59
Şekil 17.	<i>amv248</i> geninin transkripsiyon sınıfını belirlemek için izole edilen toplam RNA örnekleri	60
Şekil 18.	<i>amv248</i> geninin transkripsiyon sınıfı.....	60
Şekil 19.	<i>amv248</i> geninin 5'-UTR'sinin PCR ile çoğaltılması.....	61
Şekil 20.	<i>amv248</i> geninin 5'-UTR klonlarının restriksiyon analizleri.....	62
Şekil 21.	<i>amv248</i> geninin 5' UTR dizisi.....	62
Şekil 22.	<i>amv248</i> geninin 3' UTR'sinin PCR ile çoğaltılması.....	63
Şekil 23.	<i>amv248</i> geni için muhtemel transkripsiyon sonlanma bölge dizisi	64
Şekil 24.	<i>amv248</i> geninin nükleotit dizisi.....	64
Şekil 25.	AMV248 proteinin aminoasit dizisi	65
Şekil 26.	AMV248 protein dizisinin sahip olduğu domeinler	65

Şekil 27.	AMV248 proteininin sinyal peptit analizi.	66
Şekil 28.	AMV248 proteininin transmembran domein içeriği	67
Şekil 29.	AMV248 proteininin 3 boyutlu yapısı.....	68
Şekil 30.	Konak hücrelerin yüzeyinde bulunan heparinin 3 boyutlu yapısı.	68
Şekil 31.	AMV248 ile heparin arasındaki muhtemel etkileşim bölgeleri.....	69
Şekil 32.	<i>amv248</i> ektodomeininin genomdan elde edilmesi.....	70
Şekil 33.	<i>amv248</i> gen ektodomeinini içeren klonların restriksiyon analizi	71
Şekil 34.	<i>amv248</i> ektodomeini kodlayan DNA bölgesi.....	72
Şekil 35.	<i>amv248</i> geninin pFastBac HTb ara transfer vektörüne klonlanması.....	72
Şekil 36.	<i>amv248</i> gen bölgesini içeren rekombinant bakmid DNA'sının doğrulanması.....	73
Şekil 37.	Bakülovirüs vektör sisteminde üretilen AMV248 proteininin western blot analizi.....	74
Şekil 38.	AMV248 proteinine özgü antikorlarla nötralize edilen virüs ile Ld652 hücrelerinin enfeksiyonu.....	76
Şekil 39.	HiTrap heparin kolon ile saflaştırılan rekombinant AMV248 proteininin western blot analizi.....	77
Şekil 40.	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'ün heparine bağlandığının western blot analizi.....	78
Şekil 41.	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> 'ün Ld652 hücrelerini enfeksiyonunun çözülebilir GAG'lar ile inhibisyonu	79
Şekil 42.	Ld652 hücrelerine Heparinaz I uygulaması sonrası <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> enfeksiyon miktarı.....	80
Şekil 43.	Ld652 hücrelerine Heparinaz III uygulaması sonrası <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i> enfeksiyon miktarı.....	81
Şekil 44.	Glikozil transferaz geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgeleri ve yeşil flöresan geninin (<i>gfp</i>) çoğaltılması	82
Şekil 45.	pBS-AMV248up klonlarının restriksiyon analizi.....	82
Şekil 46.	pBS-AMV248up-down klonlarının restriksiyon analizi.	83
Şekil 47.	<i>amv248</i> geninin 5' aşağı ve 3' yukarı bölgeleri ve <i>gfp</i> genini içeren klon.....	83
Şekil 48.	pBS-AmΔgt/ <i>gfp</i> ile transfeksiyondan sonra Ld652 hücreleri	84
Şekil 49.	Ld652 hücrelerinin AmΔgt/ <i>gfp</i> ile enfeksiyonu sonrasında oluşan plaklar	85
Şekil 50.	Plak deneyi ile saflaştırılan rekombinant virüsün doğrulanması.	86
Şekil 51.	Rekombinant virüse transfer edilen bölgenin DNA dizisi.....	87
Şekil 52.	Rekombinant virüs ile kontrol virüs DNA replikasyonlarının karşılaştırılması	88
Şekil 53.	Rekombinant virüs ve kontrol virüsün enfektivitesinin karşılaştırılması.	89
Şekil 54.	Rekombinant virüs ile kontrol virüsün protein profillerinin karşılaştırılması.	90
Şekil 55.	Rekombinant virüs ile yaban tip virüsün transkripsiyonlarının karşılaştırılması ..	90

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Genom dizisi tamamlanmış entomopoksvirüsler.	4
Tablo 2. Poksvirüs tutunma ve giriş proteinleri.	12
Tablo 3. Muhtemel glikozil transferaz geninin (<i>amv248</i>) transkripsiyona uğramayan bölgelerine ait primerler.	22
Tablo 4. <i>amv248</i> geninin ifadesi için kullanılan primerler.	31
Tablo 5. Homolog rekombinasyon için kullanılan primerler.	45
Tablo 6. qPCR için kullanılan primerler.	55
Tablo 7. <i>amv248</i> geninin transkripsiyon zamanının belirlenmesi için izole edilen RNA örneklerinin özellikleri.	58
Tablo 8. <i>amv248</i> geninin transkripsiyon sınıfının belirlenmesi için izole edilen RNA örneklerinin özellikleri.	59
Tablo 9. Rekombinant virüs ve yaban tip virüsün qPCR analizi ile karşılaştırılması.	91

SEMBOLLER DİZİNİ

AMEV	: <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
AmΔgt/gfp	: Glikozil transferaz geni yerine <i>gfp</i> geni yerleştirilmiş rekombinant virüs
AmΔsph/gfp	: Sferoidin geni yerine <i>gfp</i> geni yerleştirilmiş rekombinant virüs
Ara-C	: Sitozin β-D-arabinofuranosit
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albümin
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
CHX	: Sikloheksimid
ddH ₂ O	: İki kere damıtılmış su
DIG	: Digoxigenin
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EFC	: Giriş füzyon kompleksi
EPDA	: Son nokta seyretlme metodu
EPV	: Entomopoksvirüsler
EV	: Zarflı viriyon
FBS	: Fetal Bovine Serum
Fw	: İleri (primer)
GAG	: Glikozaminoglikan
GFP	: Yeşil floresan proteini
GT	: Glikozil transferaz
IPTG	: İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranosid
kDa	: Kilodalton
Ld652	: <i>Lymantria dispar</i> 652 hücre hattı
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MOI	: Hücre başına düşen enfeksiyon yapan virüs sayısı
MV	: Olgunlaşmış viriyon

NBT/BCIP	: Nitroblue tetrazolium bromochloroindolyl fosfat
ORF	: Açık okuma zinciri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: H iyon konsantrasyonu
qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RACE	: cDNA uçlarının hızlı çoğaltılması tekniği
Rv	: Geri (primer)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
Sph	: Sferoidin
TM	: Transmembran
UTR	: Translasyona uğramayan bölge
VACV	: Vaccinia virüs
vd.,	: ve diğerleri
WHO	: Dünya sağlık örgütü
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktosid

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Tez konusunu oluşturan entomopoksvirüsler ilk kez 1963 yılında Vago tarafından keşfedilmiştir. Poxviridae familyasının omurgasız canlılarda hastalıklara sebep olan alt familyasını oluşturan bu grup kendi içinde enfekte ettikleri böcek gruplarına göre Alfa, Beta ve Gamaentomopoksvirüsler olmak üzere 3 cins ile temsil edilmektedir. *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Lepidoptera ve Orthoptera takımına ait böcekleri enfekte eden Betaentomopoxvirus cinsinin tip türüdür (Ozsahin vd., 2014). Tüm genom dizilemesi 2000 yılında Bawden ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve daha sonra birçok açık okuma zincirinin transkripsiyonel ve fonksiyonel özellikleri aydınlatılmıştır (Gruidl vd., 1992; Palmer vd., 1995; Winter vd., 1995; Alaoui-Ismaili ve Richardson 1996; Petersen vd., 1997; Alaoui-Ismaili ve Richardson 1998; Marlow vd., 1998a; Sriskanda vd., 2001; Li vd., 2005a; Li vd., 2005b; Means vd., 2007; Becker vd., 2008; Muratoğlu vd., 2010; Nalcacioglu vd., 2010; Ozsahin vd., 2014; Özşahin vd., 2015; Muratoglu vd., 2016).

Virüslerin hücreye giriş mekanizmasının ilk adımını virüsün hücreye tutunması oluşturmaktadır. Bu amaçla hücresel çeşitli reseptörler hedeflenmekte ve viral proteinler ile bu reseptörlerin etkileşimi sonucu virüs hücreye girebileceği bölgeye taşınmaktadır. Birçok virüsün hücresel glikozaminoglikanlar (GAG) adı verilen moleküllere tutunmaya özgü glikozil transferaz proteinlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Markine-Goriaynoff vd., 2004).

Viral glikozil transferazlar genel olarak virüsün konak hücreye tutunmasında görev almaktadır. Bakülovirüs glikozil transferaz proteini olan ekdisteroid proteini ile yapılan çalışmalar glikozil transferazların böceğin deri değiştirmesini ve pupaya girmesini engellediğini göstermektedir (O'Reilly ve Miller 1989). Entomopoksvirüs glikozil transferazları ile ilgili literatürde henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Genom dizi analizi sonucunda *amv248* numaralı açık okuma zincirinin (ORF) muhtemel bir glikozil transferaz proteini kodladığı belirlenmiştir (Bawden vd., 2000). Ayrıca omurgalıları enfekte eden Orthopoxvirus takımı tip türü olan Vaccinia virus (VACV) 4 farklı tutunma proteini içermektedirken entomopoksvirüslerde ise bunlardan sadece birinin korunmuş olması ve bu genin AMEV genomunda *amv248* geni ile temsil edilmesi dikkat çekmektedir. Böylece bu

tezde *Amsacta moorei entomopoxvirus*'e ait muhtemel glikozil transferaz geninin (*amv248*) virüsün konağa tutunmasındaki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

1.2. Poksvirüsler

Poxviridae familyası hem omurgalıların hem de omurgasızların hücre sitoplazmasında çoğalan, kompleks yapılı ve büyük çift zincirli DNA (dsDNA) genomlu virüslerdir (Moss 2012). Bu familyaya ait olan Variola virüsün insanlarda çiçek hastalığının etmeni olması, familyanın tanınırlığını arttırmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yoğun çalışmaları sonucu çiçek hastalığı 1977'de ortadan kaldırılmıştır. Bununla birlikte, Orthopoxvirüs cinsine ait diğer bazı virüslerin yakın zamana kadar insanlarda enfektif olduğu rapor edilmiştir (Singh vd., 2016). Yine bu aile üyelerinden Vaccinia virüs (VACV) hücre kültüründe çoğaltılabilen, mikroskopik olarak görülebilen ve en detaylı incelenen ilk hayvan virüsü olarak bilinmektedir.

Poxviridae familyasına mensup olan poksvirüsler Chordopoxvirinae (omurgalıları enfekte eden poksvirüsler) ve Entomopoxvirinae (böcekleri enfekte eden poksvirüsler) olmak üzere iki alt familyaya ayrılır (Haller vd., 2014). Omurgalılarda enfeksiyon oluşturan Chordopoxvirinae ailesi, literatürde dokuz cins ile temsil edilmektedir. Bununla birlikte böceklerde enfeksiyon oluşturan Entomopoxvirinae ailesi ise enfekte ettikleri organizmalara ve viriyon morfolojilerine göre filogenetik olarak alfaentomopoksvirüsler (Coleoptera takımını enfekte eden), betaentomopoksvirüsler (Lepidoptera ve Orthoptera takımlarını enfekte eden) ve gamaentomopoksvirüsler (Diptera takımını enfekte eden) olmak üzere 3 cinse ayrılır (Thézé vd., 2013). Bu cinslerin yanı sıra henüz sınıflandırılmamış olan *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*'ü içeren bir cins de bulunmaktadır (Afonso vd., 1999). Poxviridae familyasının taksonomik dağılımı Şekil 1'de özetlenmiştir.

<u>Familiya</u>	<u>Alt Familiya</u>	<u>Cins</u>	<u>Tür Sayısı</u>
Poxviridae	Chordopoxvirinae (Konakları omurgalı)	Avipoxvirus	10 tür
		Capripoxvirus	3 tür
		Cervidpoxvirus	1 tür
		Leporipoxvirus	4 tür
		Molluscipoxvirus	1 tür
		Orthopoxvirus	9 tür
		Parapoxvirus	4 tür
		Suipoxvirus	1 tür
		Yatapoxvirus	2 tür
		Crocodylipoxvirus	1 tür
	Entomopoxvirinae (Konakları omurgasız)	Alphaentomopoxvirus	7 tür
		Betaentomopoxvirus	13 tür
		Gammaentomopoxvirus	6 tür
		Sınıflandırılmamış (MsEV)	1 tür

Şekil 1. Poxviridae familyasının taksonomik dağılımı.

Çeşitli hücre kültürlerinde çoğaltılabilmesi ve genomun kolayca değiştirilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı Orthopoxvirus cinsine ait Vaccinia virus (VACV) poksvirüs ailesinin tip türünü oluşturmaktadır. Çiçek hastalığının bertaraf edilmesi yine bu virüsün aşı olarak geliştirilmesi sonucu Dünya Sağlık Örgütü tarafından gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ökaryotik hücrelerdeki DNA replikasyonunun ve transkripsiyonunun anlaşılması için model organizma olarak kullanılmaktadır.

1.3. Entomopoksvirüsler

İlk olarak 1963 yılında Vago tarafından tanımlanan entomopoksvirüsler (EPV) omurgalılarda hastalık oluşturan veya biyolojik silah olarak kullanıma potansiyeli olan poksvirüslere benzerliklerinden dolayı, poksvirüslerin genom organizasyonlarının anlaşılması için iyi bir örnek olarak kullanılmaktadırlar (Henderson vd., 1999). Ayrıca, entomopoksvirüsler iyi bir gen transfer ve gen terapi vektörü olarak kullanıma potansiyeline sahiptirler (Bawden vd., 2000; Sezen ve Demirbag 2005). Diğer yandan, böcek virüslerinin tıbbi, zirai ve endüstriyel bakımdan önemli olan proteinlerin üretildiği gen ifade vektörü olarak kullanıma potansiyelleri, biyoteknolojide önemli bir yer

oluşturur. Böcek virüsleri uzun zamandan beri gelişmiş ülkelerde tarım ve ormancılıkta zarar oluşturan böceklerle karşı önemli bir biyolojik kontrol materyali olarak kullanılmaktadırlar (Sezen ve Demirbag 2005; Arif ve Kurtsak, 1991).

Yapılan çalışmalar sonucunda Orhoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Diptera ve Hymenoptera takımlarına ait böceklerden birçok entomopoksvirüs izole edilmiştir. Genom dizileme çalışmaları sonucunda birçok poksvirüsün yapısı aydınlatılmış olmasına rağmen, entomopoksvirüs ailesi üyelerinin kültüre edilmesindeki zorluklar gibi özelliklerinden dolayı çok azının genom haritası çıkartılmıştır. Genom dizisi tamamlanmış entomopoksvirüsler Tablo 1’de listelenmiştir.

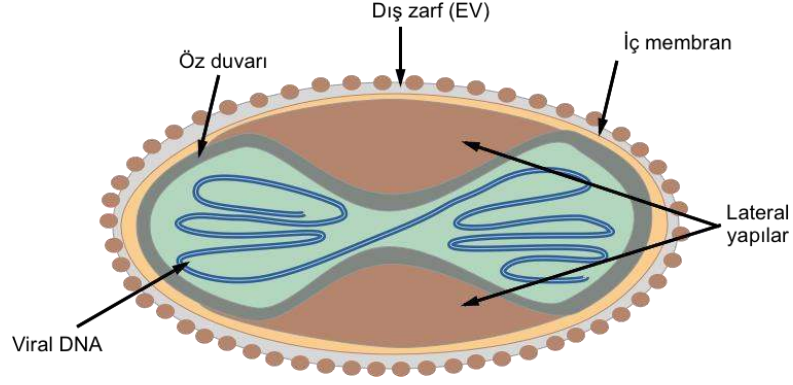
Tablo 1. Genom dizisi tamamlanmış entomopoksvirüsler.

Genom	Büyüklik (bp)	ORF Sayısı	GC içeriği	Dizi No
<i>Melanoplus sanguinipes</i> <i>entomopoxvirus</i>	236,120	267	18.3	NC_001993
<i>Amsacta moorei</i> <i>entomopoxvirus</i> “L”	232,392	292	17.8	NC_002520
<i>Adoxophyes honmai</i> <i>entomopoxvirus</i> “L”	228,750	247	21	HF679131
<i>Choristoneura biennis</i> <i>entomopoxvirus</i> “L”	307,691	334	19.7	HF679132
<i>Choristoneura rosaceana</i> <i>entomopoxvirus</i> “L”	282,895	296	19.5	HF679133
<i>Mythimna separata</i> <i>entomopoxvirus</i> “L”	281,182	306	19.7	HF679134
<i>Anomala cuprea</i> <i>entomopoxvirus</i>	245,717	263	20	AP013055

Theze vd. 2013’ den düzenlenmiştir.

1.3.1. Entomopoksvirüslerin Genel Özellikleri

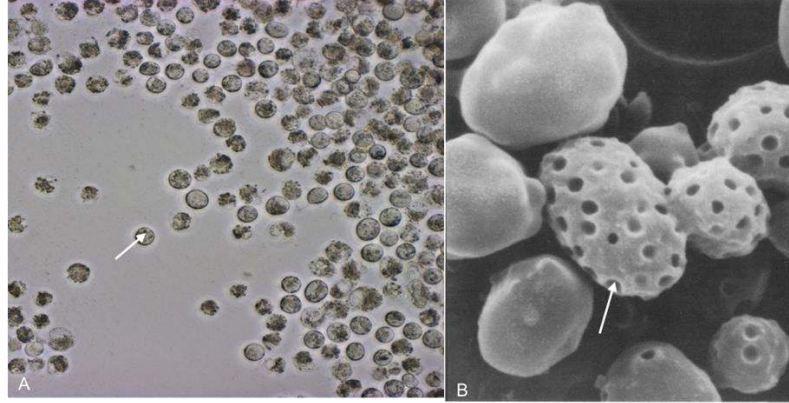
Entomopoksvirüs virionları oval şekilli 150-470 nm uzunluğunda ve 165-300 nm genişliğindedir (Sezen ve Demirbag 2005). Tipik bir entomopoksvirüs viryonu Şekil 2’de şematize edilmiştir. Kompleks yapıya sahip olan entomopoksvirüsler, çift zincirli DNA genom içeren bir merkezi bölge, bunu saran ve dışı proteinlerle kaplı olan bir iç zar, iki yanda bulunan lateral (yanal) yapılar ve son olarak bunu çevreleyen bir dış zardan oluşmaktadır.



Şekil 2. Tipik bir entomopoksvirüsün şematik görünümü.

1.3.2. Entomopoksvirüslerde Sferoid Yapısı

Enfeksiyon mekanizmasının anlaşılması için yapılan çalışmalar entomopoksvirüsün bakülovirüslerde olduğu gibi gömülü bir yapı oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. Sferoid (Şekil 3) adı verilen bu yapı sferoidin (*sph*) adlı *geç* gen sınıfına ait bir gen tarafından kodlanan 100-115 kDa'luk sferoidin adında bir proteinden oluşmaktadır.



Şekil 3. *Amsacta moorei* entomopoxvirus (AMEV) sferoid yapıları. Sferoid yapıları okla gösterilmiştir. A) Ld652 hücrelerinde üretilmiş AMEV sferoidler, B) Tarama elektron mikroskopisi ile görüntülenmiş AMEV sferoid yapıları (Hall ve Moyer 1991)

Bakülovirüslerde gömülü yapılar hem sitoplazmada hem de nükleusta görülebilmeye karşın, AMEV'de sferoidler sadece sitoplazmada görülmektedir. Sferoidlerin yanı sıra bazı entomopoksvirüslerde fusolin proteininden türev alan spindil adı

verilen ikinci bir yapı görülmektedir (Gauthier vd., 1995). Bu yapı alfa ve betaentomopoksvirüslerde bulunmasına rağmen AMEV’de bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda AMEV sferoid geninin *in vitro* enfeksiyon için zorunlu olmadığı belirlenmiş ve virüs genomunda sferoidin geni yerine GFP proteini üreten gen (*gfp*) homolog rekombinasyon ile eklenerek rekombinant virüs geliştirilmiştir (Perera vd., 2010). Oluşturulan bu rekombinant virüsün (Am Δ sph/*gfp*) hücre kültürlerindeki replikasyonunun yaban tip virüsün (AMEV) replikasyonundan farksız olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma entomopoksvirüslerin enfeksiyonunun floresan ışık altında incelenebilir olmasını sağlamış ve bunun yanı sıra başka rekombinant entomopoksvirüslerin oluşturulmasının önünü açmıştır.

1.3.3. *Amsacta moorei entomopoxvirus*

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) Poxviridae familyasına bağlı olan Entomopoxvirinae alt familyasına ait bir böcek virüsüdür. Zirai öneme sahip böceklerde enfeksiyona neden olan AMEV, Betaentomopoxvirus cinsinin tip türüdür. AMEV adını, izole edildiği ve doğal konağı olan böceğin adından (*Amsacta moorei*) almaktadır (Roberts ve Granados 1968). Virüsün gen ifade vektörü, gen terapi vektörü ve biyopestisit olarak kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir (Sezen ve Demirbag 2005). Ayrıca bu virüs kullanılarak geliştirilen entomopoksvirüs gen ifade sistemi 1998 yılında Moyer ve arkadaşları tarafından Amerika Patent Enstitüsünce patentlenmiştir (Patent no: 5,721,352).

Bu virüs birçok entomopoksvirüsün aksine hücre kültürlerine (*Lymantria dispar* – Ld652 (Winter vd., 1995); *Estigmene acrea*- EAA-BTI (Granados ve Naughton 1975; Marlow vd., 1993) kolayca adapte olabilmekte ve kolayca rekombinasyon yapılabilir. 2000 yılında tüm genom dizi analizinin yapılmasıyla, genomunun yaklaşık 232 kb büyüklüğüne sahip olduğu ve 60 aminoasitten daha büyük polipeptid zinciri kodlayan 294 açık okuma zinciri (ORF) içerdiği gösterilmiştir (Bawden vd., 2000). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise Guo ve Yu AMEV DNA dizi verilerinden yola çıkarak protein kodlayan ORF’leri yeniden tanımlamış ve 256 ORF’nin aktif protein kodladığını belirtmiştir (Guo ve Yu 2007).

1.3.4. *Amsacta moorei entomopoxvirus*'ün Transkripsiyon Özellikleri

Chordopoksvirüsler ile yapılan çalışmalarda genlerinin *erken*, *ara* ve *geç* genlerden oluşan 3 farklı sınıfta ifade edildikleri tespit edilmiştir (Broyles 2003). İfade edilmeleri için protein sentezine ve DNA replikasyonuna ihtiyaç duymayan genler *erken* genler, DNA replikasyonuna ihtiyaç duymayıp sadece protein sentezine ihtiyaç duyan genler *ara* genler ve hem protein sentezine hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duyan genler *geç* genler olarak ifade edilmektedirler.

AMEV'in tüm genom analizinin yapıldığı çalışmada, translasyon başlangıç kodonunun öncesinde 100 baz civarında TGAAAXXXA motifine sahip genler *erken* gen; TGAATXXXXA motifine sahip genler ise *potansiyel erken* gen olarak sınıflandırılmışlardır (Bawden vd., 2000). Bu motifler AMEV timidin kinaz, *Choristoneura biennis entomopoxvirus*'ün (CBEV) DNA polimeraz geni ve *Melolontha melolontha entomopoxvirus*'ün (MMEV) *fusolin* geni gibi entomopoksvirüslerin bilinen erken genlerinin yukarı bölgelerinde bulunmaktadır.

Bawden ve arkadaşları (2000) aynı çalışmada translasyon başlangıç bölgesinde TAAATG motifine sahip genleri *geç* gen; başlangıç kodonunun öncesinde 100 baz civarında TAAAT ve TAAAAT motifi içeren genleri ise *potansiyel geç* gen olarak sınıflandırmış ve bu motiflerin diğer entomopoksvirüslerde de korunmuş olduğunu belirtmişlerdir.

2014 yılına kadar yapılan çalışmalarda, *Amsacta moorei entomopoxvirus* için *ara* gen sınıfına ait açık okuma zincirlerinden bahsedilmemektedir. Ancak, *amv133* ORF'si tarafından kodlanan *lipaz* geninin DNA sentez inhibitörü (sitozin β -D-arabinofuranosit, Ara-C) varlığında transkriptlenmeye devam etmesine rağmen, protein sentez inhibitörü sikloheksimid (CHX) varlığında transkriptlenemediğinin belirlenmesiyle *lipaz* geninin *ara* gen sınıfına ait bir gen olduğu belirlenmiştir (Ozsahin vd., 2014).

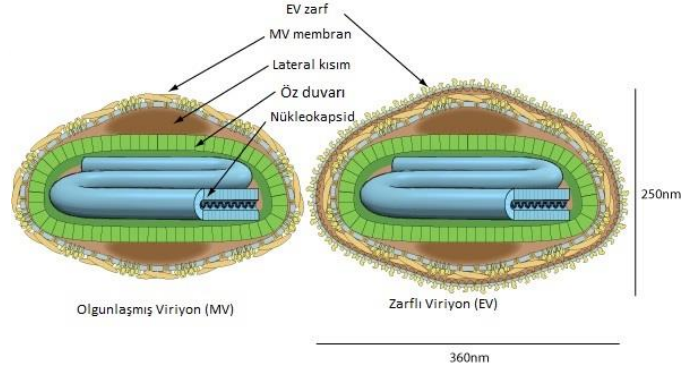
Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, *sferoidin* (Palmer vd., 1995; Winter vd., 1995; Marlow vd., 1998b), *timidin kinaz* (Gruidl vd., 1992), *entomopoksvirüs filament-ilişkili geç protein FALPE* (Alaoui-Ismaili ve Richardson 1996; Alaoui-Ismaili ve Richardson 1998), *NAD⁺ ilişkili DNA-ligaz* (Sriskanda vd., 2001), *DNA topoizomerez* (Petersen vd., 1997), *süperoksid dismutaz SOD* (Becker vd., 2004), *apoptoz inhibitor protein iap* (Li vd., 2005a; Li vd., 2005b), *p33* (Means vd., 2007), *poli A polimeraz* (Becker vd., 2008), *protein kinaz* (Muratoğlu vd., 2010), *fotoliyaz* (Nalcacioglu vd., 2010)

ve *esteraz* (Ozsahin vd., 2014; Özsahin vd., 2015) genleri fonksiyonel ve transkripsiyonel olarak araştırılmıştır. Ayrıca 2016 yılında yapılan yeni bir çalışmada *protein kinaz* geni yerine gfp proteini koyularak oluşturulan rekombinant virüs ile tüm genom gen ifadesi mikrodizin analizi ile karşılaştırılmıştır (Muratoglu vd., 2016).

1.3.5. *Amsacta moorei entomopoxvirus*'un Hücreye Girişi

Entomopoksvirüslerin hücreye girişi konusunda literatürde bir bilgi bulunmamakla birlikte, moleküler özellikleri ile birbirine çok fazla benzerlik sergileyen başka poksvirüslerle ilgili detaylı bilgiler bulunmaktadır. Konuya açıklık getirmesi bakımından farklı poksvirüslerin hücreye giriş mekanizmasının anlaşılmasına yönelik bu bilgiler aşağıda irdelenmiştir.

Poksvirüsler iki farklı enfektif form içermektedir. Bunlar tek dış membrana sahip olgunlaşmış viriyon (MV) ve çift dış membrana sahip zarflı viriyondur (EV) (Şekil 4). Bunun yanı sıra bu iki form arasında geçiş formu olarak adlandırılabilen sarmallanmış viriyon adı verilen bir viriyon formu da bulunmaktadır.

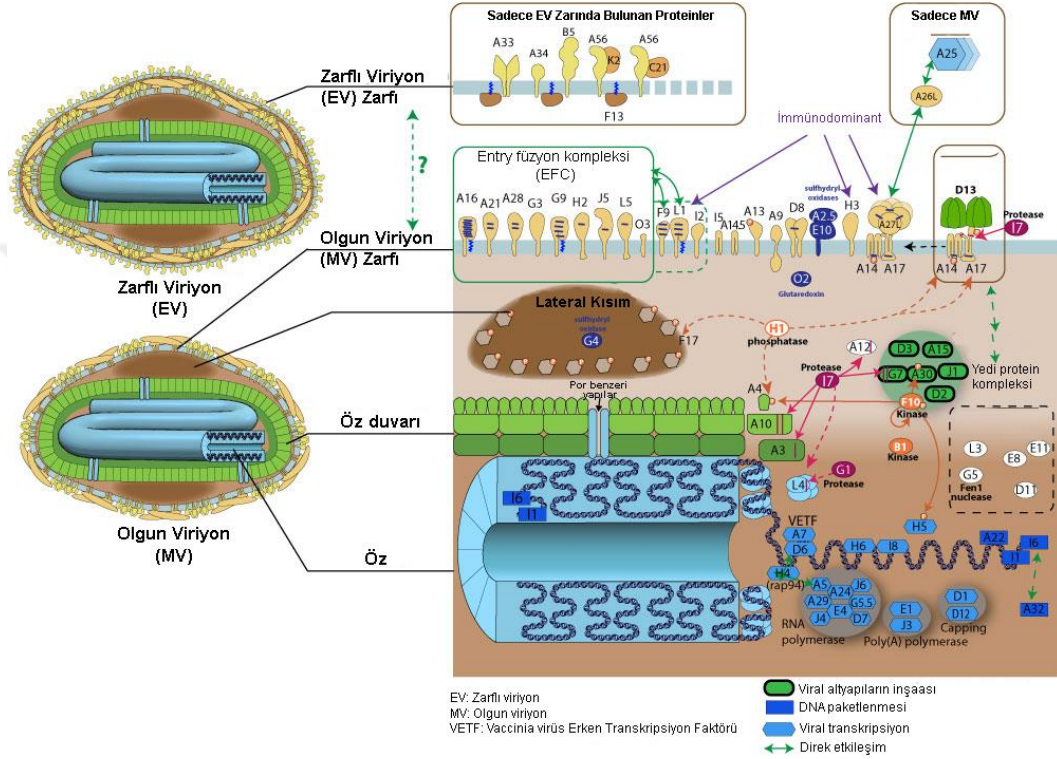


Şekil 4. Poksvirüslere ait viriyon tipleri. (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir URL-1)

Yapılan çalışmalarda MV'nin iki lateral kısım, çift zincir DNA genomu içeren viral öz ve en az 25 protein içeren lipid bilayer zardan oluştuğu; EV'nin ise bu proteinlere ek olarak 6 proteine ve bir ekstra viral zara sahip olduğu gösterilmiştir (Schmidt vd., 2012; Moss 2012). MV membran yapısının endoplazmik retikulum zarının viral proteinler ile modifikasyonu sonucu oluşmuş olabileceği öne sürülmektedir (Moss 2015).

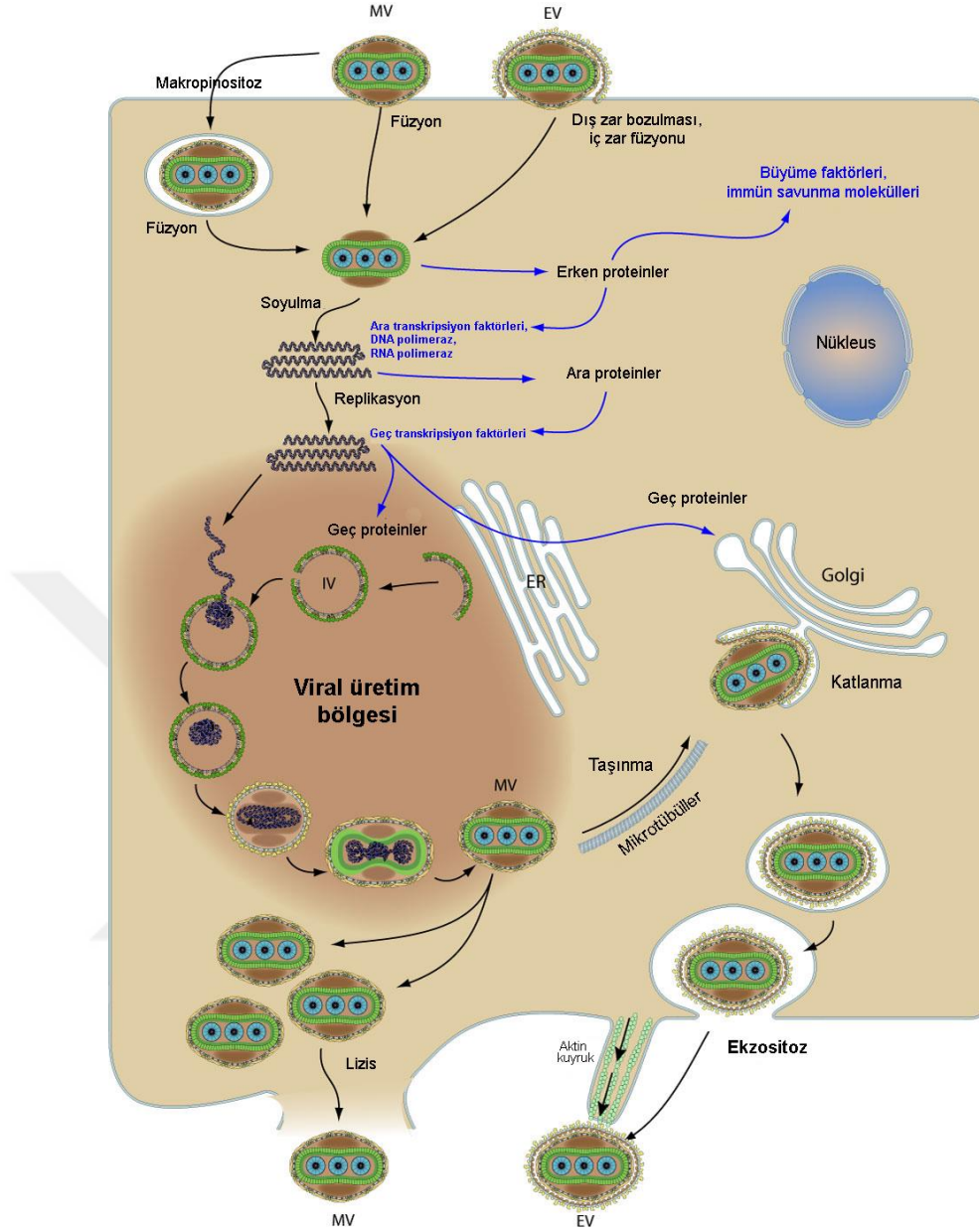
MV ve EV'lerin yüzey proteinleri farklılık göstermektedir ve bu da farklı reseptörler aracılığıyla konağa bağlanma gösterdiklerini ve farklı seçicilik içerdiklerini göstermektedir. Yapılan biyokimyasal, floresan ve mikroskopik çalışmalar sadece MV

membranının plazma membranı ile füzyon yaptığını göstermiştir. MV'lerin daha kararlı olduğu ve konak organizmalar arasında bulaşmada rol oynadığı düşünülmektedir. EV'lerin ise daha kırılgan bir yapıya sahip ve daha çok konağın hücreleri arasındaki yayılımla ilişkili olduğu ve antikorlara daha dayanıklı oldukları belirtilmektedir (Moss 2016). VACV yapısal proteinlerinin viral yapılara göre dağılımı ve belirlenmiş etkileşimleri Şekil 5'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5. Vaksinya virüs viriyon yapıları ve yapısal proteinleri. Harf ve rakamlar proteinleri kodlayan açık okuma zincirlerin kodlarını göstermektedir. (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir, URL-2).

Poksvirüslerin hücreye giriş mekanizmasının aydınlatılması için yapılan çalışmalar genel olarak *Vaccinia virus* model olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Henüz entomopoksvirüslerin hücreye girişi konusunda literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Zarflı virüslerin hücreye girişi altı adımda özetlenmiştir. Bunlar sırasıyla; tutunma, hücre yüzey hareketi, sinyalizasyon, giriş, hücre içi taşınım ve membran penetrasyonudur (Schmidt vd., 2012). Temel olarak *Vaccinia virus* enfeksiyon mekanizması Şekil 6'da özetlenmiştir.



Şekil 6. Vaksinya virus enfeksiyon mekanizması. (Swiss Institute of Bioinformatics'den düzenlenmiştir URL-3)

Hücreye girişin ilk adımını tutunma oluşturmaktadır. Bu adım vaksinya virüslerin hem MV hem de EV olmak üzere iki farklı form içermesinden dolayı farklılık göstermektedir. MV'lerin tutunması göz önüne alındığında glikozaminoglikanlar (GAG) ve diğer hücre yüzey moleküllerinin varlığına ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalarda hedeflenen GAG'ların hücre tipine, virüs çeşidine ve deneysel çalışmalara göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Moss 2016).

EV'lerin hücreye füzyonu, ya plazma membranına direk füzyon ile ya da endositoz ile alınımıyla gerçekleşmektedir (Schmidt vd., 2012). Bu tip füzyon öncelikle EV'lerin sahip olduğu ikinci zar yapısının bozulması ve ardından MV hücre giriş mekanizması benzeri bir şekilde füzyon oluşumu ile olmaktadır. Bu bozulmanın EV dış membran glikoproteinleri A34 ve B5'in hücre yüzey glikozaminoglikanlarıyla etkileşimi sonucu olduğu belirlenmiştir (Law vd., 2006). Endositoz ile alım, hücrenin kendi elemanlarınca virüsün taşınmasını içerdiği için virüslerin hücresel savunmadan korunmasında birçok avantaj sağlamaktadır. Bu giriş makropinositoz adı verilen; hücre membrandaki aktin yapısında düzenlemeler sonucu hücreye yüksek miktarda sıvı alınımına yol açan bir mekanizma ile olmaktadır.

Vaksinya virüs hücre tutunma çalışmaları ve enfeksiyonunun takibi daha çok MV'ler ile yapılan çalışmalar sonucu aydınlatılmıştır. MV'lerin hücreye girişi konak hücre tipine bağlı olarak plazma membranından nötral pH varlığında ya da düşük pH-bağımlı endositik yolla gerçekleşmektedir. Viral A27 ve H3 proteinlerinin heparan sülfat ile ve D8 proteininin ise kondroitin sülfat ile bağlandığı belirlenmiştir. Bir diğer tutunma proteini olan A26'nın ise GAG'lara bağlanmadığı, ekstraselüler matriks glikoproteinlerinden laminin ile etkileşimde olduğu belirtilmiştir (Schmidt vd., 2012; Moss 2012).

Hücre tutunmasının ardından, giriş füzyon kompleksi (EFC) olarak adlandırılan bir kompleks tarafından virüsün konak hücre sitoplazmasına girdiği düşünülmektedir. Bu kompleks A16, A21, A28, F9, G3, G9, H2, J5 ve L1, L5 ve O3 proteinlerinden oluşmaktadır. Viral tutunma proteinlerinden A27, D8 ve H3'ün EFC üyelerinden ise A28 ve L1'in antikorlarca hedeflenmesinin viral enfeksiyonda azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Tablo 2'de poksvirüs tutunma ve giriş proteinleri ve özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2. Poksvirüs tutunma ve giriş proteinleri.

Protein	kDa	TM	İfade sınıfı	Korunmuşluk	Özellik
Tutunma Proteinleri					
A26	58		Geç	-	Laminine bağlanma, A27 ile etkileşim
A27	13		Ara	-	Heparan bağlanma, A17 ile etkileşim, N
D8	35	N uç	Ara	-	Kondroitin ile bağlanma N
H3	38	C uç	Ara	P	Heparan bağlanma, N
Giriş Proteinleri					
A16	43	C uç	Ara	P	EFC, paralog G9,J5, G9'a bağlanma, C-C
A21	14	N uç	Geç	P	EFC, C-C
A28	16	N uç	Geç	P	EFC, N, H2'ye bağlanma, C-C
F9	24	C uç	Geç	P	EFC ilişkili, C-C
G3	13	N uç	Geç	P	EFC, L5'e bağlanma
G9	39	C uç	Geç	P	EFC, paralog A16,J5; A16'ya bağlanma C-C
H2	22	N uç	Geç	P	EFC, A28'e bağlanma, C-C
I2	8	C uç	Geç	C	EFC?
J5	15	C uç	Geç	P	EFC, paralog A16,G9, C-C
L1	27	C uç	Geç	P	EFC ilişkili, N, C-C, Myr
L5	15	C uç	Geç	P	EFC, G3'e bağlanma, C-C
O3	4	N uç	Ara	C	EFC

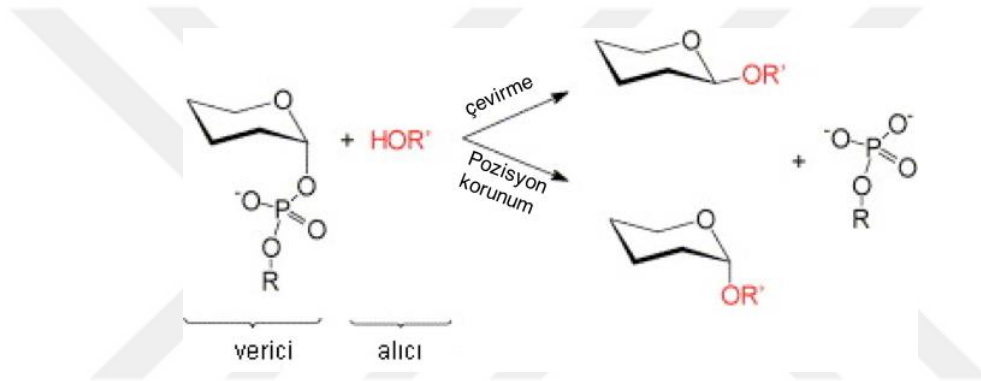
* TM: N yada C uçta transmembran domeini içermesi; Korunmuşluk: P (Tüm Poksvirüslerde), C (Kordopoksvirüslerde); EFC: Giriş Füzyon Kompleksi, C-C: moleküller arası disülfid bağları, Myr: miristilasyon bölgesi içeren, N: Nötralizasyon antikoru için hedef (Moss 2012)

Entomopoksvirüslerin hücreye girişi konusunda literatürde henüz daha bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biyoinformatik analizler sonucunda, *amv248* kodlu ORF'nin AMEV virüs genomunun 204830-205699 bazları arasında bulunan ve 289 aminoasit kodlayan bir gen olduğu belirlenmiştir. Bu genin ürününün glikozil transferaz etkisine sahip olan *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus* (MSEV, MSV206, GenBank No: AF063866), variola virüs (P35, GenBank No: P33059) ve vaksinya virüs (H3, GenBank No: P07240) genlerine benzer olduğu ileri sürülmüştür (Bawden vd., 2000). Vaksinya virüs tutunma proteinlerinden H3'e benzemesi ve bu proteinin Entomopoksvirüslerde korunmuş tek tutunma proteini olması *amv248* geninin AMEV'in konak hücreye girişi için kilit rol oynadığını düşündürmektedir.

1.4. Glikozil Transferazlar

Genomik, transkriptomik ve proteomik alanlarındaki gelişmeler “glikomik” adı verilen yeni bir alanın doğmasına yol açmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar sakkaritlerin glikoproteinlere bağlanıp saflaştırılmalarını zorlaştıran yapılar olduğunu ve proteinler kadar önemli olabilecek fonksiyonel ve yapısal birçok görev alabilecek moleküller olduğunu göstermiştir (Markine-Goriaynoff vd., 2004). Glikozil transferazlar (GT) şeker yapıların aktif verici moleküllerden özel alıcı moleküllere transferini gerçekleştiren enzimlerdir. GT’lerin çalışma prensibi Şekil 7’de özetlenmiştir.



Şekil 7. Glikozil transferaz enzimlerinin çalışma prensibi. (Coutinho vd., 2003’den düzenlenmiştir).

1997 yılında yapılan bir çalışma sonucunda 27 glikozil transferaz ailesi tanımlanmış (Campbell vd., 1997) daha sonra 2003 yılında 7 binden fazla glikozil transferaz geni için yapılan yeni bir çalışmada GT’ların 65 aileden oluştuğu belirlenmiştir (Coutinho vd., 2003).

1.4.1. Viral Glikozil Transferazlar

Virüslerin konak hücre glikomunu iki farklı yönde etkilediği ileri sürülmektedir. Bu yolların biri virüsün konak glikozil transferazlarının ifadesini uyarmaktır. Örneğin insan T-hücre lösemi virüsü (HTLV-1) hücresel fukozil transferaz VII’nin ifadesini aktifleyerek enfekte hücrelerin yüzeyinde bazı değişikliklere yol açarlar (Cebulla vd., 2000; Hiraiwa

vd., 2003). Bir diğer yol ise virüslerin kendi glikozil transferazlarını kullanarak hücre glikomunu etkilemesidir. Bu yolla virüsler konak antiviral mekanizmalarından gizlenebilmektedir.

Örneğin bakteriyofajlar sentezledikleri alfa ve beta glikozil transferazlar ile kendi DNA'larını konak restriksiyon endonükleazlarına karşı dirençli hale getirebilmektedir. Ayrıca bazı virüsler glikozil transferazları sayesinde konak metabolizmasına etki edebilme özelliğine sahiptirler. Bakülovirüslerin çoğu, ekdisteroid glikozil transferaz adlı bir protein sentezleyerek bu sayede konağın deri değiştirmesini ve pupaya girmesini engellemektedir. Ekdisteroidler larval dönemde instarlar arası geçiş sırasında ve pupaya geçişte hemolenfe salınarak görev alan önemli bir hormondur. Bakülovirüs enfeksiyonlarında karakteristik belirtilerden biri instarlar arası geçiş ve pupaya girişin önlenmesidir. O'Reilly ve Miller (1989) *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) ile yaptıkları bir çalışmada, bu belirtilerin ekdisteroid UDP-glukoz transferaz (EGT) adı verilen bir protein tarafından gerçekleştirildiğini göstermişlerdir (O'Reilly ve Miller 1989). Enfeksiyon sırasında enfekte hücrelerden hemolenfe EGT proteini salındığı görülmektedir. Daha sonra bu protein ekdisteroid hormonuna glukoz ya da galaktoz ekleyerek biyolojik fonksiyonunu işlevsiz hale getirmektedir (Subrahmanyam ve Ramakrishnan 1981; Dougherty vd., 1987; O'Reilly ve Miller 1989, 1990; Burand ve Park 1992; O'Reilly 1995; Markine-Goriaynoff vd., 2004).

Birçok lepidopteran larvası pupaya girmeden önce bitkiden ayrılarak toprağa doğru yönelim gösterirler. EGT ifade eden bakülovirüsler ile enfekte larvalarda ise deri değişimi ve pupaya giriş engellendiğinden larva bitki üzerinde kalmaya devam etmekte ve bu sayede bakülovirüs inklüzyon yapıları (OB) yeni böceklere bulaşabilmektedir (O'Reilly 1995).

1.4.2. Entomopoksvirüs Glikozil Transferaz Proteinleri

Entomopoksvirüsler ile yapılan genom dizileme çalışmaları sonucunda *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*'ün (MSEV) *msv206* ve *Amsacta moorei entomopoxvirus*'ün (AMEV) *amv248* açık okuma zincirlerinin muhtemel bir glikozil transferaz kodladığı ileri sürülmüştür (Markine-Goriaynoff vd., 2004). *amv248*'in DNA dizi analizi yapıldığında glikozil transferaz ailesine ait korunmuş DNA dizi bölgelerini içerdiği görülmektedir. Bu aile üyelerinin lipopolisakkarit biyosentezinde görev aldığı ve lipopolisakkarit zincirlerine çeşitli şekerlerin bağlanmasını katalizlediği bilinmektedir.

Bununla birlikte AMV248'in homoloji analizleri sonucunda vaksinya virüs (VACV) *h3l* gen ürünü ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu gen tüm poksvirüsler içerisinde korunmuş olmakta ve heparin bağlanma proteinini kodlamaktadır. Vaksinya virüs-konak hücre tutunma mekanizmasında rolü daha önceki çalışmalarda aydınlatılmıştır (Lin vd., 2000; da Fonseca vd., 2000). Hem antikorlarca hedeflenebilir bir molekül olması, hem *h3l* genini taşımayan mutant virüslerin enfektivitesinin düşmesi ve morfolojik değişimlere yol açması, bu proteinin oluşturulabilecek yeni bir antipoksivirüs aşısı için önemli olduğunu düşündürmektedir. Bu amaçla 2016 yılında H3 proteininin 3 boyutlu yapısı aydınlatılmış, glikozil transferaz özelliği sergilediği ve UDP-Glukoza bağlandığı gösterilmiştir (Singh vd., 2016).

Tüm bu veriler entomopoksivirüslerde H3 proteininin homoloğu olduğu bilinen ve ayrıca korunmuş tek tutunma proteini olduğu varsayılan AMV248 proteininin önemini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte halen literatürde entomopoksivirüs glikozil transferazları ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.5. Tezin Amacı

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) lepidopteran larvalarında enfeksiyon yaptığı bilinen, hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen ve değiştirilebilen, gen ifade vektörü ve biyopestisit olarak kullanılma potansiyeline sahip bir böcek virüsüdür. Betaentomopoksivirüs cinsinin tip türü olan AMEV'in tüm genom dizisi 2000 yılında belirlenmiştir (Bawden vd., 2000).

AMEV'in içerdiği 256 açık okuma zinciri (ORF) incelendiğinde, *amv248* geninin muhtemel glikozil transferaz proteini kodladığı ileri sürülmüştür. Bu gen ürünü proteinin vaksinya virüs konak hücre tutunmasında rol alan ve heparan sülfata bağlandığı bilinen H3 proteini ile benzer olduğu görülmektedir. Ayrıca vaksinya virüste viral tutunmadan sorumlu dört farklı protein olmasına rağmen entomopoksivirüslerde sadece bir tanesinin korunmuş olduğu görülmektedir. Bu durum AMV248 proteininin AMEV enfeksiyonu için kritik bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Literatürde *amv248* geni ve entomopoksivirüslerin hücreye giriş mekanizması ile ilgili henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada virüsün konak seçiciliğinde ve konak hücreye tutunmasında rol oynadığı ve virüs replikasyonun başlaması için zorunlu olduğu varsayılan ve bir yapısal proteini kodladığı düşünülen *amv248* kodlu genin yapısı ve virüsün konağa tutunmasındaki rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak *amv248* geninin transkripsiyon özellikleri ve yapısı tahmin edilmiş, biyoinformatik analizle proteinin üç boyutlu yapısını belirlenerek konak hücre tutunma motifleri tahmin edilmiştir. Bakülovirüs vektör sisteminde gene ait rekombinant protein üretilmiş ve AMV248 rekombinant protein ile hücre yüzey matriks materyali olan glikozaminoglikanlarının (GAG) etkileşme özelliği belirlenmiştir. Ayrıca bu rekombinant proteine özgü antikor sentezlettirilmiş bu antikor kullanılarak rekombinant yapısal proteinin immün-nötralizasyonunun virüs tutunmasına etkisi ve virüsün hücre yüzeyine bağlanma özellikleri araştırılmıştır. *amv248* kodlu gen AMEV genomundan homolog rekombinasyon ile silinerek rekombinant virüs oluşturulmuş ve oluşturulan rekombinant virüsün replikasyonu yaban tip ve sferoidin mutant virüsün replikasyonu ile karşılaştırılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Hücre Kültürü ve Virüs

Dr. Basil M. Arif'ten (Great Lakes Forestry Centre, Sault Ste Marie, ON P6A 2E5, Kanada) temin edilmiş olan *Lymantria dispar* böceğinden geliştirilmiş Ld652 böcek hücre kültürü 28 °C'ye ayarlanmış etüvde %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma, Kat No: F-0643) katkılı besiyeride (%45 Grace's Insect Medium, GIBCO, Kat No: 11605-045, %45 Excell-400 Medium) özel hücre kültürü kapları (Corning) içerisinde büyütülerek enfeksiyona hazır hale getirildi (Muratoğlu vd., 2010).

Dr. R. W. Moyer'den (Tıp Fakültesi, Moleküler Genetik ve Mikrobiyoloji Bölümü, Florida Üniversitesi, ABD) temin edilen yaban tip *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) Ld652 hücre kültürünü enfekte etmek için kullanıldı.

Bazı deneylerde virüs replikasyonunu kolay takip edebilmek için AmΔsph/gfp adlı daha önceden geliştirilmiş (Palmer vd., 1995) ve Dr. Richard W. Moyer'den (Tıp Fakültesi, Moleküler Genetik ve Mikrobiyoloji Bölümü, Florida Üniversitesi, ABD) temin edilmiş olan sferoidin geni yerine yeşil floresan (*gfp*) geni taşıyan rekombinant virüs kullanıldı. Sferoidin geninin eksikliği, gen ürünü protein sadece dış ortam şartlarında virüs parçacıklarının korunmasından sorumlu olduğu için, virüsün hücre kültüründe replikasyonuna herhangi bir olumsuz etki oluşturmamaktadır (Palmer vd., 1995). Ayrıca bu gen yerine eklenmiş olan GFP proteini, enfeksiyon belirtilerini kolay izlenebilir yapmaktadır.

2.2. Kullanılan Virüslerin Hücre Kültüründe Çoğaltılmaları ve Konsantrasyonlarının Tayini

Deneye başlarken, tüm deney boyunca kullanılmak üzere, virüslerin çalışma stoklarının hazırlanması önemlidir. Ayrıca, hazırlanan bu virüs stokunun konsantrasyonunun bilinmesi ve böylece her bir deney sırasında kullanılacak virüs konsantrasyonunun önceden bilinmesi, çalışmanın sürdürülebilmesi bakımından büyük öneme sahiptir.

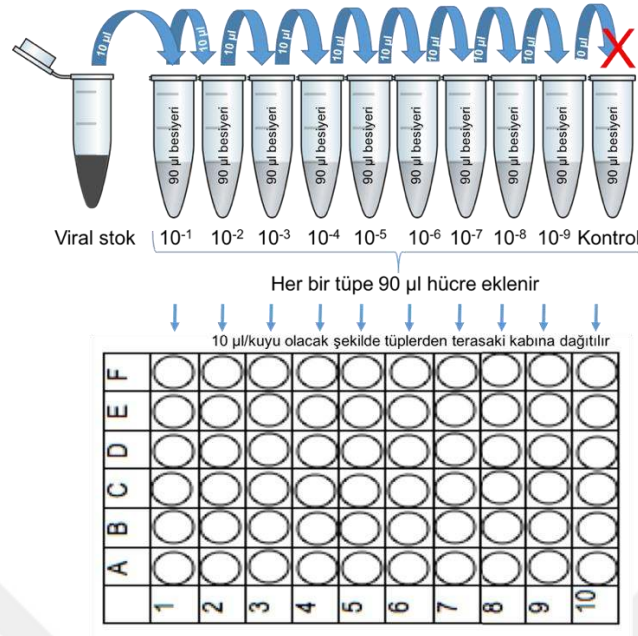
2.2.1. Virüsler ve Hücre Kültüründe Çoğaltılmaları

AMEV ve Am Δ sph/gfp'nin hücre kültüründe üretilmesi çalışmaları için, T-25'lik kültür kabına (flask) 1×10^6 olacak şekilde Ld652 hücreleri yerleştirildi (Muratoğlu vd., 2010). Hücreler, bir gece 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, 1 ml'lik enfeksiyon sıvısı hücre başına düşen enfeksiyon yapan virüs sayısı (MOI) 5 olacak şekilde hazırlandı. Enfeksiyon sıvısı, besiyerisi uzaklaştırılmış hücrelerin üzerine eklendi. İki saat hafif hızdaki (2,5 rpm) çalkalayıcıda virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. İki saatin sonunda, enfeksiyon sıvısı uzaklaştırılmadan, flaska 4 ml yeni besiyeri ilave edildi. Hücreler beş gün 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerde enfeksiyon belirtileri tespit edildikten sonra, virüsler hasat edildi. Bunun için, hücre-virüs süspansiyonu 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre parçalarının çökmesi sağlandı. Üsteki virüs süspansiyonu steril bir şişeye alınarak etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve 4 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.2.2. Çoğaltılan Virüslerin Konsantrasyonlarının Tayini

Elde edilmiş olan virüs süspansiyonunun konsantrasyonu son nokta seyreltme metoduyla (EPDA) belirlendi (Şekil 8) (Reed ve Hugo Muench 1938). Deneyin ilk aşamasında, 10 adet mikrosantrifüj tüpü, 1'den 10'a kadar numaralandırıldı. Virüs, 9. tüpe kadar büyüme besiyerisi içerisinde 1/10 oranında seyreltildi. 10. tüp, kontrol olarak kullanıldı ve buna sadece besiyeri bırakıldı. Bu arada 2×10^6 hücre/ml olarak süspansiyon haline getirilen Ld652 hücrelerinden, 10 tüpün her birine 90 μ l eklendi ve karıştırıldı. Yeni pipet ucu kullanarak, Terasaki kabının her satırına (A'dan F'ye doğru) aynı konsantrasyonda olacak şekilde, 10 μ l hücre-virüs karışımından eklendi. Virüssüz kuyudan (10. tüp) başlayarak, en yoğun virüs süspansiyonunun olduğu kuyuya (1. tüp) doğru bir sıra takip edildi. Terasaki kabının kapağı kapatılarak, ıslatılmış peçetelerle birlikte bir kutuya yerleştirildi ve 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyon belirtileri netleşinceye kadar (5 gün) inkübe edildi.



Şekil 8. Virüs konsantrasyon tayini.

2.3. *amv248* Geninin Yapısının ve Transkripsiyonunun Aydınlatılması

2.3.1. *amv248* Geninin Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi

AMEV'in Ld652 hücre kültüründe *amv248* transkriptlerini ürettiği zaman dilimini bulmak için, RT-PCR yöntemi uygulandı. Kontrol, 0, 3, 6, 12 ve 24 saatleri için olmak üzere altı gözlü kültür kabına hücre konsantrasyonu 1×10^6 olacak şekilde Ld652 hücreleri bırakıldı. İki saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp virüs süspansiyonu (MOI: 2) eklendi. Virüslerin hücreye tutunması için, iki saat hafif hızdaki (2.5 rpm) sallayıcıda bekletildi. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler katkısız besiyeriyle yıkanarak tutunmayan virüsler uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1,5 ml taze besiyeri eklendi. Bu zamanın, 0. saat olduğu kabul edildi ve bu saat için ayrılan gözdeki hücrelerden Trizol (Thermo) kimyasalı kullanılarak üretici firmanın talimat kitabı takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla besiyeri uzaklaştırılıp 1 ml trizol kimyasalı eklenerek hücreler parçalandı ve içerik $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı. Diğer gözlerde bulunan hücreler inkübasyona bırakıldı ve sırasıyla 3, 6, 12 ve 24 saat sonra bu gözlerdeki hücreler de trizol ile parçalanarak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

Tüm gruplar toplandıktan sonra tüpler oda sıcaklığına getirilip 5 dakika bekletildi ve ardından üzerlerine 0,2 ml kloroform eklenip alt üst edildi. Örnekler 12000 x g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilerek 3 faza ayrılması sağlandı. En üstteki RNA'ları içeren saydam faz daha sonra başka bir tüpe alındı. 0,5 ml izopropanol eklenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 x g'de + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilerek RNA çöktürüldü ve üst sıvı atıldı. Pellet 1 ml %75'lik etanol ile yıkandı ve vortekslenip ardından 7500 x g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülüp üst sıvı atılarak pellet hava ile kurutuldu. 20-50 µl RNazsız su kullanılarak pellet çözöldü. Ardından 60 °C'de 15 dakika bekletilip elde edilen RNA'ların konsantrasyonu nanodrop (Thermo 2000) ile belirlendi ve -80 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

amv248 geninin transkripsiyon zamanının belirlenmesi amacıyla PCR'da kullanılmak üzere izole edilen RNA'lardan 2 µg kullanılarak *amv248* genine özgü tasarlanan geri primer (AMV248R 5'-TGC ATT CTC CGC AAC ATC-3') yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her bir zaman dilimi için izole edilen RNA, AMV248R primer (10 nM), dNTP (10 mM) ve ddH₂O farklı mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı. Tüp ve içeriği, 65 °C'de 5 dakika bekletildi, buza bırakılarak soğutuldu ve içerisine 4 µl tampon (M-MuLV Reverse Transkriptaz enzimine ait 5X First strand buffer) ve 2 µl 0,1 M DTT karışımı eklendi. Son karışım 37 °C'de 2 dakika bekletildi. Daha sonra karışım üzerine 1 µl (200 U/µl) M-MuLV Reverse Transkriptaz (Invitrogen) enzimi ilave edildi. Önce 37 °C'de 50 dakika inkübe edilerek enzimin aktivitesi sağlandı. Sonra 70 °C'de 15 dakika inkübe edilerek enzimin inaktivasyonu sağlandı. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki PCR işlemi için kullanıldı.

PCR Karışımı:

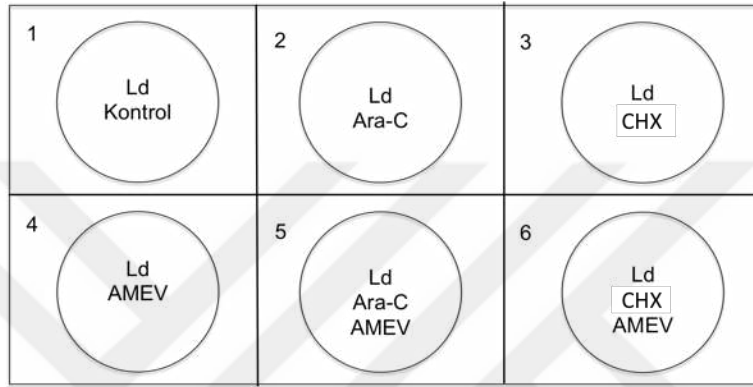
1 µl	Kalıp (cDNA)
1 µl	AMV248F (ileri primer)
1 µl	AMV248R (geri primer)
1 µl	dNTP
3 µl	MgCl ₂
10 µl	Tampon (5X)
32,5 µl	ddH ₂ O
0,5 µl	Taq DNA polimeraz

PCR Koşulları:

95 °C'de 3'	
95 °C'de 1'	} 35 döngü
56 °C'de 30''	
72 °C'de 1'	
72 °C'de 7'	
12 °C'de ∞	

2.3.2. *amv248* Geninin Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi

amv248 geninin ifade edildiği transkripsiyon sınıfını belirlemek için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Gen ifade sınıfını belirlemede özel olan inhibitörler Şekil 9'da gösterildiği gibi kültür gözlerine ilave edildi. DNA sentez inhibitörü olarak β -D-arabinofuranosilsitozin (Ara-C; Sigma), protein sentezi inhibitörü olarak sikloheksimid (CHX; Sigma) kullanıldı.



Şekil 9. *amv248*'in transkripsiyon sınıfının belirlenmesi. Ara-C DNA sentez inhibitörü, CHX protein sentez inhibitörü.

Deney başlatılırken, altı gözlü kaba her bir göze 1×10^6 Ld652 hücresi yerleştirildi. Yaklaşık iki saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı. Kabın 1 ve 4 nolu gözlerine sadece besiyeri, 2 ve 5 nolu gözlerine Ara-C (100 $\mu\text{g/ml}$) ve 3 ve 6 nolu gözlerine CHX (200 $\mu\text{g/ml}$) inhibitörleri eklenmiş besiyerinden 2'şer ml eklendi. Bir saat 28 °C'lik etüvde inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerinden sıvı alındı. Kabın 4, 5 ve 6 nolu gözlerine inhibitör içeren virüs süspansiyonu (MOI: 2) bırakıldı. Virüslerin hücreye tutunması için, iki saat hafif hızdaki çalkalayıcıda bekletildi. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve hücreler inhibitör içeriğine uygun 1'er ml besiyeri kullanılarak yıkandı. Hücrelerin üzerine inhibitör içeriğine uygun olarak 1,5 ml taze besiyeri eklendi. Kültür kabının kapağı kapatılıp, 28 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda trizol kimyasalı kullanılarak her bir gözden Bölüm 2.3.1'deki metoda göre RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu nanodrop (Thermo 2000) ile belirlendi.

İzole edilen RNA'lardan 2'şer µg kullanılarak Bölüm 2.3.1'de belirtilen metoda göre cDNA üretimi gerçekleştirildi ve elde edilen cDNA'lar daha sonra PCR reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı.

2.3.3. *amv248* Geninin Translasyona Uğramayan 5' ve 3' Bölgelerinin (5'/3' UTR) Belirlenmesi

Genlerin fiziksel yapısının tespit edilmesi için, bu genlerin proteine dönüşmeyen bölgelerinin tespit edilmesi gerekir. Böylece, protein ürününün oluşmasında katkı sağlayan mRNA'nın tam sırası belirlenebilir. *amv248* geninin yapısının aydınlatılması için translasyona uğramayan bölgelerinin belirlenmesi amacıyla aşağıdaki metotlar uygulandı.

2.3.3.1. *amv248* Geninin 5' ve 3' UTR Analizleri İçin Primerlerin Tasarlanması

Muhtemel glikozil transferaz geninin proteine dönüşmeyen 5' sırasını ve transkripsiyon *başlangıç* noktasını tespit edebilmek için, 5' cDNA uçlarının hızlı çoğaltılması (5'-RACE) tekniği kullanıldı. Aynı şekilde, muhtemel glikozil transferaz geninin proteine dönüşmeyen 3' sırasını ve transkripsiyon *bitiş* noktasını tespit edebilmek için de 3'-RACE tekniği uygulandı. Bu işlemler için genin 5' kısmına ait üç adet geri (reverse) primer (GTSP1, GTSP2, GTSP3) ve 3' kısmına ait iki adet ileri (forward) primer (GTSP5, GTSP6) sentez ettirildi (Tablo 3).

Tablo 3: Muhtemel glikozil transferaz geninin (*amv248*) transkripsiyona uğramayan bölgelerine ait primerler.

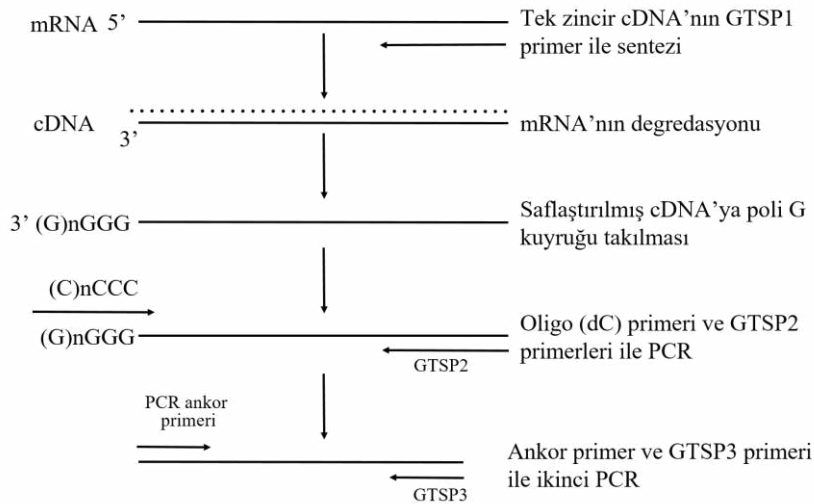
Primer	Primer Sırası (5' - 3')	Genomdaki Yeri
GTSP1-Rv	TGC ATT CTC CGC AAC ATC	205673– 205690
GTSP2-Rv	GTG ATG ACG CAC ATG CTA AA	205033 – 205052
GTSP3-Rv	CTG TCA GAA TTT CTT TTA ATT GTT	204856 – 204879
GTSP5-Fw	GCA TGT GCG TCA TCA CAT A	205037 – 205055
GTSP6-Fw	GTA GAT GTT GCG GAG	205670 – 205684
GTUTR1-Rv	CAA CAA AAA ACA ATA ATA TCA TTT ATC	205706 – 205732
GTUTR2-Rv	CAC AAT AAA AAA ATA TAC AAC AAA AAA	205723 – 205749
GTUTR3-Rv	GCA TTT TCA AAA ATT AAT TTA TCT AAA TAT AAT C	205784 – 205817

2.3.3.2. *amv248* Geninin 5' ve 3' UTR Analizleri İçin RNA İzolasyonu

Besiyeri (%10 FBS katkılı, %45 Excell-400, %45 Grace's Insect Medium) içerisinde süspanse edilmiş 1×10^6 Ld652 hücresi 1,5 ml hacim içerisinde, 6 gözlü hücre kültürü kabının her gözüne bırakıldı. Yaklaşık 10-12 saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra, hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp MOI:2 konsantrasyonunda AMEV süspanسیونu eklendi. Virüslerin hücreye tutunması için, iki saat hafif hızdaki sallayıcıda bekletildi. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler katkısız besiyeri ile iki kez yıkanarak tutunmayan virüsler uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1,5 ml taze besiyeri eklendi. Enfeksiyondan 12 saat sonra, AMEV ile enfekte olmuş hücrelerden, trizol kimyasalı ile Bölüm 2.3.1'deki metoda göre RNA izolasyonu yapıldı.

2.3.3.3. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 5' Ucunun Rastgele Çoğaltılması (5'-RACE)

amv248 geninin 5' ucuna uygun Tablo 3'de belirtilmiş olan geri (reverse) primerler kullanılarak, 5'-RACE kitinde (ROCHE, Kat No: 1 734 792) belirtilen kullanma talimatına göre deney planı oluşturuldu. AMEV genomu yüksek oranda AT bazı içerdiğinden dolayı kit içeriğindeki ankor primerin yanlış bağlanma ihtimalini önlemek için 3' uca poli T kuyruk yerine poli G kuyruk takıldı ve PCR için oligo-dT ankor primer yerine oligo-dC ankor primer kullanıldı. Şekil 11'de 5' RACE analizi toplu halde, şematik olarak anlatılmaktadır.



Şekil 10. *amv248* geninin 5' RACE analizi.

5' RACE analizinin ilk aşamasında, toplam RNA'dan GTSP1 primeri kullanılarak tek zincir cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bir tüpe;

cDNA sentez tamponu (tüp 1)	: 4 µl
Deoksinükleotit karışımı (tüp 3)	: 2 µl
GTSP1 primeri	: 1 µl (12 µM)
Toplam RNA	: 2 µg
Revers transkriptaz (tüp 2)	: 1 µl
H ₂ O	: 9 µl olmak üzere bırakıldı. Karışımın 55

°C'de 60 dk ve 65 °C'de de 10 dk bekletilmesi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA, PCR ürünü temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) kullanılarak temizlendi. Buna göre 20 µl hacimdeki cDNA'nın üzerine 100 µl bağlanma tamponu ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra karışım kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Ardından kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. cDNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 20 µl dH₂O ilave edildi ve 13.000 × g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu şekilde cDNA, tampon ve enzim gibi kimyasallardan temizlenmiş oldu.

Temizlenen cDNA'nın 3' ucuna terminal transferaz enzimi kullanılarak "poli G" kuyruğu takıldı. Bir tüpe;

Temizlenen cDNA örneği	: 19 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 2,5 µl
2 mM dGTP	: 2,5 µl karışımı bırakıldı ve karışım 94 °C'de

3 dk bekletildikten sonra hemen buz üzerine alındı. Üzerine 1 µl terminal transferaz (tüp 6, 10 ünite/µl) ilave edilip karıştırıldı ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından enzimi inaktive etmek için 70 °C'de 10 dk bekletildi.

Bu şekilde "poli G" kuyruğu takılmış cDNA, önce GTSP2 primeri sonra GTSP3 primeri kullanılarak birbirini takip eden iki ayrı PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Birinci PCR reaksiyonunda tüpe;

"Poli G" kuyruğu takılmış cDNA	: 5 µl
Oligo-dC ankor primeri	: 1 µl

GTSP2 primeri	: 1 µl (12 µM)
dNTP karışımı (tüp 3)	: 1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl
H ₂ O	: 36,5 µl karışımı bırakıldı ve PCR yapıldı.

PCR reaksiyonu 94 °C’de 3 dk’lık ilk denatürasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C’de 30 saniye, 50 °C’de 30 saniye ve 72 °C’de 1 dk bekletilerek gerçekleştirildi.

İkinci PCR reaksiyonunda ise yine bir tüpe;

Birinci PCR ürünü	: 1 µl
PCR-ankor primeri (tüp 9)	: 1 µl
GTSP3 primeri	: 1 µl (12 µM)
dNTP karışımı (tüp 3)	: 1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl
H ₂ O	: 40,5 µl karışımı bırakıldı ve aynı PCR

programına tabi tutuldu. Çoğaltılmış olan DNA molekülleri daha sonra klonlamada kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edildi.

2.3.3.4. *amv248* Geninin 5’ UTR’sine ait DNA’ların Analizi

Klonlama işlemleri için Bölüm 2.3.3.3’de anlatıldığı üzere oluşturulan DNA’lar Tablo 3’de belirtilen primerler ve belirtilen PCR koşulları uygulanarak çoğaltıldılar. Elde edilen DNA’lar %1’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra, jelden saflaştırıldı, pGEM-T Easy vektörüne ligasyonları yapıldı, oluşturulan *Escherichia coli* JM101 kompetent hücrelere transform edildi ve klon seçimleri yapıldı. Seçilen klonlar, restriksiyon ve dizi analiziyle teyit edildi.

- Elde edilen bantların jelden temizlenmesi

Elektroforez edilen PCR ürününün oluşturduğu bantlar, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) ve kitin içindeki kullanma yöntemi takip edilerek gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüplerine bırakılan jel parçalarının üzerlerine, her 100 mg jel parçası için 300 µl jel eritme

tamponu ilave edildi. Karışım 50 °C’de, 15 dakikadan az olmayacak şekilde jel eriyinceye kadar bekletildi. Her 3 dakikada bir alt üst edilerek karıştırıldı. İyice eridikten sonra, karışım kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA’nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için, kolonların üzerlerine 20 µl 10 mM Tris-HCl ilave edildi ve 13.000 x g’de 1 dk santrifüj yapıldı. Bu şekilde DNA temiz tüpte toplanarak temizlenmiş oldu.

- Elde edilen DNA’nın vektöre klonlanması

Jelden temizlenen DNA, amfisilin antibiyotigine direnç geni taşıyan pGEM-T Easy vektörüne, 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg PGEM-T Easy) klonlandı. Reaksiyon,

1 µl pGEM-T easy vektörü,

5 µl 2X ligasyon tamponu,

1 µl T4 DNA ligaz ve

3 µl DNA bir araya getirilerek 10 µl’lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

- Kompetent *E. coli* JM101 hücrelerinin hazırlanması

Muhtemel glikozil transferaz geninin translasyona uğramayan DNA sıralarının klonlandığı plazmidleri hücreye aktarmak için, kompetent *E. coli* JM101 hücreleri kullanıldı. Bu amaçla petriye ekilmiş *E. coli* JM101 hücrelerinden tek bir koloni alınıp, Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aşılandı ve 37 °C’de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden 30 ml LB sıvı besiyerine 0,1 optik yoğunluk (OD) olacak şekilde aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C’de, yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,45 - 0,55 OD olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 4 °C’de, 4.500 rpm hızda, 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk kalsiyum klorür (100 mM CaCl₂) ile elle nazikçe çözüldü ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4.500 rpm’de, 4 °C’de, 5 dk santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti 2 ml soğuk CaCl₂ içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompetent hücreler 4 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra kullanılabilir hale gelmekte ve maksimum 2 gün kullanılabilir. 2 gün kullanılabilir.

- Plazmidlerin kompetent hücelere transformasyonu

Elde edilen kompetent hücelere plazmidlerin aktarılması için 200 µl kompetent *E. coli* hücresi bulunan tüp buz üzerine alındı ve bu hücelerin üzerlerine, 3-5 µl yukarıda oluşturulan ligasyon karışımından konuldu ve karıştırılıp 30 dakika buzda bekletildi. Ardından karışım 2 dakika 45 °C’de şoklandıktan sonra tüp içeriği 1ml LB sıvı besiyerine transfer edildi ve 37 °C’de 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hüceler 6.000 rpm’de, 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hüceler, 50 µl LB sıvı besiyerisinde süspanse edildi ve daha önceden 40 µL izopropil-β-D-tiyogalaktopiranosid (IPTG, 100 mg/ml) ve 40 µl 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-galaktosid (X-Gal, 20 mg/ml) eklenmiş olan ve 1/1000 oranında amfisilin antibiyotiği içeren LB agar besiyerisi üzerine cam bagetle yayıldı. Petriler 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerden gece kültürleri hazırlandı. Hatalı olabilecek kolonileri de göz önünde bulundurarak her bir klonlama için yaklaşık 10 koloni seçildi.

- Hızlı miniprep plazmid DNA izolasyonu

Transformasyon sonunda seçilen kolonilerden plazmid DNA’larının izolasyonu için, hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000 rpm’de, 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücelerin üzerindeki süpernatant, geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti, kalan kısım içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0,1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; %0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben, üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. Hazırlanan karışım, 10 dk buz içinde bekletildi ve sürenin sonunda, kalıntı ve kromozomal DNA’yı uzaklaştırmak için 14.000 rpm’de, 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %95’lik etanol ilave edilerek 14.000 rpm’de, 2 dk santrifüj yapıldı. Ardından çökelti %70’lik etanol ile yıkanıp 14.000 rpm’de, 2 dk santrifüj edildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH₂O’da çözüldü.

- İzole edilen DNA’ların restriksiyon analizi

İzole edilen plazmid DNA’larının istenilen gen bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, DNA’lar *EcoRI* (Promega) restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA,

0,5 µl *EcoRI*, 1,5 µl enzime ait 10X tamponu ve 3 µl H₂O olacak şekilde 15 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı.

- Doğrulanmış plazmidlerin izolasyonu ve dizi analizi

Muhtemel glikozil transferaz geninin 5' bölgesi için doğru olduğu gözlenen klonlardan kit (Promega, Kat No: A1360) kullanılarak saf plazmid DNA'ları izole edildi. Bunun için 5 ml kültür 10.000 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı, çökelti 250 µl süspansiyon tamponunda çözüldü ve üzerine 250 µl parçalama tamponu ilave edilip 4-5 kere alt üst edildi. Daha sonra 10 µl alkalın proteaz solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve üzerine 350 µl bağlama tamponu ilave edildi. Ardından 10 dk, en yüksek hızda santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırıldı ve sıvı kısım, kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlardan süzüldü. Süzme işleminin ardından, kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 50 µl H₂O ilave edildi ve 13.000 rpm'de, 1 dk santrifüj yapıldı. Böylece, DNA kolonlardan süzülerek alttaki temiz tüpte toplanmış oldu. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 100-200 ng/µl'lik konsantrasyonları hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek, DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için, Macrogen Firmasına (Meibergdreef 31 1105 AZ, Amsterdam, Hollanda) gönderildi. Dizi analizi için T7 primeri kullanıldı.

2.3.3.5. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 3' Ucunun Rastgele Çoğaltılması (3'-RACE)

AMEV'in tüm genom dizisi incelendiğinde adenin ve timin bazlarınca zengin olduğu görülmektedir. Bu durum özellikle 3' UTR bölgesinin belirlenmesi için önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Bu nedenle Bölüm 2.3.3.2'de izole edilen viral RNA'dan 3'/5' RACE Kit (Roche) içeriğinde bulunan ankor primer yardımıyla Bölüm 2.3.1'de belirtilen metoda göre 5'/3' RACE kit oligo-dT primeri kullanılarak cDNA sentezlendi. Bu cDNA kalıp olarak kullanılarak GTUTR1-Rv GTUTR2-Rv ve GTUTR3-Rv geri primerleri ve GTSP6 ileri primeri ile genin 3' UTR bölgesinin tahmin edilebilmesi için farklı boyutlarda PCR ürünleri elde edilmesi planlandı. PCR reaksiyonu gerçekleştirilip oluşan ürünler %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulup görüntülendi.

2.3.3.6. *amv248* Geninin 3' UTR'sine ait DNA'ların Analizi

amv248 geninin 3' UTR'sinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen bantlar Bölüm 2.3.3.4'de belirtilen metodlara göre sırasıyla jelden temizlendi ve dizi analizine gönderildi.

2.4. Biyoinformatik Analizle Proteinin Üç Boyutlu Yapısının Oluşturulması ve Konak Hücre Tutunma Motiflerinin Belirlenmesi

2.4.1. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (*amv248*) Biyoinformatik Analizi

amv248 geninin sahip olduğu domeinler, korunmuş bölge analizleri, kodlanan proteinin dizi analizi ve özellikleri, NCBI Blast ve UniProt ScanProsite programlarıyla incelendi.

amv248 geninin bir membran proteini kodladığı bilindiğinden tamamının ifade edilmesi durumunda sinyal peptidler ya da transmembran bölgelerinden kaynaklı sorunlar yaşanabileceği düşünüldüğünden proteinin bu bölgeleri ihtiva edip etmediği araştırıldı. Bu amaçla sinyal peptid içerip içermediği SignalP analizi ile (SignalP 4.1 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ve transmembran bölgesi içerip içermediği transmembran heliks içerik tanımlama uygulaması (TMHMM Server v2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) ile analiz edildi (Sonnhammer vd., 1998; Petersen vd., 2011).

2.4.2. AMV248 Proteininin Üç Boyutlu Yapısının Belirlenmesi

AMV248 proteininin transmembran bölgesini içermeyen ektodomein kısmının 3 boyutlu yapısının belirlenmesi MODELLER uygulaması ile karşılaştırmalı homoloji modelleme yöntemi kullanılarak yapıldı (Webb ve Sali 2014). Bu yöntem, daha önceden X-ışını kristalografisi ve NMR spektroskopisi gibi deneysel yöntemlerle 3 boyutlu yapısı belirlenmiş ve protein veri tabanında (PDB) kaydedilmiş olan proteinlerin yapısından yola çıkarak 3 boyutlu yapısı belirlenmek istenilen proteini tanımlama prensibine dayanmaktadır. Daha sonra, MODELLER yazılımı ile 3 boyutlu yapısı belirlenen *amv248* ektodomein proteini PyMOL yazılımı (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC) ile görüntülendi. Glikozil transferaz proteininin 3 boyutlu yapı

tahmini vaksinya virüs (VACV) H3 protein 3 boyutlu yapısı (PDB 5EJ0 numaralı yapı) kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirildi.

2.4.3. AMV248 Proteininin Konak Hücre Bağlanma Motiflerinin Belirlenmesi

Genel olarak hücre yüzey GAG'larına tutunma görevini yerine getiren virüs proteinlerinde XBBBXXBX ve XBBXXBX (B, bazik aminoasitleri ve X, hidropatik aminoasitleri temsil eder) protein desenleri tespit edilmiştir (Kern vd., 2003). AMV248 proteininin birincil yapısında bu desenlerin tespit edilememesi sebebiyle, proteinin ikincil veya üçüncül yapısının oluşmasıyla hücresel GAG'lara bağlanma deseninin ortaya çıktığı varsayılmaktadır.

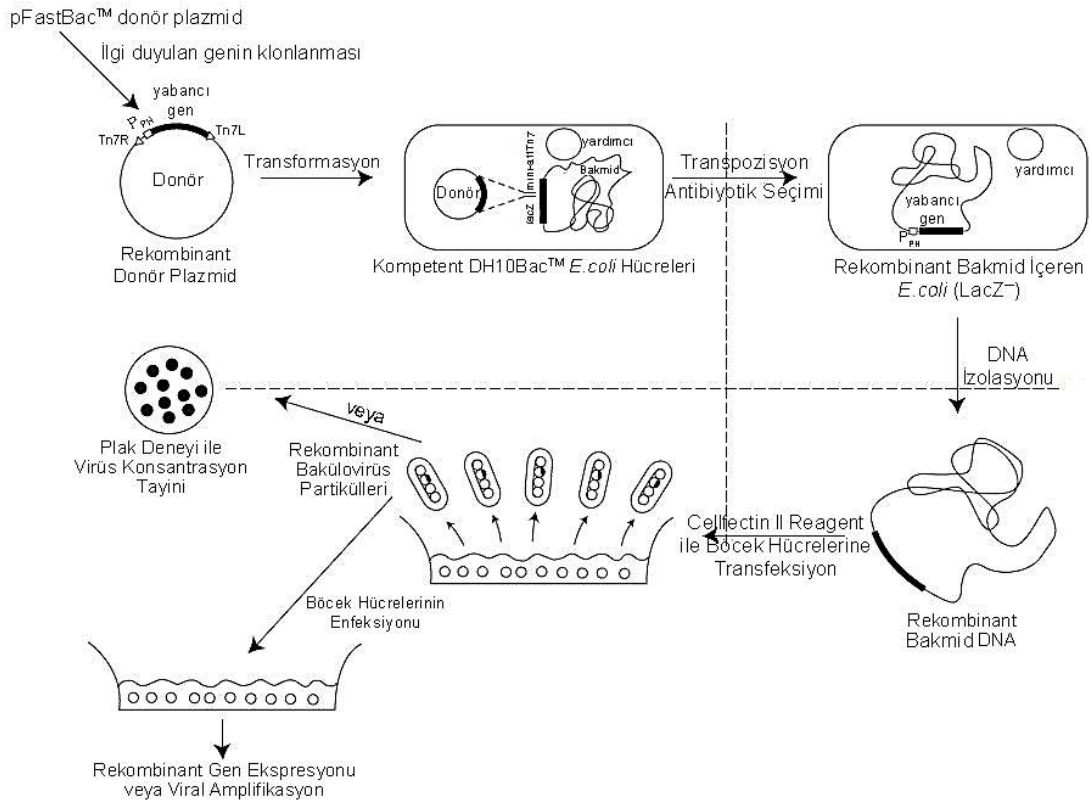
Bu varsayımı doğrulama amacıyla, elde edilen 3 boyutlu yapının konak hücre yüzey glikozaminoglikanlarından heparin ile bağlanma ihtimali, AutoDock4 ve AutoDockTools4 docking yazılımı (Morris ve Huey 2009) ile test edildi.

Heparinin üç boyutlu yapısı çizildikten sonra, *amv248* gen ürünü protein ile heparin molekülünün birbirine kenetlenmesi (docking) araştırıldı (Morris ve Huey 2009). Bu işlem online otomatize docking sistemi (Polizom Inc - <http://molecule.tools>) kullanılarak gerçekleştirildi. AMV248 makromolekül, heparin molekülü ise ligand olarak seçildi; sistem ön tanımlı değerler kullanılarak docking işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla makromolekül üzerindeki 28.23, 33.03, 47.47 koordinatlarına (x,y,z) sahip atom merkez seçilerek 300, 300, 300 boyutlarında grid oluşturularak analiz gerçekleştirildi. Sistem tarafından üretilen sonuç raporu AutodockTools4 yazılımı yardımıyla yorumlandı ve kenetlenme tespit edilip daha sonra Accelrys Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016) yazılımı kullanılarak muhtemel etkileşim bölgeleri belirlendi.

2.5. Rekombinant AMV248 Proteininin Oluşturulması ve Rekombinant Protein ile Hücre Yüzey Matriksinin Etkileşme Özelliğinin Belirlenmesi

Muhtemel glikozil transferaz geninin (*amv248*) ökaryotik bir sistemde ifadesini gerçekleştirmek amacıyla Bac-to-Bac bakülovirüs vektör sistemi (Invitrogen) kullanıldı (Anderson vd., 1996). Bu sistem, rekombinant bakülovirüs oluşturma, çoğaltma ve gen ifadesi için kullanılan bir sistemdir. Sistem temel olarak ilgi duyulan bir genin ticari

rekombinant plazmide klonlanması ve hazırlanmış özel kompetent *E. coli* hücrelerine aktarılması sonucu elde edilen bakmid DNA'sının böcek hücre kültüründe çoğaltılmasını içermektedir. Bu sisteme aktarım olayı Şekil 11'de şematik olarak görülmektedir.



Şekil 11. Bac-to-Bac Bakülovirüs vektör sistemi.

2.5.1. AMV248 Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması

Glikozil transferaz geni (*amv248*) için kullanılacak olan bakülovirüs vektör sisteminin (Invitrogen) içerdiği pFastBac-HTb vektörüne doğru yönde, AMV248 proteininin içerdiği transmembran heliks bölgesini ihtiva etmeyecek ve okuma sırası kaymayacak şekilde primerler tasarlandı ve sentezletirildi (Tablo 4).

Tablo 4. *amv248* geninin ifadesi için kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Sırası (5' – 3')
GTexFw	CGGGATCCATGGAAAATTATCATATTATTATATTAAC
GTexRv	GGAATTCTTATGAGATTAACATTATTATTATATAAAA

GTexFw *Bam*HI ve GTexRv *Eco*RI kesim bölgelerini taşımaktadır.

İstenilen DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması 3'-5' ve 5'-3' doğrulama aktivitesine sahip Phusion DNA polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ile gerçekleştirildi. PCR reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda belirtilmiştir:

PCR Reaksiyonu:		PCR Koşulları:	
AMEV DNA	: 2 µl	98 °C	: 30''
5X HF tampon	: 10 µl		
10mM dNTP	: 1 µl	98 °C	: 10''
Fw primer	: 1,5 µl	60 °C	: 30''
Rv primer	: 1,5 µl	72 °C	: 30''
DNA polimeraz	: 0,5 µl		
MgCl ₂	: 0,5 µl	72 °C	: 10'
H ₂ O	: 33 µl	12 °C	: ∞

35 döngü

Elektroforez edilen PCR ürününün oluşturduğu bant, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) kullanılarak Bölüm 2.3.3.4'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Jelden temizlenen DNA parçası, pJET (CloneJet PCR Cloning Kit – Thermo) vektöre 3: 1 oranında klonlandı. Reaksiyon 1µl pJET vektörü, 10 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz, 7,4 µl saf su ve 0,6 µl DNA bir araya getirilerek 20 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

Ligasyon ürünü daha sonra Bölüm 2.3.3.4'de anlatıldığı üzere hazırlanan kompetent *E. coli* JM101 hücrelerine aktarıldı. Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden gece kültürleri hazırlandı ve plazmid izolasyonu kit (Promega) yardımı ile yapıldı.

İzole edilen plazmid DNA'larının istenilen DNA bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları daha önceden düzenlenen primerlere eklenen restriksiyon enzimleriyle (*EcoRI* ve *BamHI*) muamele edildi. 10 µl DNA, 5'er ünite *EcoRI* ve *BamHI* enzim (Promega), 3'er µl her iki enzime ait 10X tamponu ve 12 µl H₂O olacak şekilde 30 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıp, jel görüntülendi. Seçilen klonların büyük bir kısmının restriksiyon analizleri yapıldı. Kesim sonucu istenilen DNA'ları içerdiği düşünülen klonlar belirlendi.

Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu doğrulanan plazmidler etiketlenerek, DNA dizisinin otomatik analiz edilmesi için, MacroGen Firmasına (Meibergdreef 31 1105 AZ,

Amsterdam, Hollanda) gönderildi. Dizi analizi için pJET1_2F ve pJET1_2R primerleri kullanıldı. Daha sonra dizileme sonuçları analiz edildi.

2.5.2. Genin pFastBac HTb Ara Transfer Vektörüne Klonlanması

İzole edilen ve dizi analizi ile doğrulanan rekombinant plazmid DNA'sından 200 ng, 5'er ünite *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ve 2 µl 10X üniwersal kesim tamponu bir araya getirilerek toplam 20 µl son hacimde reaksiyon hazırlandı ve bu karışım 37 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Vektörden restriksiyon enzimlerle kesilerek ayrılmış gen bölgesi agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA temizleme kiti kullanılarak temizlendi.

Bu aşamadan sonra genin klonlanacağı ara transfer vektör hazır duruma getirildi. Ara transfer vektörü olarak pFastBacHTb vektörü kullanıldı. Bu vektörde daha sonraki işlemlerde gerekli olacak homolog rekombinasyon bölgeleri (Tn7R, Tn7L) mevcuttur. Ayrıca üretilcek olan proteinlerin N-terminal ucuna histidin kuyruk eklenmesi, bu sistem ile eksprese edilen proteinlerin saflaştırılmasını kolay hale getirmektedir. Vektörün hazırlanması için pFastBacHTb ara transfer vektörünü içeren *E. coli* DH5α bakterilerine ait koloniden 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu büyütüldü. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültür 14000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra, kit kullanılarak pelletten plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmid DNA restriksiyon endonükleazlar ile lineer hale getirildi. Bunun için 500 ng plazmid DNA, 5 ünite *Bam*HI, 5 µl *Eco*RI ve 2' µl 10X üniwersal tampon bırakıldı. Son hacim steril dH₂O ile 20 µl'ye ayarlandı ve reaksiyon 37 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen reaksiyon %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Restriksiyon endonükleazlarla lineer hâle gelmiş pFastBacHTb vektör, DNA temizleme kiti kullanılarak jelden temizlendi.

Restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelden temizlenmiş *amv248* genine ait DNA, yine restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek lineer hale getirilmiş pFastBacHTb vektörüne 3:1 (DNA : vektör) oranında yapıştırıldı. Buna göre reaksiyon; 2 µl 10X T4 DNA ligaz enzim tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 2 µl pFastBacHTb vektörü, 6 µl *amv248* DNA fragmanı ve 9 µl dH₂O olacak şekilde hazırlandı ve reaksiyon 16 °C'de gece boyu bekletilerek ligasyon gerçekleştirildi.

Elde edilen rekombinant plazmid *E. coli* DH10β hücresine transform edildi. Rekombinant plazmidlerin (pFBHT-AMV248b) bu hücrelerdeki varlığı, plazmid DNA

izolasyonu sonucu restriksiyon enzimleri ile kesilerek %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edilip görüntülendi.

2.5.3. Genin Bac-to-Bac® Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması

Daha önceki basamaklarda hazırlanan ara transfer vektörünün bakülovirüs vektör sistemine aktarılması için *E. coli* DH10Bac bakteri hücrelerine transform edilmeleri gerekir. Bu hücreler özel hücreler olup transpozisyon için gerekli enzimi üreten yardımcı (helper) plazmide ve bakteriyal replikasyon orijinine sahip *Autographa californica* multi nükleopolihedrovirus (AcNPV) viral DNA'sına (bakmid) sahiptirler.

Transformasyon işlemi için DH10Bac hücreleri kullanılarak Bölüm 2.3.3.4'de belirtildiği üzere kompetent hücre hazırlandı. Hazırlanan DH10Bac kompetent hücrelerinden 100 µl üzerine 5 µl (1 ng) rekombinant vektör ilave edilerek buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Deney tüpü 45 °C' de 45 saniye tutularak ısı-şoku işlemi yapıldı ve hemen ardından buz üzerine alınarak 2 dakika soğuması için bekletildi. Tüpe 900 µl LB (oda sıcaklığında) eklendi ve 37 °C'de 225 rpm hızda 4 saat inkübe edilerek transformasyon gerçekleştirilmiş oldu. Bu hücreler gentamisin (gen bölgesini içeren pFastBacHTb donör plazmidinin seçimi için), kanamisin (Bakmid seçimi için), tetrasiklin (transpozisyon için gerekli enzimi üreten yardımcı plazmid seçimi için), IPTG ve X-gal içeren besiyerinde 48 saat büyütüldü. Bakmid seçimi için, boş bakmidler *lacZ* genini içermektedir, transpozisyon bu *lacZ* geni içinde gerçekleşmekte ve sonuçta transpozisyon olanlar beyaz kolonilerin oluşması ile belirlenmektedir. Transformasyonun ardından ara transfer vektörü ile bakmid DNA arasında her ikisinin de sahip olduğu homolog bölgeler sayesinde transpozisyon olması gerekmektedir. Transpozisyonun gerçekleşmesi büyüyen hücrelerin beyaz renkli olmasını sağlamaktadır. Dolayısı ile transformasyon işlemini takip eden 48 saat sonra oluşan büyükçe beyaz kolonilerden, aynı besiyeriye kolonilerin tamamen saf olmasını sağlamak amacıyla çizgi ekim yapıldı ve tekrar 48 saat 37 °C'de inkübe edildi. Oluşan beyaz kolonilerden rekombinant bakmid DNA izolasyonu yapıldı.

Beyaz fenotipte büyüyen koloniler kanamisin, tetrasiklin ve gentamisin içeren 2 ml sıvı besiyerine inoküle edildi. Hücreler 37 °C'de durgun faza kadar büyütüldü. Kültürün 1,5 ml'lik kısmı 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Pellet kısmı 300 µl Solüsyon I (15 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaz A)'de hafif vorteks yapılarak çözüldü ve üzerine 300 µl Solüsyon II (0,2 N NaOH, %1 SDS) eklenerek karıştırıldı. Hücrelerin parçalanması için oda sıcaklığında bu şekilde 5 dakika bekletildi. Üzerine 300

μ l 3 M Potasyum asetat (pH 5,5) yavaşça ilave edilerek karıştırıldı. Örnekler buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildiler. Süpernatant kısmı içerisinde 800 μ l izopropanol bulunan tüplere aktarıldı, tüpler alt üst edilip 10 dakika buzda bekletildiler. 14000 rpm'de 15 dakika çöktürme yapıp süpernatantlar dikkatlice döküldü. Tüplere 500 μ l etanol (%70) koyulup alt üst edildi ve 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Süpernatant dökülüp tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. En sonunda pellet haldeki bakmid DNA 40 μ l TE tamponda çözülerek 4 °C'ye kaldırıldı.

Bakmid DNA'ların muhtemel glikozil transferaz genini (*amv248*) ihtiva edip etmedikleri PCR ile analiz edildi. Bunun için AMV248-Fw ileri ve GTSP2-Rv geri primer çifti kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Doğruluğu teyit edilen klonlardan bir tanesi seçildi ve transfeksiyon işlemine kullanıldı.

2.5.4. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması

Bir gün önceden Sf9 böcek hücre kültürü hücreleri her gözde 2×10^6 hücre olacak şekilde 6 gözlü hücre kültür kaplarına bırakıldı ve tabana tutunmaları için 28 °C'de bekletildi. 1 μ g rekombinant bakmid DNA (~5 μ l) ile 100 μ l katkısız Grace's Insect medium (Gibco®) karıştırıldı (Solüsyon A). Diğer taraftan 8 μ l Cellfectin® II Reagent (Invitrogen) ile 100 μ l katkısız Grace's Insect besiyeri homojen bir biçimde karıştırıldı (Solüsyon B). Ardından bu iki solüsyon bir ependorf tüpte birbirine karıştırılıp 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir alt-üst edilerek oda sıcaklığında bekletildi. Tutunan hücrelerin üzerlerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml katkısız Grace's Insect besiyeri yavaşça gezdirilerek yıkandı. Cellfectin-DNA karışımının üzerine 800 μ l katkısız Grace's Insect besiyeri eklendi, nazikçe karıştırıldı ve hücrelerin üzerine yavaşça ilave edildi. Hücreler bu şekilde 28 °C'lik etüvde 5 saat inkübe edildi. Transfeksiyon solüsyonu hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve üzerine %5 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren 2 ml Sf-900™ II SFM (Gibco®) besiyeri eklendi, 72 saat 28 °C'de inkübasyona bırakılarak transfeksiyon gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra oluşan rekombinant virüslerin temini için hücreler 500 x g'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Elde edilen süpernatant viral stok olarak adlandırıldı. Elde edilen viral stoğun çoğaltılması amacıyla T75 flasklere bırakılan $9,0 \times 10^6$ hücre 1 ml virüs kullanılarak enfekte edildi. Enfeksiyondan 5 gün sonra hücreler toplandı ve rekombinant bakmid DNA'ları barındıran bakülovirüsü içeren

süpernatant kısmı daha sonraki enfeksiyonlarda kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edildi.

2.5.5. Rekombinant AMV248 Proteininin Hücre Kültüründe Üretilmesi

Muhtemel glikozil transferaz genine ait proteini hücre kültüründe üretmek için öncelikle Sf9 hücreleri T75 flasklerde $9,0 \times 10^6$ hücre/flask olacak şekilde dağıtıldı. Bu hücreler *amv248* genini bakmid DNA üzerinde içeren rekombinant bakülovirüs ile enfekte edildi. Enfeksiyon işlemi için 2 ml hacimde olacak şekilde virüs solüsyonu T75 flasklerde bulunan hücrelerin üzerine yavaşça ilave edilip 2,5 rpm hızda yatay sallayıcıda 2 saat boyunca sallandı. Bu şekilde virüslerin hücrelere tutunması sağlandıktan sonra flasklere %5 FBS içeren Sf900 II SFM besiyeri ilave edilerek son hacim 10 ml’ye tamamlandı ve 28 °C’lik etüvde inkübasyona bırakıldılar. 120 saatlik enfeksiyon sonunda hücreler içerisinde bulundukları besiyeride süspansiyon hale getirilerek 4 °C’de 500 g’de 5 dakika çöktürüldü. Hücrelerden oluşan pellet kısmı protein saflaştırmak için kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -80 °C’de muhafaza edildi.

- Üretilen Proteinin Saflaştırılması

Elde edilen hücre pelletinden “MagneHis™ Protein Purification System (Promega)” protein saflaştırma kiti kullanılarak N-terminalinde His-tag uzantısına sahip proteinler saflaştırıldı. Her $2,5 \times 10^6$ hücre için 1 ml olacak şekilde PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X)’te çözülen pelletin üzerine her 1 ml için 330 µl hücre lizis tamponu ve 1 µl DNaz I ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dakika rotator yardımıyla döndürülerek inkübe edildi. Her 1 ml örnek için 30 µl nikel partikülü ilave edilerek proteinin bu parçacıklara bağlanması için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra magnetik tutucuya koyulup nikel parçacıklarının çekilmesi sağlandıktan sonra geri kalan sıvı kısım atıldı, 500 mM NaCl içeren yıkama/bağlanma tamponuyla proteine bağlanan nikel tozları süspansiyon hâline getirilip tekrar mıknatıs yardımıyla çekilmeleri sağlanarak yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. En son başlangıçta kullanılan her 1 ml örnek için 100 µl olacak miktarda çözücü tamponuyla muamele edilip 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi, tekrar tutucuya yerleştirilip protein içeren sıvı kısım alınarak daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

Protein miktarının tayini Bradford’un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi (Bradford 1976). Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır

serum albümini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 µg BSA içeren çözeltiler dH₂O ile 500 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çözeltilerden ve konsantrasyonları öğrenilmek istenen örneklerden 10'ar µl alınıp üzerine 200'er µl hazır boya çözeltisinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve örnekler 96 gözlü kaplara 3 tekrarlı olacak şekilde aktarıldı. 15 dakikalık inkübasyon süresinden sonra SpectraMax M2 (Molecular Devices) cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı.

- Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein ifadesinin gözlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Her bir örnek eşit miktarda protein içerecek şekilde hazırlanıp üzerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler 95 °C'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 80 Volt sabit akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi (Laemmli 1970).

- Proteinin Membrana Aktarılması ve Western Blot Analizi

Western blot analizi için jel semi-dry blotlama cihazı (Bio-Rad) kullanılarak membrana aktarıldı. Bunun için membran ve whatman kâğıtları jel büyüklüğünde kesildi. Membran ve kâğıtlar blotlama tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glycine, % 0,0375 w/v SDS) ıslatıldıktan sonra cihaza 2 whatman kâğıdı, membran, jel ve 2 whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildiler. Cihaz 0,04 Amper'de 1 saat çalıştırıldı ve böylece blotlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından membran yıkama tamponunda (PBS'de hazırlanmış %0,5'lük süt tozu ve %0,05 Tween20) 2 dakika yıkandıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında yine PBS'de hazırlanmış %5'lik süt tozu içeren PBST'de (1X PBS, %0,05 Tween20) bloke edildi. Takiben 3 kere 10'ar dakika yıkama tamponuyla yıkandı. Daha sonra 1 gece Anti-poli Histidin antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, H-1029) içeren yıkama solüsyonunda oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve bu sürenin sonunda tekrar 3 kere 10'ar dakika yıkandı. Ardından 1 saat Anti-Fare IgG (Alkalın Fosfataz antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, A-3562) içeren yıkama tamponu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Sonra tekrar 3 kez 10'ar dakika yıkama tamponu ve 2 kez de 10'ar dakika AP tamponu (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5, 1X) içinde yıkama gerçekleştirildi. Son olarak membran 100 µl nitroblue

tetrazolium ve bromochloroindolyl fosfat (NBT/BCIP stock solution, Roche, 11681451001) içeren 10 ml AP tamponu içinde boyandı. Reaksiyon, protein bantlarının belirlenmesinin ardından membranın bolca dH₂O ile yıkanması ile durduruldu. Membran kurutuldu ve taranarak bilgisayara aktarıldı.

2.6. AMV248 Yapısal Proteininin İmmün Nötralizasyonunun Virüs Replikasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

AMV248 kodlu yapısal proteinin immün nötralizasyonunun virüs replikasyonuna etkisinin belirlenmesi deneylerinin gerçekleştirilmesi için gene özgü antikora ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla daha önce bakülovirüs vektör sisteminde üretilen protein (4 mg) antijen olarak kullanılarak Promab Biotechnologies (Amerika) şirketine hizmet alımı yoluyla antikor ürettirildi. Promab şirketi tarafından, antikor üretim sonucunda gönderilen antikor örneği kullanılarak immün nötralizasyon deneyleri yapıldı.

AMV248 proteininin immün nötralizasyonunu sağlamak amacıyla, antikor örneği Promab (USA) tarafından hizmet alımıyla bu proteine karşı üretilerek elde edildi. Promab şirketi tarafından, AMV248 proteini farelere enjekte edilip ardından farelerden serum örnekleri alındı. Antijene karşı üretilen bu serumlar daha sonra ELISA deneyi yapılarak doğrulandı. Bu amaçla antikorların doğrulanması için 50 mM 5 µg/ml Na₂CO₃ – NaHCO₃ içerisindeki AMV248 rekombinant proteini %1 PBS ile 4 °C’de bir gece bloklandı. Ardından immünizasyon sonrası farelerden elde edilen serum örnekleri primer antikor olarak kullanılarak 37 °C’de 1 saat muamele edildi. İkincil antikor olarak HRP işaretli anti-IgG (Sigma Katalog No: A0168) 1:9000 (hacim:hacim) ile 37 °C’de 1 saat muamele edildi. Tetrametilbenzidin (TMB) substratı ile 10 dakika inkübasyon sonrası 450 nm’de optik yoğunluk ölçümü yapıldı. Doğrulamanın ardından Promab şirketinden 5 adet antikor örneği gönderildi.

Serumların temininin ardından ön testler sonucunda çalışmada #5 numaralı örneğinin kullanılmasına karar verildi.

Antikor temin edildikten sonra, öncelikle 56 °C’de 30 dakika inkübe edilerek ısı ile kompleman inaktivasyonu sağlandı ve daha sonra 3, 6, 12 ve 25 µl/kuyu olacak şekilde seyreltikleri hazırlandı. Seyreltilen antikorlar, her biri yaklaşık 300 pfu olacak şekilde AmΔsph/gfp virüs ve son hacim 100 µl’ye büyüme besiyeri ile tamamlanarak 28 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından bu seyreltilmiş olan antikor-virüs solüsyonları kullanılarak önceden 96 gözlü hücre kültür kaplarına her bir göze 2 x 10⁴ hücre olacak

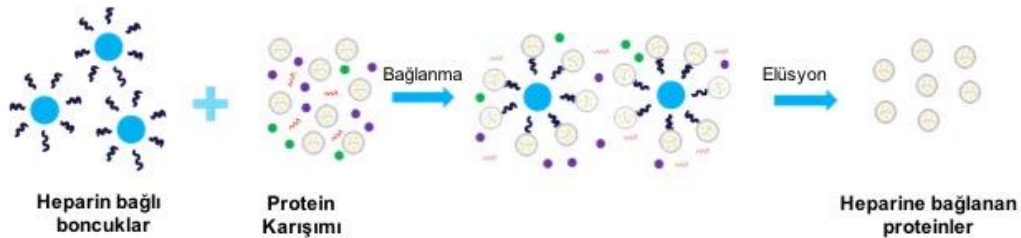
şekilde bırakılmış olan Ld652 hücreleri enfekte edildi. Ayrıca bir göze sadece hücre bir göze de sadece hücre ve AmΔsph/gfp virüs eklenerek sırasıyla negatif ve pozitif kontrol grupları oluşturuldu. İki saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki sıvı alındıktan sonra hücreler serum (FBS) içermeyen besiyeri ile yıkandı ve ardından her bir göze 200 µl büyüme besiyeri (streptomisin/penisilin antibiyotik içeren) eklenip 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresince GFP oluşumu inverted floresan mikroskop (Zeiss Axiovert 200M) ile takip edildi.

Enfeksiyon sonucu elde edilen hücreler hasat edildikten sonra oluşan yavru virüsün konsantrasyonu Bölüm 2.2.2’de anlatılan şekilde EPDA yöntemi ile belirlendi.

2.7. Rekombinant Proteinin Heparine Bağlanma Kapasitesinin Araştırılması

2.7.1. AMV248 Rekombinant Proteininin Heparin Kolondan Geçirilmesi

Bakülovirüs vektör sisteminde üretilmiş ve saflaştırılmış olan AMV248 rekombinant proteininin, 1ml hacimli HiTrap Heparin HP (GE Healthcare Kat No: 17-0407-03) ticari kolon kiti kullanılarak, heparine bağlanma kapasitesi belirlendi. HiTrap Heparin HP kolon parçacık boyutu 35 µm olan heparin kaplı boncuklar içermektedir. Heparine bağlanma özelliği gösteren proteinler ile muamele durumunda bu proteinler boncuklara bağlanmakta ve kit kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde yıkama ve elüsyon (geri kazanım) tamponları ile muamele sonrası heparine bağlanmış olan protein elde edilmektedir. Deney Şekil 12’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 12. HiTrap HP Heparin kolon ile proteinlerin heparin bağlanma kapasitesinin belirlenmesi. Balaj vd., 2015’den düzenlenmiştir.

- HiTrap HP Heparin Kolonun Dengelenmesi

HiTrap HP kolonun içerdği heparin bağlı boncukların aktif hale gelebilmeleri için öncelikle bağlanma tamponu (10 mM sodyum fosfat, pH 7, 0,45 µm filtreden geçirilir) ile dengelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla ticari olarak %20 etanol ile dolu gelen kolon içeriği uzaklaştırıldı. Bu sırada kolonun kurumaması için önceden hazırlanmış olan bağlanma tamponundan 10 kolon hacmi kadar (10 ml) bir şırıngaya alınıp şırınga kolonun üst kısmına kit içeriğinde çıkan bağlama aparatı ile hava kabarcığı oluşmayacak şekilde takıldı ve tampon dakikada yaklaşık 1 ml sıvı geçecek hızda kolondan geçirildi. Bu şekilde HiTrap Heparin HP kolon dengelendi.

- Örneğin Hazırlanması ve Kolona Yüklenmesi

HiTrap Heparin HP kolona yüklenecek olan protein öncelikle tuzlarından arındırılmalı ve kolona bağlanmaya uygun hale getirilmek için bağlanma tamponu ile karıştırılmalıdır. Bu amaçla kolona yüklenmeden önce Bakülovirüs vektör sisteminde üretilmiş ve daha sonra histidin kuyrukları hedeflenerek “MagneHis Protein Saflaştırma Sistemi (Promega)” kullanılarak saflaştırılmış olan protein Milipore Amicon Ultra 0,5 10K kolon kullanılarak tuzlarından arındırıldı ve konsantre edildi. Amicon Ultra 0,5 10K kolon büyüklüğü 10 kDa ve üzerindeki proteinleri tutarken tuz ve daha düşük ağırlıklı proteinleri uzaklaştırmaktadır. Bu amaçla saf rekombinant proteinden 400 µl alınıp Amicon Ultra 0,5 10K kolona eklendi. Daha sonra 14000 x g’de 15 dakika santrifüjlendi. Üretilmiş olan AMV248 rekombinant proteini yaklaşık 30 kDa ağırlığında olduğu için üst sıvıda kalmış olduğu varsayıldı. Bu sıvıyı elde etmek için kolon ters çevrilip 1000 x g’de 2 dakika santrifüjlenerek içerik başka bir tüpe yoğun bir biçimde aktarıldı. Daha sonra elde edilen örnek bağlanma tamponu ile 1 ml hacme tamamlandı ve 0,45 µm’lik filtreden geçirilip, kurumaması için dengelenmiş olan kolona zaman kaybetmeden dakikada yaklaşık 1 ml sıvı geçecek hızda yüklendi.

- Bağlanmamış Proteinlerin Uzaklaştırılması ve Bağlanmış Proteinlerin Geri Kazanımı

Örneğin kolona yüklenmesinin ardından, kolonun kurummasına izin verilmeden kolon 5 kolon hacmi (5 ml) bağlanma tamponu ile yıkandı ve takiben 7,5 ml elüsyon tamponu (10 mM sodyum fosfat, 2 M NaCl, pH 7, 0,45 µm filtreden geçirilir) ile örnek geri kazanıldı. Bu amaçla örneğin elüsyon tamponu kolona yüklendikten sonra kolondan çıkan ilk 2 damladan sonraki tüm sıvı 15 ml’lik bir tüpe alındı.

2.7.2. HiTrap Heparin HP Kolondan Geri Kazanılan Proteinin Konsantre Edilmesi

HiTrap Heparin HP kolon uygulaması sonrası elde edilen proteinlerin SDS PAGE ve Western Blot analizlerine hazır hale gelebilmesi için konsantre edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla tüm örnek büyüklüğü 10 kDa ve üzerindeki proteinleri tutarken tuz ve daha düşük ağırlıklı proteinleri uzaklaştıran Sartorius Vivaspin 20 10 kDa konsantratör kolona yüklendi ve yüksek hızda 4 °C’de kolon içeriği 7,5 ml’den 0,5 ml’ye düşene kadar santrifüjlendi.

2.7.3. Heparine Tutunan Rekombinant Proteinin Görüntülenmesi

Protein ekstraksiyonunun gözlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Bu amaçla HiTrap kolondan geri kazanılan ve ardından konsantre edilen protein örneğinin tamamı üzerine 1:1 hacim:hacim muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β -merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra örnek 95 °C’de 5 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10’luk SDS-PAGE’e yüklendi. Jele 80 Volt sabit akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Bölüm 2.5.1.9’da verilen metoda göre poliakrilamid jelin PVDF membrana aktarımı ve western blot analizi gerçekleştirildi.

2.8. Virüslerin Hücre Yüzeylerine Bağlanma Özelliklerinin Araştırılması

Literatürde varolan çalışmalar, virüslerin hücrelere girişi için çeşitli GAG’ları hedefleyen proteinler sayesinde ilk tutunmanın gerçekleştiğini ve ardından özel bir takım proteinler sayesinde hücre membranına füzyon ile viral enfeksiyonun başladığını göstermektedir. AMV248 proteininin viral membran proteini olduğu ve hücre yüzey GAG’larından heparine bağlanmaktan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla öncelikle virüsün heparin molekülüne bağlanması test edildi. Ardından çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış çözünabilir hücresel GAG’ların enfeksiyon öncesi virüs ile inkübe edilerek muhtemel viral tutunma bölgeleri doyuruldu ve bu karışım viral stok olarak kullanılarak enfeksiyon gerçekleştirildi. Son olarak virüslerin enzimatik olarak yüzey GAG’ları çıkarılan hücrelere bağlanma etkisi belirlendi.

2.8.1. Virüslerin Heparine Bağlanma Kapasitesinin Belirlenmesi

AMEV'in hücrel GAG'lardan heparin molekülü ile bağlanma kapasitesi Salvador vd (2013) tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Bu amaçla heparin bağlı boncuklar içeren HiTrap HP (GE Healthcare) kolon içeriği PBS ile çözülerek bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Boncukların çökmesi beklenip üst sıvı uzaklaştırıldı ve yeniden PBS ile çözülerek yıkandı ve yeniden üst sıvı atıldı. Boncuklar, ardından bağlanma tamponu (10 mM sodyum fosfat) ile çözülerek 50 µl yıkanmış boncuk yeni bir tüpe alındı. 20 µl virüs ($15,52 \times 10^6$ pfu) örneği boncukların üzerine eklenip ve 10 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Bu işlemin ardından heparin boncuklara bağlanmayan virüsleri uzaklaştırmak için boncuklar 3 kere bağlanma tamponuyla yıkandı. Daha sonra heparin boncuklara tutunan virüslerin geri kazanılması amacıyla boncuklar 100 µl çözündürme tamponu (10 mM sodyum fosfat pH 7,2; 2 M sodyum klorür) ile çözülerek 10 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Elde edilen üst sıvı virüs içerip içermediğini belirlemek için SDS-PAGE ve Western Blot analizine tabi tutuldu.

Virüslerin heparin boncuklara bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Heparin boncuklardan çözündürme tamponu ile geri kazanılan üst sıvı üzerine 10 µl %0,1 Triton X-100 (PBS ile hazırlanmış) eklendi. Ardından örnek üzerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler direk Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 80 Volt sabit akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Bölüm 2.5.1.9'da belirtilen metoda göre SDS-PAGE jeli PVDF membrana aktarıldı. Western blot analizi için birinci antikor olarak anti-GFP antikoru (1:1000 sulandırma) ikinci antikor olarak ise Anti-Tavşan IgG (Alkalın Fosfataz antikoru (1:1000 sulandırma) kullanılarak yine aynı bölümde belirtilen metoda göre analiz yapıldı.

2.8.2. Virüs Enfeksiyonlarının Çözülebilir Glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ile İnhibisyonunun Belirlenmesi

Viral enfeksiyon sırasında hedeflenen GAG'ların enfeksiyon öncesi virüsler ile inkübasyonu sonucu enfeksiyonun inhibe edilebildiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Hsiao vd., 1999; Lin vd., 2000; Salvador vd., 2013). AMEV enfeksiyonunun GAG'larca inhibisyonunun belirlenmesi amacıyla Heparin (Sigma),

Heparan Sülfat (Sigma), Kondroitin Sülfat A (Sigma) ve Kondroitin Sülfat B'den (Dermatan Sülfat – Sigma) çeşitli seyreltikler hazırlandı. Daha sonra bu seyreltikler 300 pfu AmΔsph/gfp virüs ile son hacim 100 µl olacak şekilde karıştırılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında virüs-GAG karışımı bir gece önceden 96 gözlü plaklara bırakılmış olan hücrelerin üzerine (2×10^4 hücre/göz) eklenerek 2 saat bekletildi. Bu süre sonunda hücreler FBS içermeyen besiyeri ile yıkanıp üzerlerine 200 µl taze besiyeri eklenerek 48 saat inkübe edildi. Viral enfeksiyon mikroskopik olarak gözlemlendi.

48 saatlik inkübasyon sonrası hücreler toplandıktan sonra üretilen yavru virüs miktarları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı üzere EPDA yöntemi ile belirlendi.

2.8.3. Virüslerin Enzimatik Olarak Yüzey GAG'ları Çıkarılan Hücrelere Bağlanma Etkilerinin Belirlenmesi

Entomopoksvirüs viral yapı ve enfeksiyon mekanizmaları Bölüm 1'de açıklanmıştır. AMEV'in GAG bağımsız enfeksiyon miktarını belirlemek amacıyla yüzey GAG'ları enzimlerce çıkarılan hücreler kullanıldı. Bu amaçla hücresel GAG'lardan heparin ve heparan sülfatları kıran heparinaz I ve sadece heparan sülfatları kıran heparinaz III muamelesi sonrası enfeksiyon yapılarak üretilen virüs miktarları belirlendi.

24 saat önceden 96 gözlü plaklara tutturulan 2×10^4 Ld652 hücreleri üzerindeki besiyeri atılarak çeşitli konsantrasyonlarda (0-0,5 unite) 50 µl son hacimde 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4 mM CaCl₂, 50 mM NaCl ve %0,01 bovin serum albümin (BSA) ile çözülmüş heparinaz I (Sigma) ya da 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4 mM CaCl₂ ve %0,01 bovin serum albümin (BSA) ile çözülmüş heparinaz III (Sigma) ile 1 saat inkübe edildi ve ardından 2 kere PBS ile yıkandı.

Daha sonra hücreler 300 pfu AmΔsph/gfp virüs ile 2 saat inkübe edilerek enfeksiyon gerçekleştirildikten sonra besiyeri 200 µl taze besiyeri ile değiştirildi ve 48 saat inkübe edildi. Bu süreç içerisinde viral enfeksiyon mikroskopik olarak gözlemlendi (Zeiss, Axiovert).

Hücreler 48 saatlik inkübasyon sonrası fotoğraflandı ve ardından toplandı. EPDA yöntemi ile üretilen yavru virüs miktarları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde belirlendi.

2.9. amv248 Kodlu Genin AMEV Genomundan Silinmesi

Belirlenen genin fonksiyonel analizini gerçekleştirebilmek için ilk basamak, bu genin virüs genomundan silinmesi ve bu gen bakımından negatif (mutant) olan rekombinant

virüsün oluşturulmasıdır. Genin virüs genomundan silinmesi işlemi, bir işaret protein (GFP) üreten gen (*gfp*) ile *amv248* kodlu genin yerlerinin değiştirilmesi şeklinde gerçekleştirildi. Bunun için, ilk önce *amv248* geninin askı bölgelerini içeren bir ara vektör oluşturuldu. Oluşturulan bu ara vektördeki askı bölgelerinin arasına GFP proteini üreten gen (*gfp*) yerleştirilerek, sonuç transfer vektörü oluşturuldu. Daha sonra, Ld652 hücrelerine yaban tip virüsün enfeksiyonu ve transfer vektörün transfeksiyonu sonucu, hücrede homolog rekombinasyon neticesinde rekombinant virüsler oluşturuldu. Rekombinant virüs saflaştırıldıktan sonra sferoidin mutant virüs ve yaban tip virüs ile replikasyon özellikleri bakımından karşılaştırıldı.

2.9.1. *gfp* İçeren Rekombinant Transfer Vektörünün Oluşturulması

Glikozil transferaz genini (*amv248*) kodlayan bölgenin (ORF) baş kısmından, 666 (AMV248up) ve son kısmından, 801 (AMV248down) bazlık DNA gen askı bölgeleri belirlendi. Gen askı bölgelerini AMEV genomundan ve işaretleme amacıyla kullanılacak *gfp* genini pDU20*gfp* transfer vektöründen çoğaltmak için, 3 çift primer hazırlandı (AMV248upfw, AMV248uprv, AMV248downfw, AMV248downrv, Gfpfw ve Gfprv). Primerlere, üretilen PCR ürünlerinin pBlueScript SK(-) vektörüne aynı yönde klonlanmasına imkan sağlayan ve vektörde bulunan kesme bölgelerine uygun enzim kesme bölgeleri eklendi (Tablo 5). Hazırlanan primerler kullanılarak, *amv248*'in baş ve son kısmı yaban tip AMEV DNA'sından ve *gfp* geni pDU20*gfp* transfer vektöründen, sferoidin promotoruyla beraber PCR yöntemiyle çoğaltıldı.

PCR işlemi için, 3'→5' ekzonükleaz (hataları doğrulama) aktivitesine sahip olan Phusion (FINNZYMES, Kat No: F-530S) DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

PCR Karışımı:

1 µl	Kalıp DNA
1,5 µl	İleri ve geri primerler (her birinden)
1,5 µl	dNTP
1 µl	MgCl ₂ 50mM
10 µl	HF tampon 5x

PCR Koşulları:

95 °C'de 3'	
95 °C'de 1'	} 35 döngü
*61 °C'de 30''	
72 °C'de 1'	

0,5 µl	Phusion DNA polimeraz	72 °C'de 7'
33 µl	ddH ₂ O	4 °C'de ∞

Tablo 5. Homolog rekombinasyon için kullanılan primerler.

Primer Adı	Enzim Bölgesi	Primer Sırası (5' – 3')
AMV248upfw	<i>Xba</i> I	<u>GCT CTA GAG</u> CGA AGA TTT TTC AAC AAC AG
AMV248uprv	<i>Bam</i> HI	<u>CGG GAT CCG</u> CTG TCA GAA TTT CTT TTA ATT GTT
AMV248downfw	<i>Hind</i> III	<u>CCC AAG CTT</u> GGT AGT AGA TGT TGC GGA G
AMV248downrv	<i>Kpn</i> I	<u>GGG GTA CCC</u> GAC TGA GAT CCT TAA ATT AAA GC
Gfpfw	<i>Bam</i> HI	<u>CGG GAT CCG</u> TAC TGT CGA AAC ATC TAA C
Gfprv	<i>Hind</i> III	<u>CCC AAG CTT</u> GAA TTC TCA CTT GTA CAG CTC

Primerlere eklenen restriksiyon enzim kesim bölgeleri altı çizili olarak belirtilmiştir.

2.9.2. Transfer Vektörünü Oluşturmak İçin Çoğaltılan DNA'ların Birleştirilmesi

Glikozil transferaz ORF (*amv248*)'sinin PCR ile çoğaltılan 666 bp'lik baş kısmı (AMV248up), çoğaltılan primerlerdeki ve pBlueScript SK (-) vektöründeki kesme bölgeleri (*Xba*I ve *Bam*HI) kullanılarak kesim işlemine tabi tutuldu.

Kesim reaksiyonu:

10 µl DNA (pBlueScript SK(-) ve *amv248* baş kısım PCR ürünü)

1 µl *Xba*I

1 µl *Bam*HI

2 µl TA tampon 10x

6 µl ddH₂O karışımı, hem pBlueScript SK(-) için hem de *amv248* baş kısmının

PCR ürünü için iki ayrı tüpte hazırlandı. Tüplerin içeriği, hafifçe karıştırıldıktan sonra, 37 °C'de 2 saat inkübe edilerek enzimlerin reaksiyonu sağlandı. İki saatin sonunda her bir tüp içeriği %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Enzimlerle kesilip sonra elektroforez edilen pBlueScript SK(-) vektörün ve *amv248* baş kısmının oluşturduğu bantlar, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürünün jelden temizlenmesi, DNA temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) ve bu kitte bulunan uygulama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Kontrol işleminden sonra, jelden temizlenen DNA'lar, 3:1 PCR ürünü : vektör oranında (0,3 µg DNA ve 0,1 µg pBlueScript) tüpe konularak klonlama gerçekleştirildi.

Reaksiyon,

2 µl pBlueScript SK(-) vektörü,

10 µl 2x ligasyon tamponu,

1 µl T4 DNA ligaz (Promega) ve

7 µl DNA (AMV248up) bir araya getirilerek 20 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Glikozil transferaz geninin baş bölgesinin klonlandığı plazmidleri hücreye aktarmak için, Bölüm 2.3.3.4'de anlatılan metoda göre hazırlanan kompetent *E. coli* DH10β hücreleri kullanıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerden gece kültürleri hazırlandı. Plazmid DNA'larının izolasyonu için, Bölüm 2.3.3.4'de anlatılan metoda göre hızlı miniprep metodu kullanıldı.

İzole edilen plazmid DNA'ların glikozil transferaz geninin baş bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Kesim işlemi için yukarıdaki yöntem kullanıldı. Ardından %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Kesim sonucu istenilen DNA parçalarını içeren klonlar belirlendi. Belirlenen klonlardan genin yukarı bölgesini içeren pBS-AMV248up kodlu klon, genin aşağı bölgesi olan AMV248down PCR ürününü klonlamak üzere ayrıldı, DNA dizi analiziyle klonun sırası doğrulandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

pBS-AMV248up kodlu klon ve glikozil transferaz ORF'sinin PCR ile çoğaltılan 801 bp'lik aşağı kısmına (AMV248down) ait PCR ürünü, yukarıda açıklanan yönteme göre, *Hind*III ve *Kpn*I enzimleriyle kesildi. Kesilen DNA parçaları, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden temizlendi. Temizlenen DNA'lar %1'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, daha önce jelden temizlenen DNA sıralarının ligasyonu sağlandı. Ligasyon ürünü, Bölüm 2.3.3.4'de belirtilen metoda göre hazırlanan *E. coli* DH10β suşuna, aktarıldı.

AMV248up için pBlueScript SK(-) vektöre transformasyonda, bu vektörde bulunan *lacZ* geni parçalandığı için, AMV248down PCR ürününün pBS-AMV248up vektöre transformasyonundan sonra, bu kez beyaz kolonilerden rastgele ekim yapıldı. Beyaz koloniler üreten suşlardan, hızlı miniprep yöntemi ile plazmid DNA'larının izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidlerin doğrulanması için, *Hind*III ve *Kpn*I restriksiyon enzimleriyle kesim işlemi yapıldı. Ardından %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Kesim sonucu istenilen DNA sıralarını içeren klonlar belirlendi. Belirlenen klonlardan

pBS-AMV248up-down kodlu klon, *gfp* genine ait PCR ürününü klonlamak üzere ayrıldı, DNA dizi analiziyle sırası doğrulandı ve stoklandı.

pDU20*gfp* transfer vektöründen PCR yöntemiyle, sferoidin promotoruyla beraber çoğaltılan *gfp* geni, jelden temizlendi ve sferoidin promotorunun altında *gfp* genin içeren bu parça, Bölüm 2.3.3.4'de belirtilen metoda göre pGEM-T Easy vektöre klonlandı. Oluşturulan yeni vektör, pG-*gfp* olarak isimlendirildi ve DNA dizi analizi yaptırılarak *gfp*'nin DNA sırası doğrulandı.

pBS-AMV248up-down vektöre *gfp* geninin ligasyonunu sağlamak için, hem pBS-AMV248up-down hem de pG-*gfp* vektörler *Bam*HI ve *Hind*III enzimleriyle kesildi. Kesilen DNA parçaları, %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Gereken bantlar jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ürün jelden temizlendi. Temizlenen DNA'lar %1'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, daha önce jelden temizlenen DNA'lar, 3 DNA parçası: 1 vektör oranında (0,3 µg *gfp* ve 0,1 µg pBS-AMV248up-down) klonlandı. Ligasyon reaksiyonu,

2 µl pBS-AMV248up-down,

10 µl 2x ligasyon tamponu,

1 µl T4 DNA ligaz (Promega) ve

7 µl DNA (*gfp*) bir araya getirilerek 20 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi.

Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ligasyonu yapılan DNA'nın, önceden hazırlanan elektrokompotent *E. coli* DH10β suşuna, elektrotransformasyonu sağlandı. pBlueScript SK(-) vektörden pBS-AMV248up-down vektörün oluşturulmasından sonra, bu ticari vektördeki doğal *lacZ* geni parçalandığı için, *gfp*'nin pBS-AMV248up-down vektöre transformasyonundan sonra, yine beyaz kolonilerden rasgele ekim yapıldı. Bunlardan, hızlı miniprep yöntemine göre plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmidlerin doğrulanması için, *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesim işlemi yapıldı. Kesim sonucu, istenilen DNA parçalarını içeren klonlar, agaroz jelde belirlendi.

Belirlenen klonlardan pBS-AMV248up-down-*gfp* kodlu klon ayrıldı, pBS-AmΔgt/*gfp* olarak adlandırıldı ve stoklandı. Böylece glikozil transferaz geninin askı bölgelerine ve işaret olarak GFP'yi üreten, *gfp* genine sahip rekombinant plazmid oluşturuldu. Plazmidler, *E. coli* DH10β hücrelerinde bol miktarda üretildi ve daha sonra transfeksiyon deneyinde kullanıldı.

enfeksiyon sıvısı (FBS'siz besiyeri ve 6 µl virüs ($7,76 \times 10^8$ pfu/ml AMEV virüs)) ilave edildi. Hücreler, enfeksiyon sıvısı ilave edildikten sonra, 2 saat oda sıcaklığında 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, iki ayrı tüpte transfeksiyon karışımı hazırlandı. Tüplerden birinde, 5 µg DNA (pBS-AmΔgt/gfp) son hacim 100 µl olacak şekilde FBS'siz besiyeriyle seyreltilti. Diğer tüpe ise 85 µl FBS'siz besiyeri ve 15 µl lipofektin (Invitrogen, Kat No: 18292-011) bırakıldı. Her iki tüp oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve bekleme süresinin sonunda, tüp içerikleri birbirine karıştırıldı. Bu transfeksiyon karışımı, karıştırıldıktan sonra 20 dakika daha bekletildi. Diğer yandan, hücrelerin üzerinden enfeksiyon sıvısı alındı ve hücreler FBS'siz besiyeriyle yıkandı. Hazırlanan 200 µl'lik transfeksiyon karışımı ve 800 µl FBS'siz besiyeri hücrelerin üzerine bırakıldı. Tekrar 5 saat oda sıcaklığında 2,5 rpm'de sallandı. 5 saatin sonunda eski besiyeri çıkarıldı ve 2 ml FBS'li besiyeri eklenerek 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında, Axiovert floresan inverted mikroskop ile bakılarak hücrelerde yeşil rengin oluşumu, yani sferoidin promotörü sayesinde sentezlenen GFP proteininin ortaya çıkışı beklendi.

Yaklaşık 5 gün sonra, ortamdaki GFP proteinin çokluğuna bakılarak yeterince rekombinant virüs üretildiği tahmin edildi. Hücreler, besiyeriyle toplandı ve 1.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek rekombinant virüsler (AmΔgt/gfp) hasat edildi.

2.9.3.2. Rekombinant AMEV'in Seçimi ve Saflaştırılması

Transfeksiyon işleminden sonra elde edilen virüs süspansiyonu, rekombinant virüslerin (*gfp* genini ve glikozil transferaz geninin askı bölgelerini içerenleri) yanı sıra, yaban tip AMEV'leri de içermektedir. Karışık süspansiyondan rekombinantları seçmek için, virüs süspansiyonu Ld652 hücrelerine inoküle edildi ve rekombinant virüsler "plak deneyi" ile seçilerek saflaştırıldı (Dulbecco ve Vogt 1953).

Plak deneyi için, Ld652 hücreleri, $1,7 \times 10^6$ olacak şekilde son hacim 1,5 ml'ye ayarlanarak, 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücrelerin tabana tutunması için yaklaşık 4-5 saat 28 °C etüvde bekletildi. Daha önce üretilen rekombinant AMEV (AmΔgt/gfp) virüsten, besiyeri ile son hacim 900 µl olacak şekilde seyreltikler (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) hazırlandı. Her bir seyreltik virüs solüsyonu, farklı bir gözdeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Hücre-virüs karışımı, iki saat 2,5 rpm'de sallanarak, virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. İki saatin sonunda, enfeksiyon sıvısı uzaklaştırıldı ve hücreler, FBS içermeyen besiyeri ile yıkanarak tutunmayan virüslerin deney ortamından uzaklaştırılması sağlandı. Daha önceden, %2,5 olacak şekilde Sea plaque agaroz (Lonza Katalog no:

50101) ddH₂O'da çözüldü. Hazırlanan karışım, mikrodalga fırında eritildi, otoklavlandı ve 45 °C'lik su banyosuna bırakıldı. Agarozun uygun sıcaklığa (hücreleri yakmayacak ve dökülmeden önce donmayacak) gelmesinden sonra, 1 hacim agaroz : 1 hacim besiyeri olmak üzere yeni bir karışım hazırlandı. Üzerinden enfeksiyon sıvısı alınan hücrelerin üzeri, 2,5 ml agaroz-besiyeri karışımıyla kaplandı. Agarozun tamamen donması için, kapağı açık şekilde bekletildi. Agaroz donduktan sonra kapak kapatıldı. Hücre kültür kabı, ddH₂O ile ıslatılmış peçetelerle birlikte bir kutuya yerleştirildi ve 28 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Plak oluşumu Axiovert floresan inverted mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Yaklaşık üçüncü günde, floresan mikroskop ile görülebilen GFP içeren plaklar gözlenmeye başladı. Bir hafta sonra, bu yeşil renkli GFP içeren plaklardan alınan virüsler çoğaltıldı ve bu çoğaltılan virüs süspansiyonu kullanılarak bir sonraki plak işlemi yapıldı. Ardışık şekilde yapılan altı plak işleminden sonra, saf AmΔgt/gfp virüsü elde edildi.

2.9.3.3. Rekombinant Virüs Stokunun Hazırlanması

Rekombinant AMEV (AmΔgt/gfp) hazırlandıktan sonra, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere rekombinant virüsün çoğaltılmasına başlandı. Bu çalışma için, üç adet T75 flaska, 9x10⁶ olacak şekilde Ld652 hücresi bırakıldı. Hücreler, tabana tutunmaları için, 3-4 saat etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra, her bir flaskadaki hücreler, son hacim 2 ml olacak şekilde 30 µl saf AmΔgt/gfp virüsle enfekte edildi. Hücreler, 28 °C'de enfeksiyon belirtileri gözleninceye kadar bekletildiler. Enfeksiyondan 3 gün sonra, hücrelerin içerisinde belirgin granüllerin ve nükleus kararmalarının olduğu gözlemlendi. Hücrelerin %100 oranında enfekte olduğu gözlenince (8 gün sonra), hücre sıvısı toplandı ve 1.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen rekombinant virüs süspansiyonu, 4 °C'de, karanlık ortamda muhafaza edildi.

AmΔgt/gfp'nin saflaştırılması ve stokunun yapılması çalışmalarından sonra, üretilen virüsün konsantrasyonunun tayini Bölüm 2.2.2'de belirtilen metoda göre gerçekleştirildi.

2.9.3.4. *amv248*'in AMEV Genomundan Silindiğinin PCR ile Doğrulanması

Transfeksiyon ve onu takip eden enfeksiyonlarda her ne kadar GFP proteininin varlığı, *amv248*'nin yokluğu olarak değerlendirildiyse de *amv248*'nin AMEV genomundan tamamen silindiğini doğrulamak gerekmektedir. Bunun için, hem yaban tip AMEV'den

hem de oluşturulan AmΔgt/gfp virüsünden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar, PCR işlemi için kalıp olarak kullanıldı. Hem AMEV DNA'sında hem de AmΔgt/gfp DNA'sında ortak olan, AMV248upRv (5'-GCT CTA GAG CGA AGA TTT TTC AAC AAC AG-3') ve GTUTR1-Rv (5'-CAA CAA AAA ACA ATA ATA TCA TTT ATC-3') primerleri kullanıldı. Bu primer çifti, yaban tip AMEV DNA'sıyla 1518 bp'lik bir sırayı çoğaltırken AmΔgt/gfp virüs DNA'sıyla 1737 bp'lik bir sırayı çoğaltacaktır. Aradaki yaklaşık 200 bp'lik fark, jel üzerinde analiz etmeye müsaade edecek kadar yeterlidir ve çıkarılan AMV248 sırasının, eklenen promotorlu *gfp* baz sırasından daha uzun olmasından kaynaklanmaktadır. PCR için uygulanan yöntem şöyledir:

PCR Karışımı:		PCR Koşulları:	
1,5 µl	Kalıp DNA	94 °C'de 3'	
1 µl	İleri primer (10 mM)		
1 µl	Geri primer (10 mM)	94 °C'de 1'	} 35 döngü
2 µl	dNTP (5 mM)	60 °C'de 30''	
3 µl	MgCl ₂ 50mM	72 °C'de 1'	
5 µl	Tampon 10x		
0,5 µl	DNA polimeraz (Fermentas)	72 °C'de 7'	
36 µl	ddH ₂ O	4 °C'de ∞	

Yaban tip AMEV ve AmΔgt/gfp kalıplarından elde edilen her bir PCR ürünü; Bölüm 2.3.3.4'de belirtilen metodlara göre jelden temizlendi, pGEM-T Easy vektöre ligasyonu sağlandı, *E. coli* JM101 kompetent hücrelere aktarıldı. Transformasyon sonucu oluşan beyaz kolonilerden ekim yapıldı. Seçim işleminden sonra her bir kalıp için belirlenen birer klonun, DNA dizi analizi yaptırıldı.

2.10. Oluşturulan Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Replikasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Tezin bu aşamasında glikozil transferaz geninin virüs replikasyonundaki rolünü anlamak için rekombinant virüsün DNA replikasyonu, toplam virüs üretim potansiyeli, protein profili ve belirlenen genlerin transkripsiyon seviyeleri belirlendi.

2.10.1. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) DNA Replikasyonunun Belirlenmesi

Rekombinant virüsün DNA replikasyonu, Slot-Blot Hibridizasyonu yöntemi ile DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Kat No: 11 745 832 910) kullanılarak belirlendi.

Çalışmanın başında, hibridizasyon işlemi sırasında kullanılacak olan prob hazırlandı. Prob olarak kullanılacak DNA sırasının, hem AmΔsph/gfp ve hem de AmΔgt/gfp ile homoloji sağlaması gerekmektedir. AmΔsph/gfp adlı virüs, spheroidin geni (*sph*) yerinde *gfp* geni taşıyan başka bir rekombinant virüstür. Ancak, sadece dış ortam şartlarında virüs partiküllerini koruyan bu genin eksikliği, virüsün hücre kültüründe büyümesine herhangi bir olumsuz etki oluşturmaz (Palmer vd., 1995). Prob hazırlamak için, başka bir çalışma için kullanılan pBS-AMV197SDR plazmidinden yararlanıldı. Bu vektör, her iki virüs için de 1051 bp'lik DNA sırası içermektedir ve hibridizasyon çalışmalarında prob olarak kullanılmaya uygundur. Yapılan bu tespitten sonra, pBS-AMV197SDR plazmidi kit yardımıyla izole edildi ve *HindIII* ve *KpnI* kesme bölgeleri kullanılarak, kesme işlemi sağlandı. Kesilen DNA parçaları, %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Gereken bant, jelden kesilip mikrosantrifüj tüpüne alındı ve jelden temizlenen DNA'lar %1'lik agaroz jelde elektroforez edilerek kontrol edildi.

Kontrol işleminden sonra, probun DIG-dUTP (Digoxigenin-dUTP) ile işaretlenmesi işlemine başlandı. Jelden temizlenen DNA'nın denatürasyonu, kaynamakta olan suda 10 dakika bekletilerek sağlandı. Hemen buz üzerine alınarak DNA'nın yeniden birleşmesi engellendi. Soğutulan DNA'ya 1/5 oranında, işaretli dUTP ilave edildi ve karıştırıldı. Bu karışım, işaretleme işleminin tamamlanması için, 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, karışım 65 °C'de 10 dakika bekletildi ve reaksiyon durduruldu. Hazırlanan prob, kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Diğer yandan, Ld652 hücreleri, 1×10^6 olacak şekilde 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. Hücreler, tutunma işlemi tamamlandıktan sonra, MOI:10 olacak şekilde, AmΔsph/gfp ve AmΔgt/gfp ile ayrı ayrı enfekte edildi. Enfekte edilen hücrelerden, 0, 6, 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde örnekler alındı. Belirlenen sürelerde, hücreler ve hücre sıvısı tamamen alınıp 800 x g'de, 10 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan pellet, 800 µl, 0,5 M sodyum hidroksit içinde lizis edildi. Lizis işleminden sonra 80 µl, 10 M amonyum asetat kullanılarak nötralizasyon sağlandı. Elde edilen lizatlar, bütün örnekler biriktirilinceye kadar 4 °C'de bekletildi. Bütün örnekler toplandıktan sonra,

örneklerin nitrosetüloz membrana (Hybond-N+ nylon membrane; Amersham-Biosciences, Kat No: RPN303B) geçirilmesi işlemine başlandı.

Her bir virüsten alınan ve 4 °C’de muhafaza edilen hücre lizatından, 100’er µl alınıp yeni bir tüpe bırakıldı. Tüpler, 10 dakika kaynayan suda bırakıldı ve kaynatma işleminden sonra hemen buza alınarak soğutuldu. Diğer yandan, membran uygun ölçülerde kesildi, 6xSSC (saline-sodium citrate) tamponunda 5 dakika yıkandı ve slot-blot cihazına (Hoefer Scientific Instruments) yerleştirildi. Kaynatılan örnekler, belli bir düzen içinde kuyucuklara yerleştirildi. Vakum yapılarak, kuyucuklardaki örneklerin membrana geçmesi sağlandı. Blotlama cihazından çıkarılan membran, 2xSSC ile 2 dakika yıkandı ve üç kat kurutma kağıdının arasında, oda ısısında 30 dakika kuruması için bırakıldı. Kurutma işleminden sonra, membran 80 °C’de 2 saat bekletilerek örneklerin iyice membrana tutunması sağlandı.

Probun hazırlanması ve örneklerin membrana emdirilmesi tamamlandıktan sonra, ön hibridizasyon işlemine başlandı. Önceden hazırlanan 15 ml’lik hibridizasyon tamponu, -20 °C’den çıkarılıp eritildi, kaynayan su içinde 10 dakika kaynatıldı ve hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Örneklerin emdirildiği membran, hibridizasyon şişesine alındı. Soğutulan hibridizasyon tamponu, şişedeki membranın üzerine boşaltıldı. Hibridizasyon fırınına yerleştirilen şişe, 42 °C’de, 16 saat, döner durumda bırakılarak ön hibridizasyon sağlandı.

Ön hibridizasyon süresinin sonunda, yeni bir hibridizasyon tamponu daha -20 °C’den alındı, eritildi. Eritilen tamponun içine, daha önceden hazırlanan işaretli probdan 5 µl eklendi ve karıştırıldı. Probun eklendiği tampon, kaynayan su içinde 10 dakika kaynatıldı ve tampon-prob karışımı hemen buza alınarak hızlıca soğutuldu. Diğer yandan, hibridizasyon şişesinden ön hibridizasyon sıvısı boşaltıldı. Yerine, işaretli proba beraber hazırlanan hibridizasyon tamponu eklendi ve şişe yine 42 °C’de, 16 saat, hibridizasyon fırını (Nüve) içersinde döner durumda bırakılarak probun membrandaki örneklerle hibridizasyonu sağlandı.

İşaretli prob ile viral örneklerin hibridizasyonu tamamlandıktan sonra, bağlanan probun görünür hale getirilmesi işlemine başlandı. Hibridizasyon şişesinden alınan membran, yıkandı ve bağlanmayan problemler uzaklaştırıldı. Yıkanan membran, bloklama solüsyonundan geçirilerek, kullanılacak antikora özgü olmayan membrandaki bağlanma bölgeleri kapatıldı ve membran, bu kez antikor solüsyonuna (Anti-Digoxigenin-AP) bırakıldı. DIG ile antikorların bağlanması sağlandıktan sonra, membran yeniden yıkama

işlemine tabi tutuldu ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Membran, tespit tamponunda yıkama işleminden sonra, renk tamponunda renk oluşumu gözleninceye kadar karanlıkta bırakıldı. Renk oluşumu tamamlandıktan sonra, membran tarandı ve görüntüsü kaydedildi.

2.10.2. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Enfektivitesinin Belirlenmesi

Glikozil transferaz geninin fonksiyonunu belirlemek amacıyla bu genden mahrum rekombinant AmΔgt/gfp'nin enfektivitesi, AmΔsph/gfp ile karşılaştırılarak belirlendi. Bu deneyde, hem AmΔsph/gfp hem de AmΔgt/gfp virüsün GFP proteininin üretimi, aynı sferoidin promotörü tarafından sağlandığı için, GFP proteininin belirlenmesi açısından, AmΔsph/gfp virüsü pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Deney sırasında, Ld652 hücreleri, her iki tip virüs ile MOI:10 olacak şekilde, enfekte edildi. Enfekte edilen hücrelerden, 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde üretilen yeni virüsler alındı ve her birinin konsantrasyonu 96 gözlü hücre kültür kaplarında EPDA deneyi ile belirlendi. Deneyler, üç tekrar olarak yapıldı ve elde edilen ortalama değerler kullanılarak grafik hazırlandı.

2.10.3. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Protein Profilinin Belirlenmesi

amv248 geninin virüsün hücre giriş mekanizması için önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu genin dizisinin AMEV genomundan silinmesi sonucu protein profilinde değişimler olması muhtemeldir. Bu amaçla rekombinant virüs ile AmΔsph/gfp virüs protein profilleri karşılaştırıldı. Bu amaçla daha önceki çalışmalarda üretilen virüslerden eşit miktarda alınarak Bölüm 2.5.1.8'de belirtildiği üzere SDS-PAGE jeline yüklendi ve elektroforeze tabii tutuldu. Ardından oluşan bant profillerinin incelenmesi amacıyla jel "gümüş boyama" yöntemine göre boyandı (Morrissey 1981).

2.10.4. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Transkripsiyon Özelliğinin Belirlenmesi

Rekombinant virüsün yaban tip virüs ile transkripsiyon seviyesinde karşılaştırılması amacıyla seçilmiş olan 4 genin transkripsiyon seviyeleri kantitatif PCR (qPCR) metodu ile belirlendi. qPCR analizinde rekombinant virüsün doğrulanması amacıyla *amv248* ve *gfp* genleri; yaban tip ve rekombinant virüsün transkripsiyonel karşılaştırılması amacıyla *sph*

ve *amv217* genleri; reaksiyonun normalizasyonu amacıyla referans olarak hücresel GAPDH geni kullanıldı. Bu amaçla kullanılan primer çiftleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. qPCR için kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
gfp-qFw	GGG TCT TGT AGT TCC CGT CA
gfp-qRev	ATG CCA CAT ACG GAA AGC TC
amv248-qFw	TGG GAA CTA CCA TCA AAT CAA CC
amv248-qRev	CAA CCC ATC GAA ACG TGA AAC
amv217-qFw	GGA GCG TCC GCA AGT ATT AAT A
amv217-qRev	CTT CTT GTT TTT GTT CAA AAG TTA AAT T
sph-qFw	GGA AGA GGA GCG TGG GTT GTT A
sph-qRev	TTC AGC TGC ACA TGT TTC GCA T
GAPDH-qFw	ACC CAA AAG ACT GTC GAT GG
GAPDH-qRev	TGA GGT CGA CAA CGG ATA CA

Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı üzere Ld652 hücreleri hem rekombinant hem de yaban tip virüslerle enfekte edildi. Enfeksiyonu takiben 24 saat sonrasında Bölüm 2.3.1’de belirtilen metoda göre RNA izolasyonu yapıldı. Bu RNA’lar kullanılarak oligo-dT primer ile cDNA kütüphanesi sentezi gerçekleştirildi. Ardından bu cDNA kalıp olarak kullanılarak qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi (BioRad CFX Connect). Bu amaçla kullanılan PCR karışım miktarları ve PCR koşulları şu şekildedir:

PCR Karışımı:

1 µl	Kalıp cDNA
1 µl	İleri primer (20 mM)
1 µl	Geri primer (20 mM)
4 µl	5X mastermix (Solis Biodyne Evagreen)
13 µl	ddH ₂ O

qPCR Koşulları:

94 °C’de 3’	} 45 döngü
94 °C’de 1’	
60 °C’de 30’’	
72 °C’de 1’ okuma	

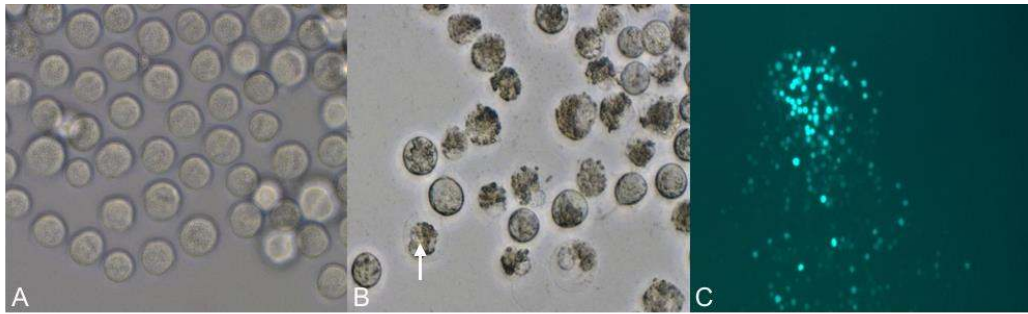
PCR reaksiyonunu takiben primer erime sıcaklık eğrisi 65 °C – 95 °C aralığında her bir döngü sonu okuma alınıp sıcaklık 0,5 derece artırılarak oluşturuldu.

3. BULGULAR

3.1. Virüslerin Hücre Kültüründe Çoğaltılması ve Konsantrasyonlarının Tayini

3.1.1. Virüslerin Çoğaltılması

Yaban tip *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) ve hücre kültürü enfeksiyonu için gerekli olmayan sferoidin geni (*sph*) yerine viral enfeksiyon takibinin kolaylaşması için yeşil floresan proteini geni (*gfp*) eklenmiş rekombinant *Amsacta moorei entomopoxvirus* (Am Δ sph/gfp) ile enfekte edilen Ld652 hücrelerinde enfeksiyonu takiben 5 gün boyunca enfeksiyon belirtileri gözlemlendi (Şekil 14). Enfeksiyon yapılmayan hücreler (Şekil 14a) bu süre sonunda sağlıklı, granülsüz ve parçalanmamış görünürken, yaban tip virüs ile enfeksiyon olan hücrelerin (Şekil 14b) karardığı, kısmen parçalandığı ve virüs replikasyonunun belirgin göstergesi olan granül şeklindeki inklüzyon cisimlerin oluştuğu gözlemlendi. Rekombinant virüs ile enfekte olan hücrelerde ise (Şekil 14c) yaban tip virüs ile enfekte olan hücrelerdeki görüntünün yanısıra yeşil floresan görüntülü granüller gözlemlendi. Yaban tip ve rekombinant virüs ile enfekte olan hücrelerde gözlemlenen bu durumlar virüs üretiminin her iki virüs için de başarılı olduğunu gösterdi. Böylece, kültür kaplarından virüs hasadı yapıldı ve elde edilen viral süspansiyonlar virüs konsantrasyonunu tespit etmek ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 14. Yaban tip *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) ve rekombinant virüs (Am Δ sph/gfp) ile *Lymantria dispar* (Ld652) hücrelerinin enfeksiyonu. (A) Enfeksiyon yapılmayan kontrol hücreler ve (B) yaban tip AMEV ile enfekte olmuş Ld652 hücrelerinin ışık mikroskobu altında görüntüsü, (C) Am Δ sph/gfp ile enfekte olmuş Ld652 hücrelerinin floresan mikroskobu altında görüntüsü (Zeiss Axiovert 200M). Ok: inklüzyon yapıları göstermektedir.

3.1.2. Enfeksiyonlarda Kullanılan Virüslerin Konsantrasyonlarının Tayini

Virüs süspansiyonlarının konsantrasyonu son nokta seyreltme metoduyla (EPDA) gerçekleştirildi. EPDA deneyinin sonuçları, her bir gözdeki enfekte olmuş tek bir hücrenin dahi olup olmamasına göre her kuyuya + (artı) veya – (eksi) değer verilerek kayıt edildi. Virüs konsantrasyonu (titer), aşağıdaki EPDA formülü ve elde edilen değerler kullanılarak hesaplandı.

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

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

a=log n; b=n. seyreltiğin % değeri,

c=n. değer altındaki % değeri;

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

Yapılan hesaplamalar sonucunda, üretilen AMEV virüs süspansiyonunun konsantrasyonu $7,76 \times 10^8$ pfu/ml olarak, üretilen AmΔsph/gfp rekombinant virüs süspansiyonunun konsantrasyonu ise $1,35 \times 10^7$ pfu/ml olarak belirlendi.

3.2. *amv248* Geninin Yapısı ve Transkripsiyonu

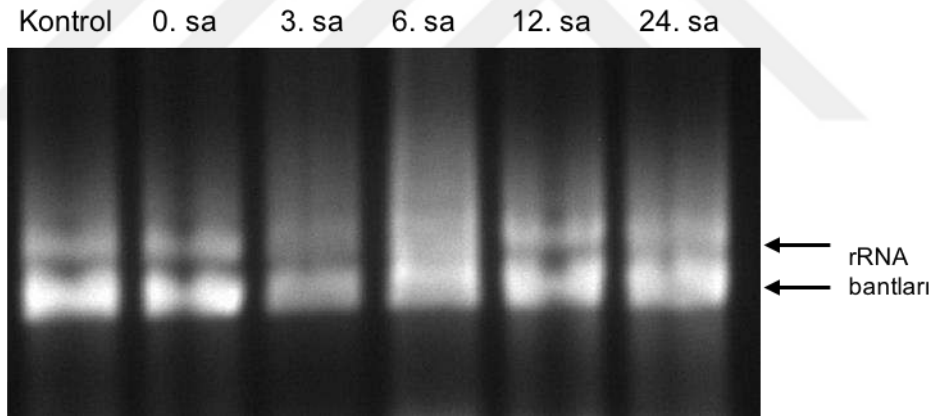
3.2.1. *amv248* Geninin Transkripsiyon Zamanı

Glikozil transferaz geninin (*amv248*) transkripsiyonunun enfeksiyondan sonra başladığı zamanı belirlemek amacıyla yaban tip virüs ile enfekte olan ve enfekte olmamış Ld652 hücrelerinden 5 farklı zaman diliminde RNA izolasyonları yapıldı ve bu RNA'ların miktarları belirlendi. Elde edilen RNA miktarları Tablo 7'de gösterilmektedir. RNA örneklerinin konsantrasyonlarının $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'nin üzerinde, saflıklarının (260/280) 1,8 ile 2,00 arasında olması bu örneklerin çalışmalarda kullanılabilecek yeterlilikte olduğunu göstermektedir.

Tablo 7. *amv248* geninin transkripsiyon zamanının belirlenmesi için izole edilen RNA örneklerinin özellikleri.

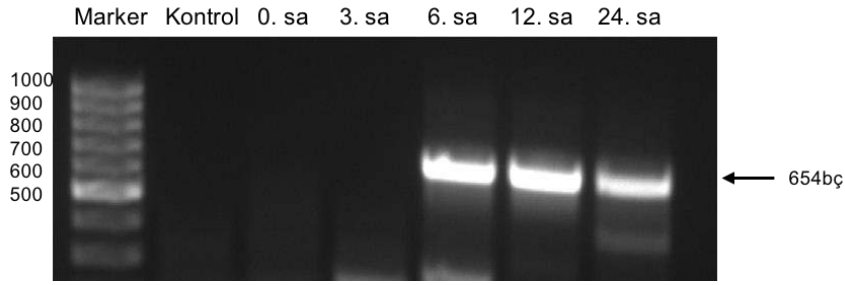
Örnek Adı (enfeksiyon sonrası)	RNA Miktarı (µg/ µl)	260/280 Absorbans Değeri
Kontrol	2,405	2,01
0. Saat	2,455	1,88
3. Saat	1,438	1,87
6. Saat	2,217	1,86
12. Saat	2,303	1,97
24. Saat	2,448	1,92

Elde edilen bu RNA'lar daha sonra %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 15). Jelde yürütülen RNA örneklerinin görüntülenmesiyle böcek hücrelerinin tipik rRNA bantları olan çift bandın (28S ve 18S rRNA bantları) belirgin olarak görünmesi örneklerin parçalanmamış olduklarını gösterdi.



Şekil 15. *amv248* geninin transkripsiyon zamanını belirlemek için izole edilen toplam RNA örnekleri.

RNA örneklerinin çalışmada kullanılabileceklerine karar verdikten sonra, RNA'lar kalıp olarak kullanılarak AMV248R primeri ile cDNA'lar oluşturuldu. Daha sonra bu cDNA'dan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapılarak istenilen gen (*amv248*) bölgesinin çoğaltılması sağlandı. Bu PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve beklenen yaklaşık 654 bp'lik bantlar fotoğraflandı (Şekil 16).



Şekil 16. *amv248* geninin transkripsiyon zamanı. Marker: moleküler ağırlık standardını, Kontrol (enfekte olmamış hücreden alınan örneği) ve rakamlar (0-24) ise enfeksiyonun başlamasından sonra geçen süreyi göstermektedir.

Bu jel görüntüsü, *amv248* geninin transkripsiyonunun enfeksiyonun başlamasından sonra 3. ve 6. saatler arasında başladığını ve enfeksiyonun ilerleyen saatlerinde de devam ettiğini göstermektedir.

3.2.2. *amv248* Geninin Transkripsiyon Sınıfı

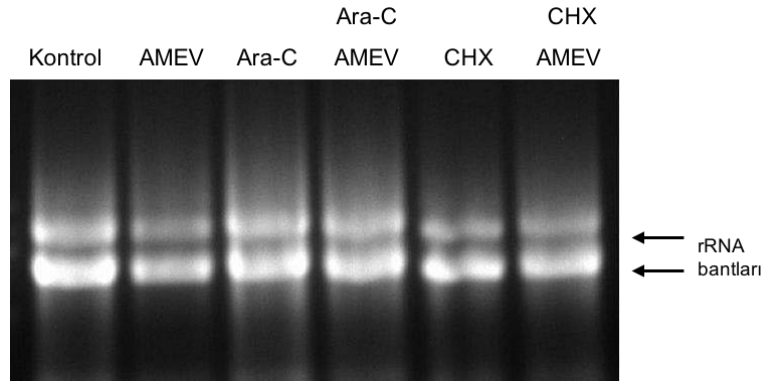
Glikozil transferaz geninin (*amv248*) transkripsiyon sınıfını belirlemek amacıyla DNA sentez ya da protein sentez inhibitörü varlığında ve yokluğunda yaban tip virüs ile enfekte edilen Ld652 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve bu RNA'ların miktarı belirlendi. Elde edilen RNA miktarları Tablo 8'de belirtildi.

Tablo 8. *amv248* geninin transkripsiyon sınıfının belirlenmesi için izole edilen RNA örneklerinin özellikleri.

Örnek Adı	RNA Miktarı (µg/ µl)	260/280 Absorbans Değeri
Kontrol	2,333	2,00
Ld AMEV	2,102	1,91
Ld Ara-C ^a	2,693	2,02
Ld AMEV+Ara-C ^a	1,001	1,89
Ld+CHX ^b	2,012	1,94
Ld AMEV+CHX ^b	0,888	1,99

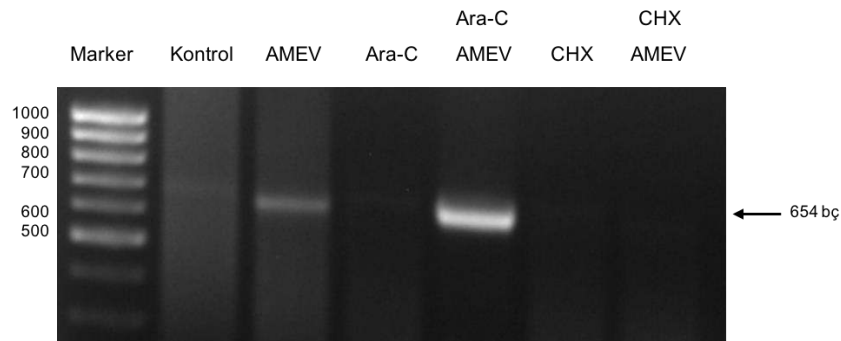
a) DNA sentez inhibitörü olan Ara-C varlığında yaban tip virüs ile enfekte olmuş (AMEV+AraC) ve olmamış (Ld+Ara-C) Ld652 hücrelerinden elde edilen RNA örneklerini, b) protein sentez inhibitörü olan sikloheksimid varlığında yaban tip virüs ile enfekte olmuş (AMEV+CHX) ve olmamış (Ld+CHX) Ld652 hücrelerinden elde edilen RNA örneklerini göstermektedir.

Elde edilen RNA'ların yeterli konsantrasyonlarda ve saflıkta oldukları görüldükten sonra %1'lik agaroz jelde yürütülerek parçalanmadıkları görüntülendi (Şekil 17).



Şekil 17. *amv248* geninin transkripsiyon sınıfını belirlemek için izole edilen toplam RNA örnekleri. Kontrol: Enfeksiyon yapılmamış Ld652 hücrelerini, Ara-C ve CHX sırasıyla DNA ve protein inhibitörlerini, AMEV: Enfeksiyonda kullanılan yaban tip virüsü göstermektedir.

Yeterli konsantrasyonda ve parçalanmamış oldukları anlaşıldıktan sonra, RNA'lar kalıp olarak kullanılarak AMV248R primer ile cDNA'lar oluşturuldu. Daha sonra bu cDNA'lardan PCR yapılarak istenilen gen bölgesinin çoğaltılması sağlandı. Bu PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve beklenen yaklaşık 654 bp'lik *amv248* genine ait bant görüntülendi (Şekil 18).



Şekil 18. *amv248* geninin transkripsiyon sınıfı. Kontrol: Enfeksiyon yapılmamış Ld652 hücrelerini, Ara-C ve CHX sırasıyla DNA ve protein inhibitörlerini, AMEV: Enfeksiyonda kullanılan yaban tip virüsü göstermektedir.

Bu jel görüntüsünden çıkarılan sonuca göre, Ara-C ile muamele edilen deney grubunda bant elde edilirken CHX ile muamele edilen grupta ise bant elde edilmedi. Genin protein sentez inhibitörü olan CHX varlığında transkripsiyonu engellenirken; DNA sentez inhibitörü olan Ara-C'nin varlığında transkripsiyonunun gerçekleşmesi, *amv248*'in *ara* (*intermediate*) gen sınıfına ait olduğunu gösterdi.

3.2.3. *amv248* Geninin Translasyona Uğramayan 5' ve 3' Bölgeleri (5'/3' UTR)

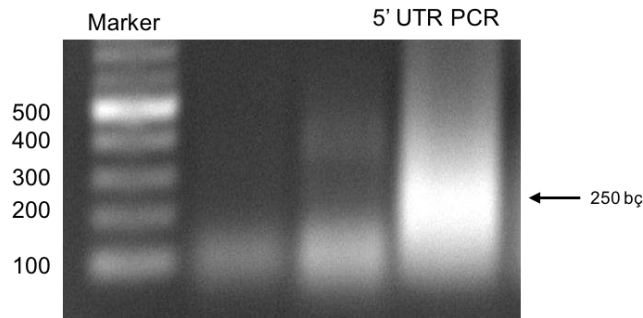
amv248 geninin yapısının aydınlatılması için genin 5' ve 3' kısımlarda translasyona uğramayan bölgelerinin (UTR) belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla *amv248* geninin UTR bölgelerinin belirlenebilmesi için aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

- *amv248* Geninin 5' ve 3' UTR Analizleri için RNA İzolasyonu

Hem 5' hem de 3' UTR bölgelerinin belirlenmesi amacıyla Ld652 hücreleri yaban tip AMEV ile enfekte edildi ve RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu nanodrop ile ölçülüp miktarı 2,4 µg/µl olarak ve saflığı (A260/280) 1.94 olarak belirlendi. Bu veriler elde edilen RNA'nın genin 5' ve 3' bölgelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir kalitede olduğunu göstermektedir.

3.2.3.1. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 5' Ucu

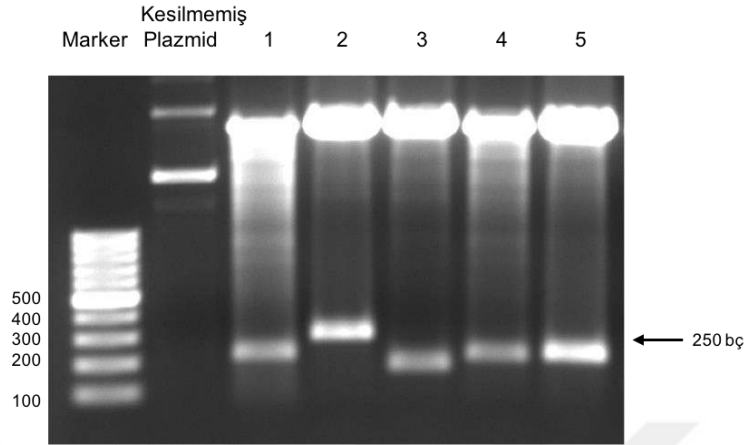
5' UTR bölgesinin belirlenebilmesi amacıyla öncelikle GTSP1 primeri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi ve ardından elde edilen cDNA'nın 3' ucuna poli G kuyruk takılıp oligo-dC ankor primeri ve GTSP2 primeri varlığında PCR reaksiyonu gerçekleştirilip ürün %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi. Elektroforez sonucunda, yaklaşık 250 baz çiftlik bir DNA fragmanı jelde görüntülendi (Şekil 19).



Şekil 19. *amv248* geninin 5'-UTR'sinin PCR ile çoğaltılması. Marker: moleküler ağırlık standardını, 5'UTR: Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan kopya DNA'yı göstermektedir.

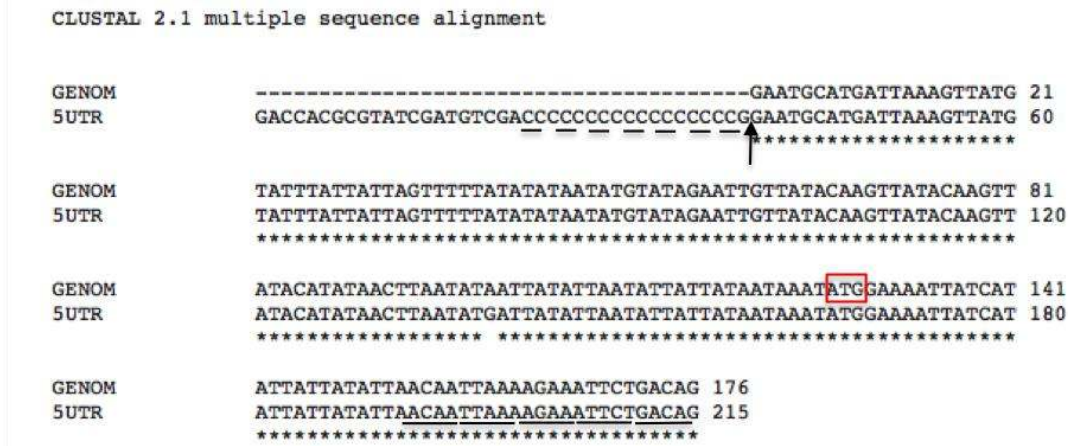
Jelden çıkartılıp temizlenen 250 bp DNA bandının daha sonra pGEM-T Easy vektöre ligasyonu sağlandı. Kompetent *E. coli* JM101 hücrelerine transformasyonu sağlanan ligasyon ürünlerinden elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı. Bu plazmidler

EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrulandıktan sonra (Şekil 20) dizi analizi yaptırılarak 5' proteine dönüşmeyen bölge belirlendi.



Şekil 20. *amv248* geninin 5'-UTR klonlarının restriksiyon analizleri. 1-5: *EcoRI* enzimiyle restriksiyon analizi yapılan örnekleri göstermektedir.

amv248 geninin 5' UTR bölgesinin belirlenmesi için elde edilen klonların dizi analizi sonuçları incelendi ve gen transkripsiyonunun AMEV genomunun 204704. sırasındaki guanin bazını takiben başladığı belirlendi. Buna göre, *amv248* geninin 5' UTR bölgesinin 126 baz uzunluğunda olduğu belirlendi (Şekil 21).

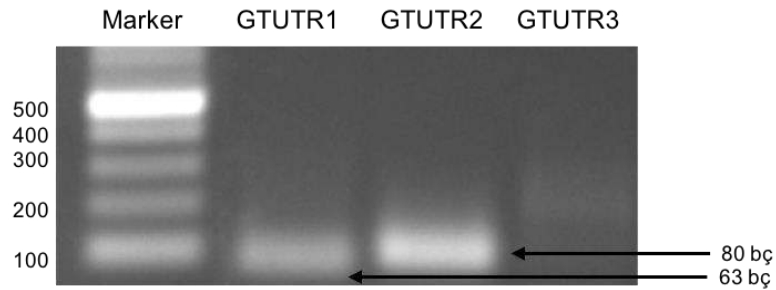


Şekil 21. *amv248* geninin 5' UTR dizisi. Kesikli çizgi: Ankor primerin ucundaki Poli C'yi; Kesikli Uzun çizgi: GTSP3 primerini; *: Doğru baz eşleşmeleri.

3.2.3.2. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin cDNA'sının 3' Ucu

AMEV genomunun AT nükleotidlerce zengin olduğu, UTR bölgelerinin belirlenmesinin güçlüğü göz önünde bulundurularak *amv248* geninin 3' UTR bölgesinin tahmini amacıyla bu bölgeye özgü 3 adet geri primer tasarlandı. Daha sonra Bölüm 2.3.3.2'de izole edilen viral RNA'dan 3'/5' RACE Kit (Roche) içeriğinde bulunan ankor primer yardımıyla Bölüm 2.3.1'de belirtilen metoda göre cDNA sentezlendi. Ankor primer yardımıyla üretilen cDNA kalıp olarak kullanılarak GTUTR1-Rv GTUTR2-Rv ve GTUTR3-Rv geri primerler ve GTSP6 ileri primeri varlığında PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulup görüntülendi.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, GTSP6 ileri ve GTUTR1-Rv geri primerleri ve GTSP6 ileri ve GTUTR2-Rv geri primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucu beklenen sırasıyla 63 ve 80 baz çiftlik DNA'lara ait bantlar elde edilirken GTSP6 ileri ve GTUTR3-Rv geri primeri ile hazırlanan PCR reaksiyon için ise DNA bandı elde edilmediği görüldü (Şekil 22). Bu durum *amv248* geninin muhtemel sonlanma bölgesinin GTUTR2-Rv ve GTUTR3-Rv primerlerini içeren dizilerin arasındaki bir bölgede olabileceğini işaret etmektedir.

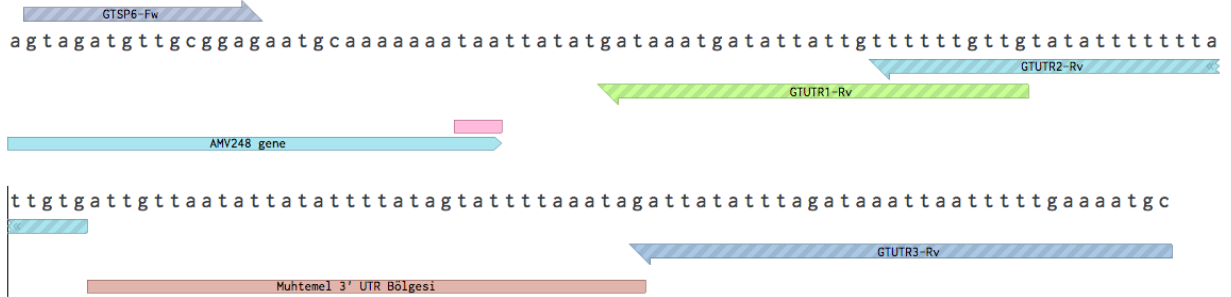


Şekil 22. *amv248* geninin 3' UTR'sinin çoğaltılması.

Elde edilen PCR bantları jelden temizlenip sırasıyla ligasyon, transformasyon, plazmid DNA izolasyonu, restriksiyon analizi işlemlerine tabi tutuldu ve klonların doğrulanması işlemleri gerçekleştirildi. Her iki ürün için de üçer örnek dizi analizine gönderildi.

Sonuçlar incelendiğinde, söz konusu klonların her iki ürün için gönderilen örneklerin de *amv248* geni için beklenen pozisyonadaki 3' UTR bölgesiyle %100 eşleştiği tespit edildi.

Bu sonuçlar, AMV248 geninin 3' proteine dönüşmeyen bölgesinin stop kodonundan (TAA) sonra bulunan 50. ve 84. bazlar (genomda 205750 - 205784) arasında olabileceğini gösterdi. Bu bilgiler ışığında *amv248* geni için muhtemel transkripsiyon sonlanma bölgesi Şekil 23'de gösterildi.



Şekil 23. *amv248* geni için muhtemel transkripsiyon sonlanma bölge dizisi. Muhtemel 3' UTR bölgesi kahverengi olarak işaretlenmiştir.

3.3. Proteinin Üç Boyutlu Yapısı ve Konak Hücre Tutunma Motiflerinin Biyoinformatik Analizi

3.3.1. Muhtemel Glikozil Transferaz Geninin (*amv248*) Biyoinformatik Analizi

amv248 geninin yapısı incelendiğinde (Şekil 24) 870 nükleotidden oluştuğu ve poksvirüs genomlarında belirtildiği üzere bu nükleotitlerin büyük bir çoğunluğunun (%79,9) adenin ve timin nükleotitlerini içerdiği bilinmektedir.

```
>gi|9964314:204830-205699 Amsacta moorei entomopoxvirus 'L', complete genome
ATGGAATAATTATCATATTATTATATTAACAATTAAAGAAATTCGACAGATTACAAAACTAGAAAATA
TATTATCTTGTCAAAATTTATTATATAATAAAGATTATAGTGTATTTTATGGAATAGATTATAAAATAT
AAATAAAATAATTTAAAAAATATATGTAAAAAAGGATTTAAAAACACATGTCCTTATTCAACTTTAGCA
TGTGCGTCATCACATATTCTATTATGGAATATATATCAAAATTAAGATAAATATAAATATATTATAA
TATTAGAAGATGATACATATATAAATGTATCAGAGTATAATAAACATACAAATACAGTTGAAGAATTATT
AAAAATAATAGTATAGTATTTTATATTCTGATTGTTATATAATGGGAACACCATCAAATCAACCAAC
AATGATACAAAAATAACATATAATCCAAAGTTTCACGTTTCGATGGGTGTTATTGTATAACACCAATCA
CTGCTACTAAATTATATTATTTCTATATAAAATCTAGAGTATGGTTCCACATAGATTTTCAATTAAATTT
TGATATACATAAATATATCATTAATAGATATATTTATATAGCTGCTAATGTATGTAATCAATTAAGGA
AATAAATCATCTATGGGTTTAAAAACATAAATAATATAATGTTAATACCTATAGAAAAATACAAAATTAATGA
GAATAATATCGACTCCTATTATAAGAGTTAATGAAGCTGAAATAGATTTTATATAATAAATATGTTAAT
CTCACTTATCGCTAGTTTATATTCTTTGGTTTAAATATTCTGCCTTAATATTTTATTATTATATAGTA
GTAGATGTTGCGGAGAATGCAAAAAAATAA
```

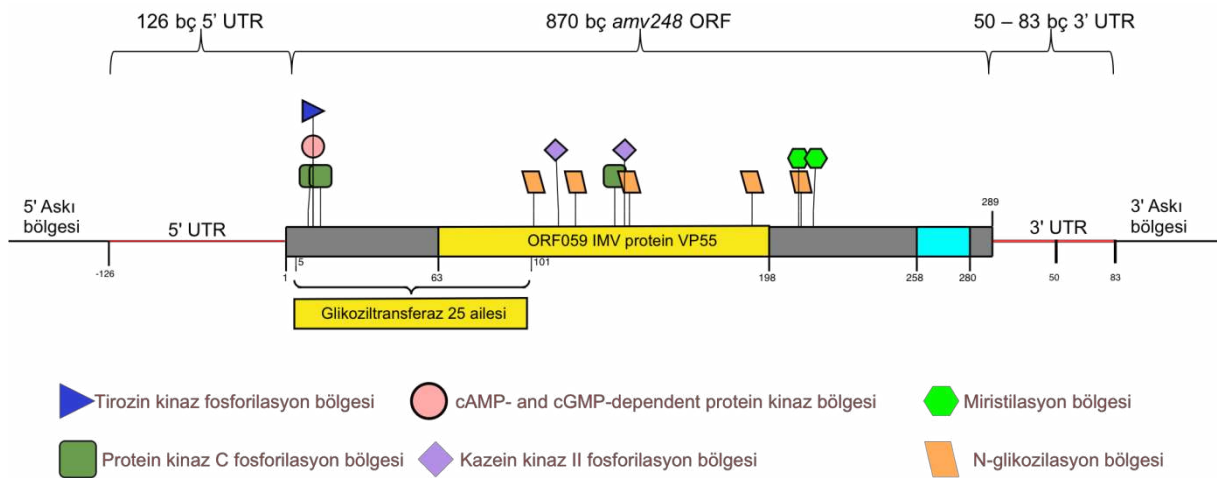
Şekil 24. *amv248* geninin nükleotit dizisi. Gen Bankası 1494838 kod numaralı dizi.

Ayrıca bu gen tarafından kodlanan proteinin (Şekil 25) ise 289 aminoasitten oluşan yaklaşık 33,8 kDa ağırlığında olduğu ve tahmini izoelektrik noktasının (pI) 8,97 olduğu görüldü (ExPASy Bioinformatics Resource Portal http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?Q9EMF8).

```
>gi|9964562|ref|NP_065030.1| putative glycosyl transferase [Amsacta moorei  
entomopoxvirus 'L']  
MENYHIIILTIKRNSDRLQKLENILSCQNLLYNKDYSVFYGYDYNKNNLKNICKKGFKNTCPYSTLA  
CASSHILLWKYISKLDKDYKYIIILEDPTYINVSEYNKHTNTVEELLKNNSIVFLYSDCYIMGTTIKSTN  
NDTKITYNPKFHVSMGCYCITPITATKLYYFYIKSRVWFHIDFQLNFDIHNISLNRYIYIAANVCNQYEG  
NKSSMGLKHNNIMLIPIENTKLMRIISTPIIRVNEAIDFYIIIMLISLIASLYFFGFNISALIFLLFIV  
VDVAENAKK
```

Şekil 25. AMV248 proteininin aminoasit dizisi. Gen Bankası NP_065030 kod numaralı dizi.

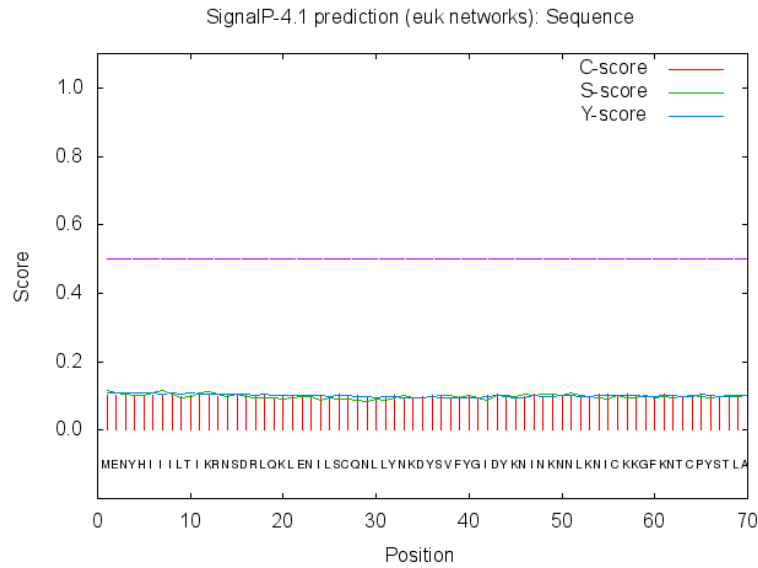
Protein dizisindeki korunmuş bölgeler incelendiğinde glikoziltransferaz 25 ailesine ait ve ORF059 IMV protein VP55 ailesine ait korunmuş bölgeler içerdiği belirlendi. AMV248 protein dizisi ScanProsite programı ile incelendi ve tirozin kinaz fosforilasyon, cAMP ve cGMP-bağımlı protein kinaz fosforilasyon, protein kinaz C, kazein kinaz II, N-glikozilasyon ve miristilasyon bölgeleri içerdiği belirlendi. Şekil 26'da belirtilen bu bölgeler IBS yazılımı ile şematize edildi (Liu vd., 2015).



Şekil 26. AMV248 protein dizisinin sahip olduğu domainler. Sarı renk ile taralı kısımlar korunmuş protein aile dizilerini, turkuaz renk ile taralı kısım ise transmembran heliks bölgesini belirtmektedir.

3.3.2. AMV248 Proteininin Sinyal Peptit İçeriği

Nükleotid ve protein dizi analizleri sonucunda *amv248* geninin bir membran proteini kodladığı belirlendi. 3 boyutlu yapı oluşturulması ve rekombinant protein üretilmesi sırasında bulunan sinyal peptidler ya da transmembran bölgelerinden kaynaklı sorunlar yaşanabileceği düşünülerek proteinin bu bölgeleri ihtiva edip etmediği araştırıldı. Bu amaçla SignalP programı kullanılarak yapılan analiz sonucunda proteinin herhangi bir sinyal bölgesi içermediği görüldü (Şekil 27). Sinyal peptidi içermeyen bu DNA parçasının ifade edilmek üzere kullanılabileceği belirlendi.

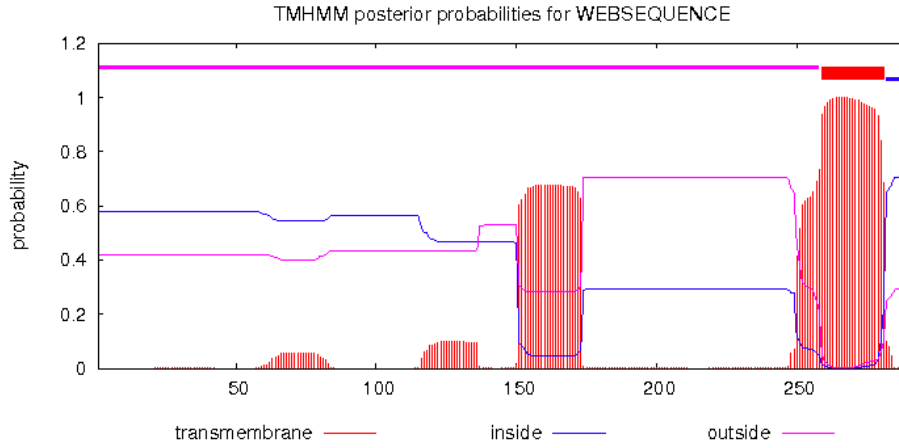


Şekil 27. AMV248 proteininin sinyal peptit analizi.

3.3.3. AMV248 Proteininin Transmembran Domein İçeriği

Proteinin transmembran içeriğinin belirlenmesi amacıyla transmembran heliks içerik tanımlama uygulaması (TMHMM Server v2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) kullanıldı. Yapılan analiz sonucunda *amv248* gen ürünü proteinin 259-281 aminoasitler arasında transmembran heliks yapısına sahip olduğu belirlendi (Şekil 28). Elde edilen sonuç incelendiğinde AMV248 protein yapısının büyük çoğunluğunun (258/289 amino asit) membran dışı bölgesinde lokalize olduğu görüldü.

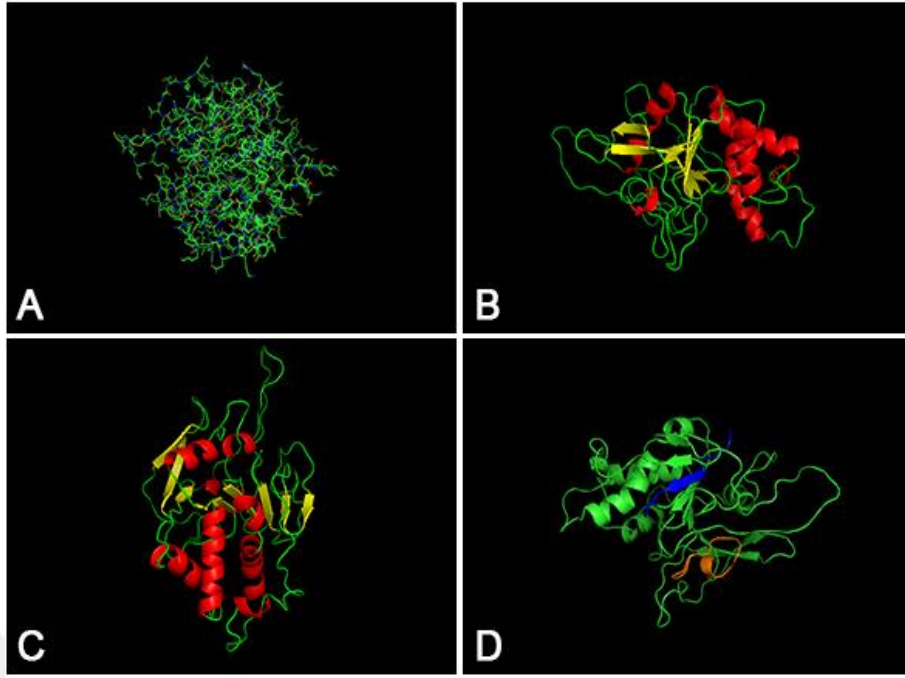
```
# WEBSEQUENCE Length: 289
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 46.36626
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.02462
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.57977
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 258
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 259 281
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 282 289
```



Şekil 28. AMV248 proteininin transmembran domein içeriği. Kırmızı pikler ile gösterilen kısımlar potansiyel transmembran bölgelerini içermektedir. Eşik değerin üstünde pike sahip (>1) bölge transmembran olarak işaretlenmiştir.

3.3.4. AMV248 Proteininin Üç Boyutlu Yapısı

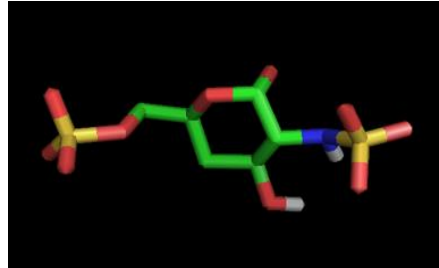
amv248 geninin Amerika Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) gen bankasında bulunan protein dizisi (NP_065030) incelenerek transmembran bölgesini içermeyen ektodomein kısmının 3 boyutlu yapısı tahmin edildi. Bu işlem için AMV248 proteininin H3 proteini için korunmuş olduğu belirlenen (Singh vd., 2016) “ExD” motifine sahip olması, her iki genin aynı protein ailesine üye olması ve AMV248’in H3 proteininin AMEV genomundaki analogu olması nedeniyle VACV H3 proteininin X-Ray ile belirlenen 3 boyutlu yapısı (PDB 5EJ0) kalıp olarak kullanıldı. 3 boyutlu modelleme MODELLER yazılımı ile homoloji modelleme tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Oluşturulan 3 boyutlu yapı PyMOL yazılımı ile görüntülendi (Şekil 29).



Şekil 29. AMV248 proteininin 3 boyutlu yapısı. A: 3 boyutlu yapının çizgiler şeklinde gösterilişi. B-C: 3 boyutlu yapının farklı açılardan şematik görüntüsü (kırmızı-heliks, Sarı-levha, Yeşil-loop yapıları temsil etmektedir). D: Mavi N-terminal ucu, Turuncu karboksil ucu göstermektedir.

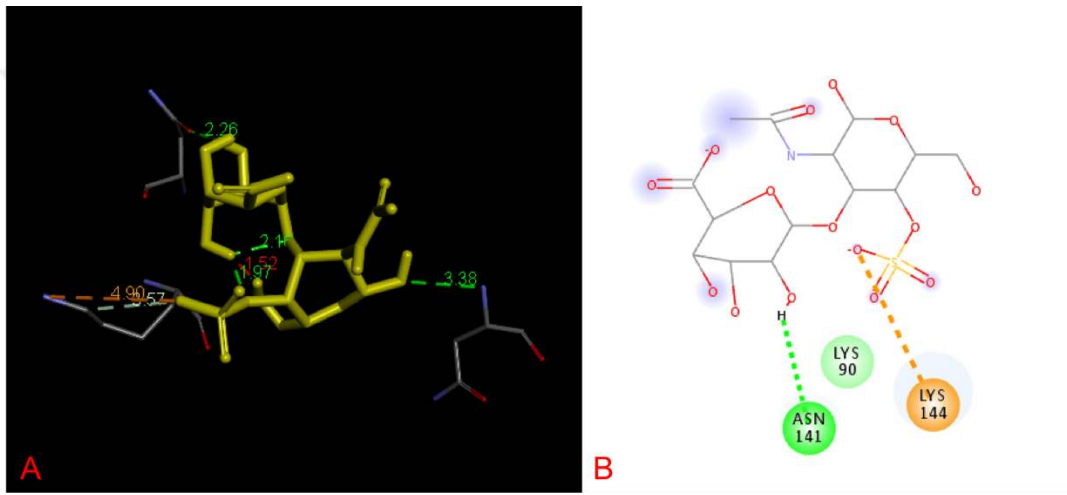
3.3.5. AMV248 Proteininin Konak Hücre Bağlanma Motifleri

AMV248 proteininin hücresel glikozaminoglikanlardan heparin ile bağlanma potansiyelini belirlemek amacıyla öncelikle heparin 3 boyutlu yapısı Accelrys Discovery Studio yazılımı ile çizildi ve PyMOL yazılımı ile görüntülendi (Şekil 30).



Şekil 30. Konak hücrelerin yüzeyinde bulunan heparinin 3 boyutlu yapısı.

Heparinin üç boyutlu yapısı tespit edildikten sonra, AMV248 proteini ile heparin molekülünün birbirine kenetlenmesi (docking) araştırıldı. Docking analizi için, AMV248 proteini makromolekül (reseptör) ve heparin molekülü ise ligand olarak belirlendi. Autodock ve AutoDockTools yazılımları yardımıyla kenetlenme tespit edildi. Docking analiz sonucu incelendiğinde docking analiz skorunun -9,12 kcal/mol olduğu belirlendi ve bu skorun docking analizinin başarılı olduğunu gösterdiği görüldü. Docking analizi sonucu elde edilen reseptör-ligand kompleksi Accelrys Discovery Studio yazılımı kullanılarak görüntülendi (Şekil 31).



Şekil 31. AMV248 ile heparin arasındaki muhtemel etkileşim bölgeleri. A) 3 boyutlu B) 2 boyutlu etkileşim diagramı. (Discovery Studio programı ile görüntülenmiştir). Şekil üzerindeki sayılar moleküller arasındaki uzaklığı Angstrom seviyesinde göstermektedir.

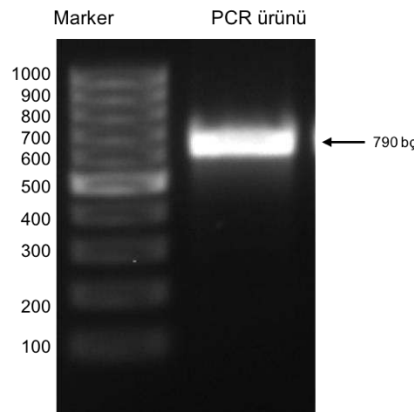
Şekil 31B’de gösterilen AMV248 proteininin konak hücrelerin yüzeyinde bulunan heparin molekülüyle bağlanma motifini oluşturan aminoasitleri 90. sırada bulunan lizin, 141. sırada bulunan asparajin ve 144. sırada bulunan lizin amino asitleridir. Bu aminoasitlerin biyokimyasal özellikleri incelendiğinde bilinen GAG bağlanma motiflerinde görülen bazik motifi oluşturan aminoasitler oldukları görüldü. Bu bilgi GAG bağlanma motifinin 3 boyutlu yapının oluşması sonucu oluştuğu görüşünü desteklemektedir.

3.4. Rekombinant AMV248 Proteininin Bakülovirüs Vektör Sisteminde İfadesi

Rekombinant AMV248 proteininin ökaryotik bir sistemde ifade edilmesi amacıyla Bac to Bac® Bakülovirüs Vektör Sistemi (Invitrogen) kullanıldı. Bu amaçla AMV248 ektodomeinini kodlayan DNA dizisi vektör ifade sistemine uygun enzimler içeren primerler yardımıyla çoğaltılıp ara vektöre, daha sonra da restriksiyon enzimleri ve DNA dizi analizi ile doğrulanan gen bölgesi pFastBac HTb ara transfer vektörüne klonlandı. *amv248* ektodomein gen dizisini içeren ara transfer vektörü daha sonra bakülovirüs vektör sistemine aktarılması amacıyla yardımcı (helper) plazmide ve bakteriyal replikasyon orijinine sahip AcMNPV bakmid DNA'sını içeren *E. coli* DH10Bac hücrelerine transforme edildi. Antibiyotik seçimi sonrası doğrulanan rekombinant bakmid DNA'sı ile böcek hücreleri transfekte edildi ve üretilen yavru virüsler ile rekombinant proteininin hücre kültüründe büyük ölçekli üretimi sağlandı.

3.4.1. *amv248* Genini PCR ile Çoğaltma ve Ara Vektöre Klonlama

amv248 geninin transmembran bölgesini içermeyen ve ifade sistemine aktarılması için gerekli enzim kesim bölgelerini içeren ektodomein bölgesi GTexFw ve GTexRv primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve elde edilen DNA %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel üzerinde beklendiği üzere 790 bp'lik bölgede bir DNA bandı gözlemlendi (Şekil 32).

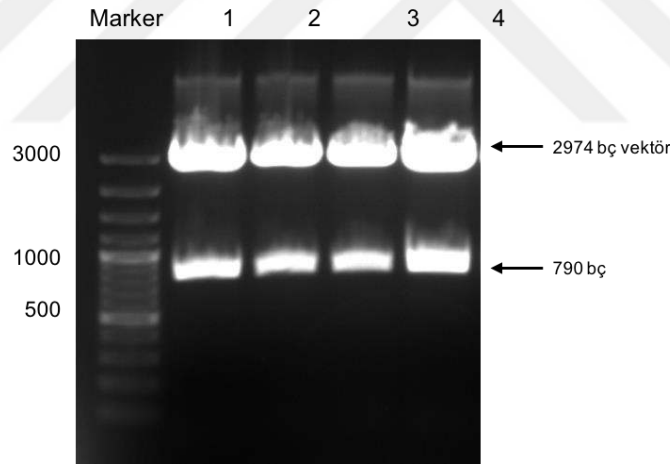


Şekil 32. *amv248* ektodomeininin genomdan elde edilmesi.

Jelden temizlenen DNA parçası pJET1.2 Blunt ara vektörüne klonlandı. Ligasyon ürünü daha sonra Bölüm 2.3.3.4’de anlatıldığı üzere hazırlanan kompetent *E. coli* JM101 hücrelerine aktarıldı. Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden gece kültürleri hazırlandı ve plazmid izolasyonu kit (Promega) yardımı ile yapıldı.

3.4.2. Klonların Restriksiyon Analizi

Klonlama sonucu *amv248* gen ektodomeinini içerdiği düşünülen 4 klon seçildi ve bu klonlardan gece kültürleri hazırlandıktan sonra plazmit DNA izolasyonları gerçekleştirildi. İzole edilen plazmid DNA’larının muhtemel glikozil transferaz geninin (*amv248*) kodlayan DNA bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA’ları *Eco*RI ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Ardından %1’lik jelde elektroforez yapıldı. pJET1.2 vektöre ait 2974 bp’lık ve klonlanmış olan DNA bölgesini içeren 790 bp’lık bantlar elde edildi (Şekil 33).



Şekil 33. *amv248* gen ektodomeinini içeren klonların restriksiyon analizi.

3.4.3. Klonların Dizi Analizi

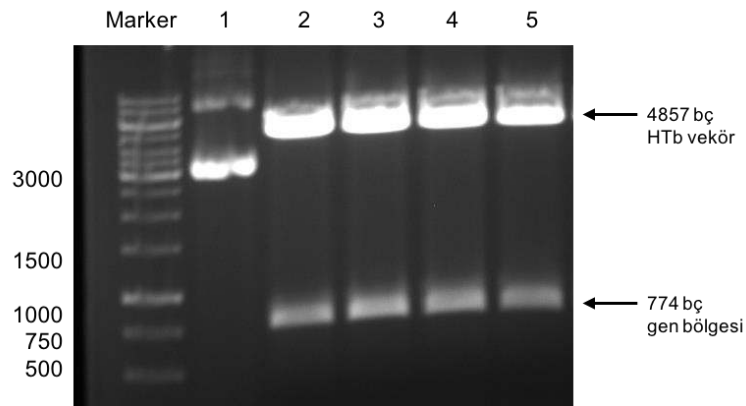
Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleriyle doğruluğu onaylanan klonların DNA örnekleri üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlendikten sonra dizi analizi için, MacroGen Firmasına (Meibergdreef 31 1105 AZ, Amsterdam, Hollanda) gönderildi. Dizin analizi için pJET1_2F ve pJET1_2R primerleri kullanıldı. Dizi analiz sonuçlarına göre plazmidlerin AMV248 kodlu ORF’yi kodlayan DNA bölgesini ihtiva ettiği belirlendi (Şekil 34).



Şekil 34. *amv248* ektodomeini kodlayan DNA bölgesi

3.4.4. *amv248* Geninin pFastBac HTb Ara Transfer Vektöre Klonlanması

Doğruluğu belirlenen rekombinant plazmid, *E. coli* DH10 β hücresine transform edildi. Rekombinant plazmidlerin (pFBHT-AMV248b) bu hücrelerdeki varlığı plazmid DNA izolasyonu ve ardından restriksiyon enzimleri ile kesilerek gösterildi. Kesim sonucunda jelde beklenildiği gibi pFastBacHTb vektörüne ait 4857 bp'lık ve ifade edilen gen bölgesini içeren 774 bp'lık bantlar elde edilerek klonlama işlemi doğrulandı (Şekil 35).

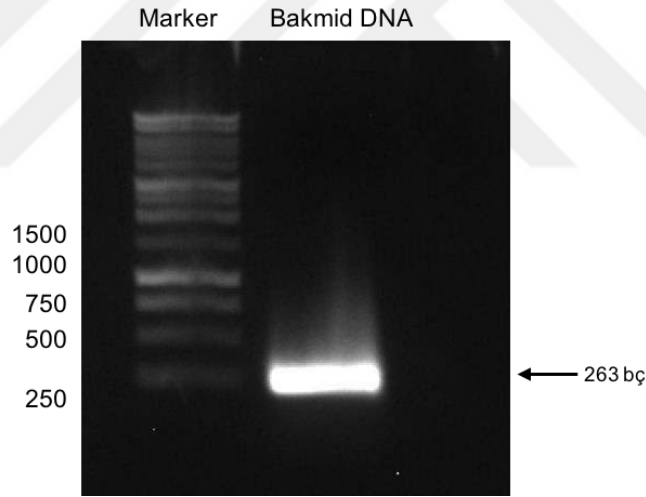


Şekil 35. *amv248* geninin pFastBac HTb ara transfer vektörüne klonlanması.

3.4.5. Genin Bac-to-Bac® Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması

amv248 gen bölgesini içeren pFastBac HTb ara vektörünün bakülovirüs vektör sistemine aktarılması amacıyla *E. coli* DH10Bac kompetent hücreleri hazırlandı ve daha sonra bu vektörün kompetent hücrelere transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyonun ardından ara transfer vektörü ile bakmid DNA arasında her ikisinin de sahip olduğu homolog bölgeler sayesinde transpozisyon olması gerekmektedir. Transpozisyonun gerçekleşmesi büyüyen hücrelerin beyaz renkli olmasını sağlayacaktır. Dolayısı ile transformasyon işlemini takip eden 48 saat sonra oluşan büyükçe beyaz kolonilerden, aynı içeriğe sahip besiyeriye kolonilerin tamamen saf olmasını sağlamak amacıyla çizgi ekim yapıldı ve tekrar 48 saat 37 °C’de inkübe edildi. Oluşan beyaz kolonilerden rekombinant bakmid DNA izolasyonu yapıldı.

Elde edilen bu bakmid DNA’sı daha sonra *amv248* genine özgü primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ile doğrulandı (Şekil 36).



Şekil 36. *amv248* gen bölgesini içeren rekombinant bakmid DNA’sının doğrulanması.

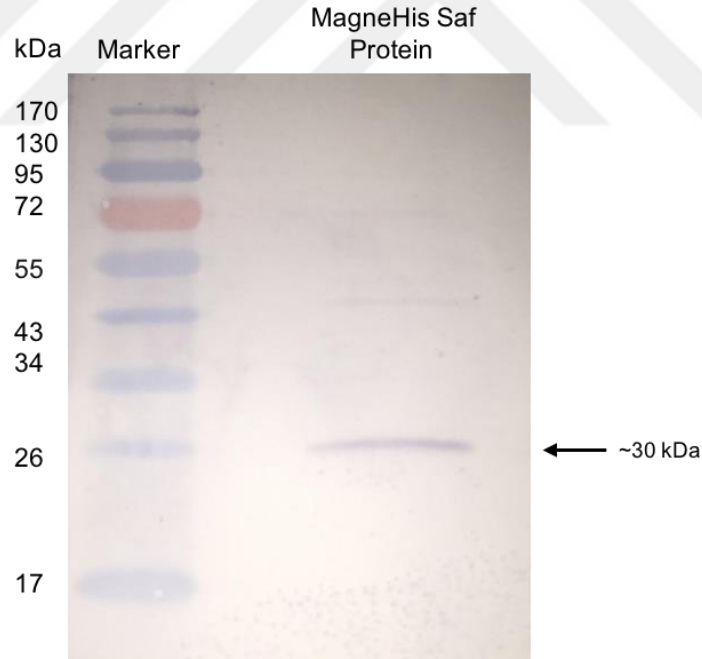
Elde edilen ve doğrulanan bakmid DNA’sı kullanılarak hücre kültüründe Sf9 hücrelerine transfeksiyon gerçekleştirildi ve enfeksiyon sonrası elde edilen süpernatant viral stok olarak adlandırıldı. Bu viral stok kullanılarak AMV248 proteini hücre kültüründe yüksek miktarda üretildi.

3.4.6. Üretilen Rekombinant AMV248 Proteininin Saflaştırılması

Bakülovirüs vektör sistemiyle üretilen rekombinant AMV248 proteini ihtiva ettiği histidin kuyruğu hedeflenerek “MagneHis™ protein saflaştırma sistemi (Promega)” ile saflaştırıldı ve protein konsantrasyonu belirlendi. Daha sonra proteinler SDS-Poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu.

3.4.7. Proteinin PVDF Membrana Aktarılması ve Western Blot Analizi

SDS-PAGE sonrası ayrııştırılan protein bantları Bölüm 2.5.1.9’da anlatılan protokole göre PVDF membrana aktarıldı ve AMV248 proteininin içerdiği histidin kuyruğa özgü antikor kullanılarak western blot analizi ile görüntülendi. Western blot analizi, hedeflenen yaklaşık 30 kDa’luk protein bandı belirlenmesiyle sonlandırıldı ve membran fotoğraflandı (Şekil 37).



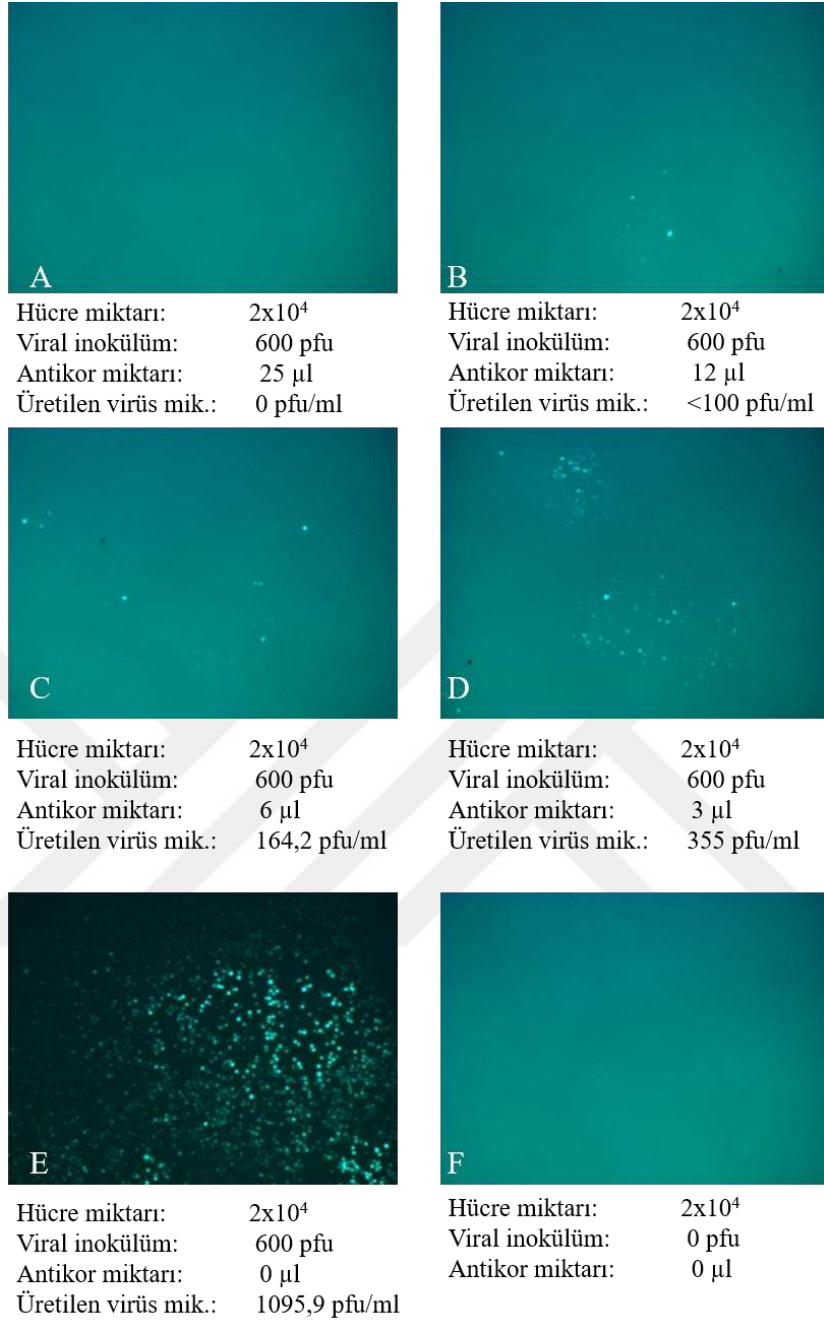
Şekil 37. Bakülovirüs vektör sisteminde üretilen AMV248 proteininin western blot analizi (Marker: Prestained Marker)

3.5. AMV248 Yapısal Proteininin İmmün Nötralizasyonunun Virüs Replikasyonuna Etkisi

AMV248 proteininin entomopoksvirüslerde korunmuş olan tek viral tutunma proteinini kodladığı bilinmektedir. Rekombinant AMV248 proteinine özgü olarak geliştirilmiş antikor kullanılarak virüsün yapısında bulunan AMV248 proteininin immün nötralizasyonu sağlandı. Bunun sonucunda oluşan senaryo AMEV genomundaki muhtemel giriş-tutunma proteinlerinin araştırılması için önemli bilgiler ortaya koymaktadır. Bu amaçla virüs çeşitli antikor seyreltikleri ile enfeksiyon öncesi muamele edildi ve ardından bu karışım enfeksiyon solüsyonu olarak kullanıldı.

3.5.1. İmmün Nötralizasyon Sonrası Oluşan Yavru Virüslerin Konsantrasyonları

Amsacta moorei entomopoxvirus AMV248 proteinine karşı üretilen antikor ile yeşil flöresan geni içeren virüs (AMV Δ sph/gfp) nötralize edildikten sonra Ld652 hücrelerinin enfeksiyonları gerçekleştirildi (Şekil 39). 48 saat enfeksiyon sonucunda elde edilen bulgular floresan mikroskop altında incelendiğinde pozitif kontrol (Antikor içermeyen, virüs içeren, Şekil 39e) ile farklı antikor seyreltiklerini içeren her bir örnek (Şekil 39 a-d) kontrollerle tek tek karşılaştırıldığında belirgin bir fark görüldü. Ayrıca her bir antikor seyreltiği kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise antikor miktarındaki artış ile birlikte üretilen GFP miktarında belirgin bir düşüş gözlemlendi. Bu da antikorum virüsün nötralizasyonunu gerçekleştirdiğini göstermektedir (Şekil 39).



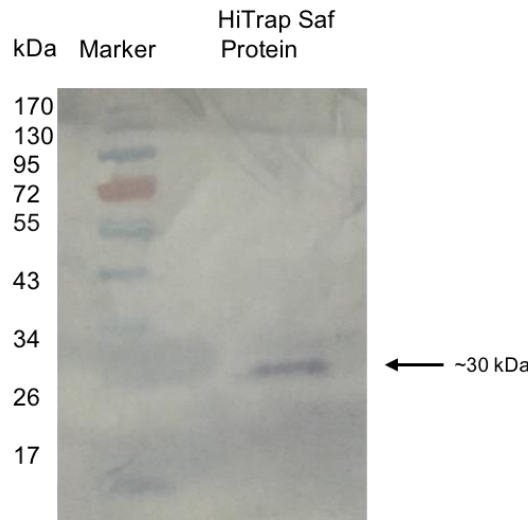
Şekil 38. AMV248 proteinine özgü antikorlarla nötralize edilen virüs ile Ld652 hücrelerinin enfeksiyonu. 48 saatlik enfeksiyon sonucunda floresan mikroskopik (Zeiss Axiovert 200M mikroskop, 10X Objektif) görünüm. Açık yeşil partüküller virüslerle enfekte hücreleri göstermektedir. A, B, C, D: Antikor içeren (Sırasıyla 25, 12, 6 ve 3 µl/kuyu) kuyular. E: Pozitif Kontrol (AmΔsph/gfp). F: Negatif Kontrol (Sadece Ld652 hücre) içeren.

İmmün nötralizasyonun başarılı olması elde edilen yavru virüslerin miktarına da yansımaktadır. Bu amaçla hasat edilen enfeksiyon sıvılarından EPDA metodu ile oluşan

yavru virüslerin miktarı belirlendi. Her bir antikor seyreltiği ve kontrol virüs (Am Δ sph/gfp) için elde edilen sonuçlar Şekil 39’da gösterilmektedir. Bu sonuçlar 25 μ l antikorun 300 pfu virüsü tamamen nötralize ettiğini göstermektedir.

3.6. Oluşturulan Rekombinant AMV248 Proteini ile Hücre Yüzey Matriksinin Etkileşme Özelliği

Bakülovirüs vektör sistemiyle üretilen ve western blot hibridizasyonu ile doğrulanan AMV248 proteinin hücre yüzey matriksi ile etkileşme özelliğinin test edilmesi amacıyla ticari olarak satılan HiTrap Heparin HP kolon (GE Healthcare) kullanıldı. Bu kolon içerdiği heparin bağlı boncuklar sayesinde heparine bağlanan proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla üretilen ve histidin kuyruğu hedeflenerek saflaştırılan rekombinant AMV248 proteini kolon kullanıcı kılavuzunda belirtilen yöntemle göre dengelenen HiTrap kolondan geçirildi. Daha sonra kolon yıkama tamponu ile yıkanıp heparin boncuklara tutunan proteinler elüsyon tamponu ile geri kazanıldı. Boncuklara tutunan proteinler geri kazanıldıktan sonra direk SDS-PAGE elektroforezine tabi tutuldu. Ayırıştırılan proteinler 2.5.1.9’da anlatılan protokole göre PVDF membrana aktarıldı ve western blot analizi ile AMV248 proteininin içerdiği histidin kuyruğa özgü antikor ile hedeflenerek görüntülendi. Western blot analizi sonucunda hedeflenen yaklaşık 30 kDa’luk protein bandı membran üzerinde gözlemlendi (Şekil 38). Elde edilen bu sonuç rekombinant AMV248 proteininin heparine bağlandığını göstermektedir.



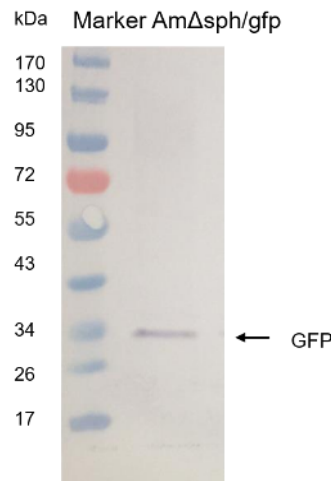
Şekil 39. HiTrap heparin kolon ile saflaştırılan rekombinant AMV248 proteinin western blot analizi.

3.7. Virüslerin Hücre Yüzeylerine Bağlanma Özellikleri

Viral enfeksiyon başlangıcının ilk aşamasını virüs membran proteinleri ile hücre yüzey reseptörlerinin tutunması oluşturmaktadır. AMEV'in hücre tutunma mekanizmasını araştırmak üzere öncelikle virüslerin heparin kaplı boncuklar ile bağlanma özelliği test edildi. Daha sonra virüs yüzeyinde bulunan reseptörler çözünebilir GAG'lar ile doyuruldu ve bu karışımın enfektivitesi test edildi. Son olarak enzimatik olarak yüzey GAG'ları çıkarılan Ld652 hücreleri virüs ile enfekte edilerek virüslerin bu hücrelere bağlanma etkisi belirlendi.

3.7.1. Virüslerin Heparine Bağlanma Kapasitesi

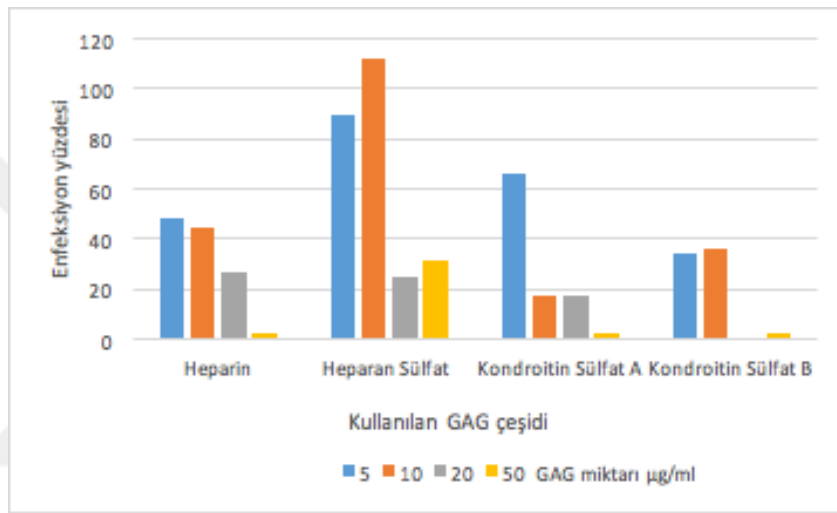
Amsacta moorei entomopoxvirus'ün heparine bağlanma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla Am Δ sph/gfp virüs heparin boncuklar ile inkübasyona bırakılıp, bağlanma, yıkama ve geri kazanım adımlarının ardından elde edilen heparine tutulmuş olduğu varsayılan virüsler SDS-PAGE'e tabi tutuldu. SDS-PAGE sonrası virüsün heparine tutunup tutunmadığı anti yeşil floresan proteini (GFP) antikoru ile western blot analizi yapılarak belirlendi. Western blot hibridizasyonu sonucunda GFP protein bandının gözlenmesi, virüsün heparine bağlanmış olduğunu göstermektedir (Şekil 40).



Şekil 40. *Amsacta moorei entomopoxvirus*'ün heparine bağlandığının western blot analizi.

3.7.2. Virüs Enfeksiyonlarının Çözülebilir Glikozaminoglikanlar (GAG'lar) ile İnhibisyonu

Viral enfeksiyon sırasında tutunma proteinlerinin çeşitli hücre yüzey proteinleri ya da GAG'ları ile etkileşime geçmesi enfeksiyonun ilk adımını oluşturmaktadır. Virüslerin enfeksiyon öncesi çözülebilir GAG'lar ile inkübasyona tabii tutulması sonucu etkileşime girecek viral proteinler GAG'lar ile doyuruldu. Daha sonra bu karışım enfeksiyon sıvısı olarak kullanıldı. Enfeksiyonu takiben yavru virüs oluşumu EPDA metodu ile belirlenerek karşılaştırıldı ve Şekil 41'deki grafik oluşturuldu.

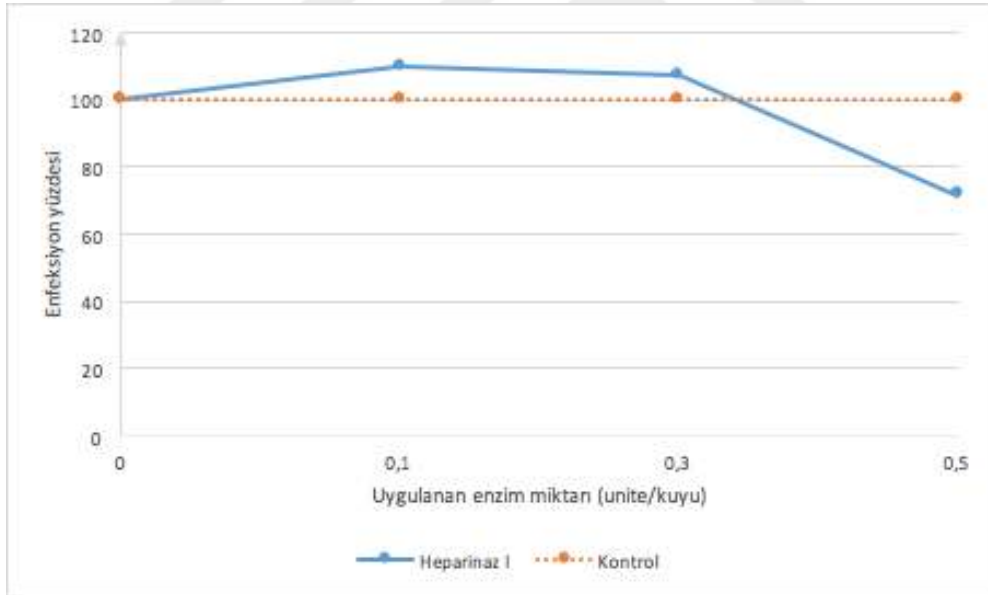


Şekil 41. *Amsacta moorei entomopoxvirus*'ün Ld652 hücrelerini enfeksiyonunun çözülebilir GAG'lar ile inhibisyonu. Değerler enfeksiyon yüzdesini göstermektedir.

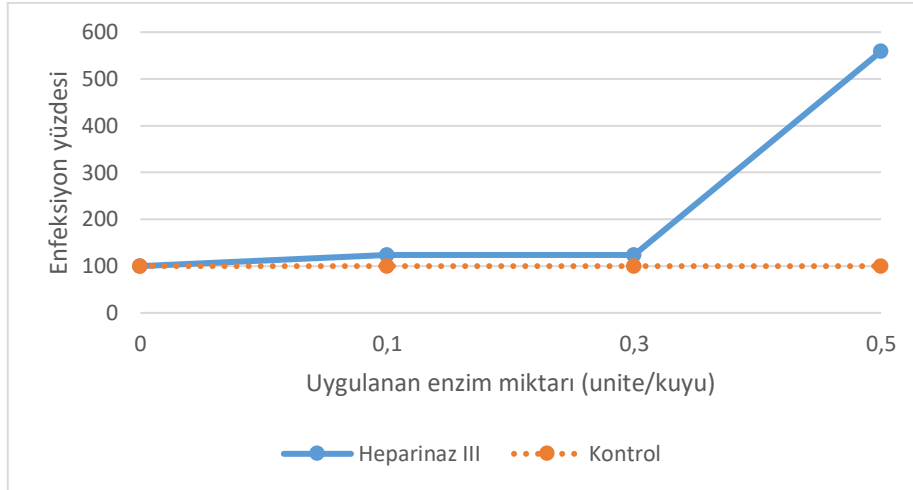
Elde edilen bulgular incelendiğinde her bir GAG uygulaması sonucu viral enfeksiyonda önemli azalma olduğu belirlendi. En yüksek inhibisyonun (%98) 50 µg/ml GAG uygulaması sonucu elde edildiği görüldü. Bu konsantrasyonda GAG'ların uygulanması ile enfeksiyonun inhibisyon oranı sırasıyla heparin, kondroitin sülfat A ve kondroitin sülfat B için % 98 olurken heparan sülfat ise % 69 inhibisyona sahip oldu. Bu sonuçlar AMEV'in tüm GAG'lar ile yüksek oranda inhibe edilebildiğini, 50 µg/ml'lik GAG konsantrasyonu uygulandığında heparan sülfat dışındaki tüm GAG'ların %100'e yakın inhibisyona sebep olduğunu gösterdi.

3.7.3. Virüslerin Enzimatik Olarak Yüzey GAG'ları Çıkarılan Hücrelere Bağlanma Özelliği

Çeşitli konsantrasyonlarda (0, 0,1, 0,3 ve 0,5 ünite/kuyu) enzim (heparinaz I ve heparinaz III) muamelesi sonucu hücre yüzey GAG'ları çıkarılan hücreler Am Δ sph/gfp virüs ile enfeksiyona tabii tutularak viral enfeksiyon miktarındaki değişimlerin takibi yapıldı. Bu amaçla Ld652 hücreleri ilk önce hücresel heparin ve heparan sülfatları çıkaran heparinaz I ve sadece hücresel heparan sülfatları çıkaran heparinaz III enzimlerinin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Daha sonra GAG'ları çıkartılan hücreler Am Δ sph/gfp virüs ile enfekte edildi. Enfeksiyon sonucu oluşan yavru virüslerin miktarı EPDA metodu ile belirlendi ve elde edilen değerlere göre enfeksiyon oran grafikleri oluşturuldu (Şekil 41, Şekil 42). Bu deneyler sonucunda, heparinaz I uygulamasının virüsün hücreyi enfeksiyon yapma kapasitesinde artan enzim miktarıyla orantılı olarak azalmaya yol açtığını; ancak heparinaz III uygulamasının hücrelerin enfekte olması üzerinde herhangi bir olumsuzluk oluşturmadığını gösterdi.



Şekil 42. Ld652 hücrelerine Heparinaz I uygulaması sonrası *Amsacta moorei entomopoxvirus* enfeksiyon oranı.



Şekil 43. Ld652 hücrelerine Heparinaz III uygulaması sonrası *Amsacta moorei entomopoxvirus* enfeksiyon miktarı.

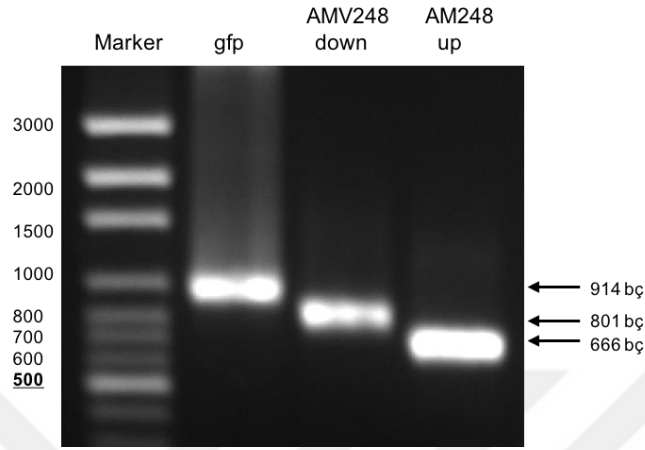
3.8. Glikozil Transferaz Geni (*amv248*) Çıkartılmış Rekombinant Virüs Oluşturma

AMEV gen dizisi incelendiğinde tek korunmuş tutunma proteini olarak AMV248 öne çıkmaktadır. Tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant proteinin ve yaban tip virüsün hücresel GAG'lardan heparin ile bağlandığı, viral enfeksiyonun AMV248 proteinine özgü antikorlarca önlenebildiği, virüsün GAG'lar ile doyurulması ile viral enfeksiyonun engellenebildiği ve hücre yüzey GAG'larının enzimatik olarak çıkarıldığı durumda AMEV enfeksiyon miktarında değişimler olduğu belirlendi. *amv248* geninin viral genomdan silinmesi hem genomdaki muhtemel başka heparin bağlanma proteinlerinin var olup olmadığının belirlenmesi, hem de AMV248'in viral tutunmadan sorumlu tek protein olması durumunda virüsün geliştirebileceği modifikasyonların belirlenmesi bakımından önemlidir. Bu amaçla AMEV genomundan homolog rekombinasyon yöntemiyle *amv248* geni silinmiş, yerine enfeksiyonun takibinin kolaylaştırması için yeşil flöresan geni yerleştirilmiştir.

3.8.1. *gfp* İçeren Rekombinant Transfer Vektörü

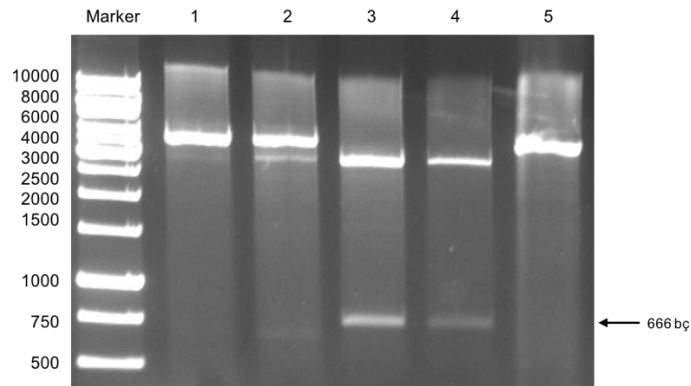
Glikozil transferaz geninin (*amv248*) fonksiyonel işlevini tespit edebilmek amacıyla, homolog rekombinasyonla genin virüs genomundan silinmesi sağlandı. Yaban tip virüs genomu kalıp olmak üzere, uygun primerler kullanılarak *amv248* kodlu genin 5' yukarı ve

3' aşağı bölgeleri ve yeşil flöresan geni (*gfp*) polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltıldı (Şekil 44). Bu çoğaltma sonrasında 666 baz çiftlik 5' yukarı bölgesi, 801 baz çiftlik 3' aşağı bölgesi ve 914 baz çiftlik yeşil flöresan geni DNA'ları çoğaltılmış oldu.



Şekil 44. Glikozil transferaz geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgeleri ve yeşil flöresan geninin (*gfp*) çoğaltılması.

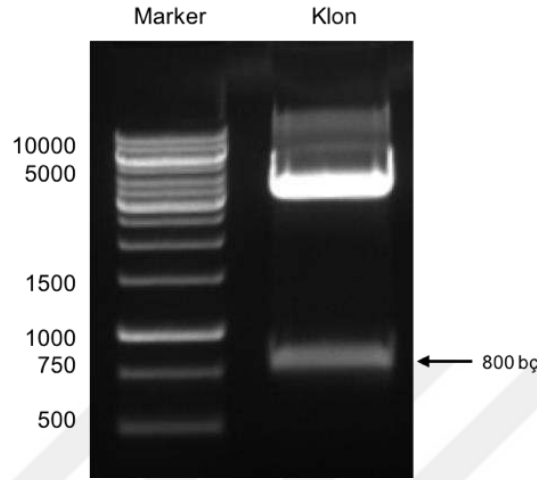
Çoğaltılan DNA parçaları, sırayla pBlueScript SK(-) vektöre klonlandı ve her biri uygun enzimlerle kesilerek klonların doğruluğu teyit edildi. Şekil 45'de pBS-AMV248up kodlu klonun *Xba*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucunda 666 baz çifti uzunluğunda 5' yukarı bölgenin klonlanmış olduğu gösterildi.



Şekil 45. pBS-AMV248up klonlarının restriksiyon analizi. Rakamlar seçilen farklı klonları göstermektedir.

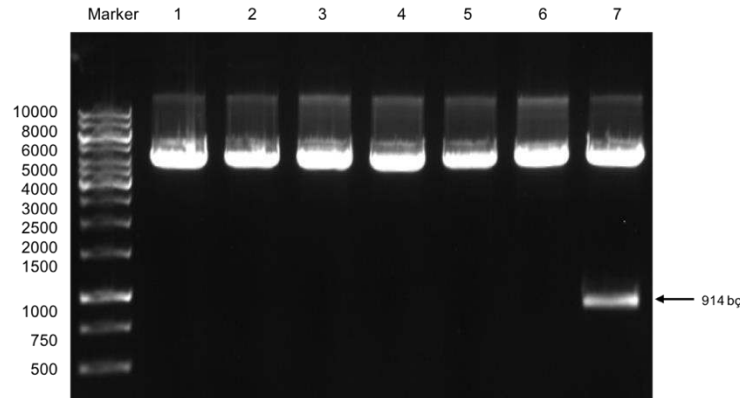
Elde edilen vektöre (pBS-AMV248up); AMV248down DNA parçası klonlandı. Daha sonra hem AMV248up hemde AMV248down bölgelerini içeren klon,

AMV248down bölgesine özgü *Hind*III ve *Kpn*I restriksiyon enzimleriyle kesildi ve sonucunda 800 baz çifti uzunluğunda aşağı bölgenin bu vektöre klonlanmış olduğu gösterildi (Şekil 46). Bu şekilde oluşturulan klona pBS-AMV248up-down adı verildi.



Şekil 46. pBS-AMV248up-down klonlarının restriksiyon analizi.

Glikozil transferaz geninin (*amv248*) yukarı ve aşağı bölgelerinin vektöre klonlanması tamamlandıktan sonra, sferoidin promotörü altında 28 kDa'luk GFP proteini üreten genin (*gfp*) sırası, Gfpfw ve Gfprv adlı primerler kullanılarak çoğaltıldı ve daha önce klonlanan bu iki bölgenin arasına klonlandı. Seçilen klonlardan 7 numaralı olan, *gfp* genini içeren doğru klon olarak belirlenmiş oldu (Şekil 47).

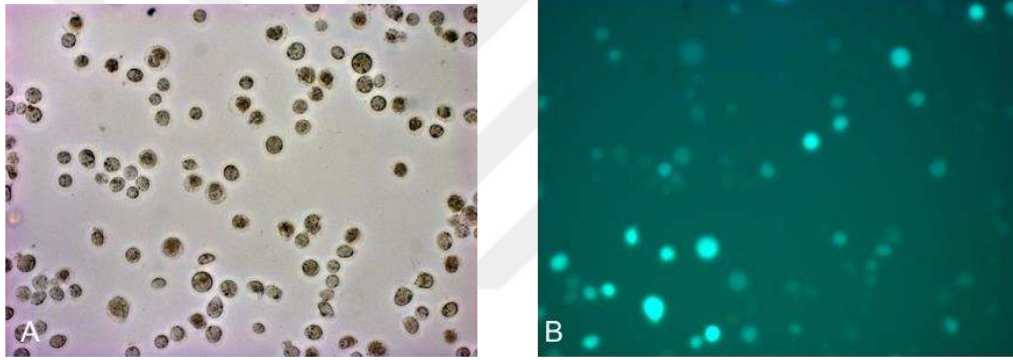


Şekil 47. *amv248* geninin 5' yukarı ve 3' aşağı bölgeleri ve yeşil flöresan genini içeren klon (AMV248up-down-gfp). Ok 914 bç'lik hedef DNA'yı içeren tek klonu göstermektedir.

Bu işlemler sonucunda elde edilen transfer vektör, pBS-Am Δ gt/gfp olarak isimlendirildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.

3.8.2. Oluşturulan Transfer Vektörün Ld652 Hücrelerine Transfeksiyonu

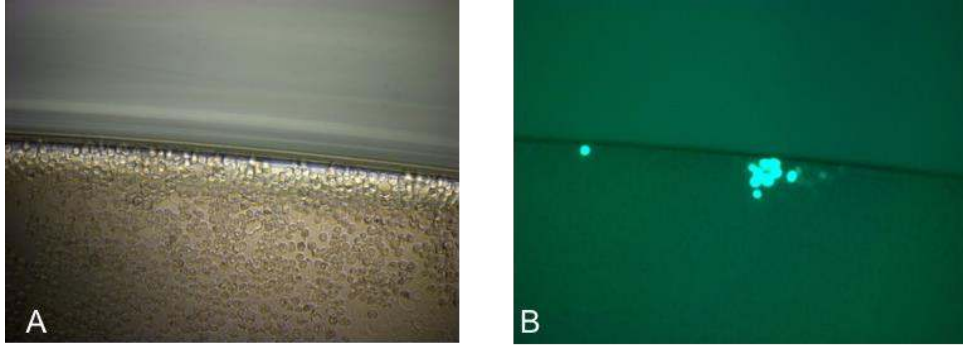
Hazırlanan transfer vektörün (pBS-Am Δ gt/gfp), AMEV ile enfekte Ld652 hücrelerine transfeksiyonundan sonra, hücrelerde GFP proteininin ortaya çıkışı, Axiovert floresan inverted mikroskopta yeşil rengin oluşumuyla belirlendi (Şekil 48). Yeşil rengin görünmesi, *gfp* geninin AMEV’nin genomuna dahil olduğunu ve GFP proteininin oluşturulan rekombinant virüs (Am Δ gt/gfp) tarafından üretildiğini göstermektedir. Elde edilen transfeksiyon sıvısı çoğaltıldı ve 4 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 48. pBS-Am Δ gt/gfp ile transfeksiyondan sonra Ld652 hücreleri. A) Halojen ışık altında görünüm ve B) floresan ışık altında GFP ifadesinin belirlenmesi.

3.8.3. Rekombinant Virüsün Saflaştırılması, Üretimi ve Konsantrasyon Tayini

Transfeksiyon işleminden sonra oluşan Am Δ gt/gfp virüsleri içeren süspansiyon, plak işlemine tabi tutuldu. Elde edilen plakların arasında, en iyi virüs üremesinin olduğu plaktan yeniden virüs çoğaltımı yapıldı ve arka arkaya yapılan plak deneyleri sayesinde, virüs süspansiyonu yalnızca Am Δ gt/gfp virüslerden oluşacak şekilde saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için yapılan plak deneyleri sonucunda, plak oluşumu Axiovert floresan inverted mikroskopla bakılarak kontrol edildi. Yaklaşık üçüncü günde, floresan mikroskop ile görülebilen GFP içeren plaklar gözlenmeye başladı (Şekil 49). Bu plaklardan alınan örneklerle yapılan ardışık altı plak işlemi sayesinde, Am Δ gt/gfp virüsler saflaştırıldı.

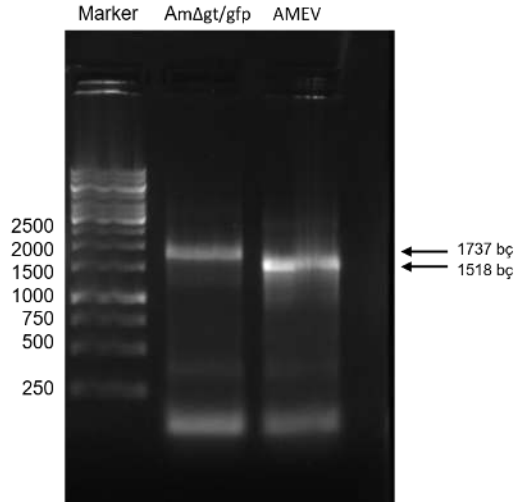


Şekil 49. Ld652 hücrelerinin AmΔgt/gfp ile enfeksiyonu sonrasında oluşan plaklar.
A) Halojen ışık altında görüntü B) Aynı plağın floresan ışık altında GFP ifadesinin belirlenmesi .

Saflaştırılan AmΔgt/gfp virüslerin stok konsantrasyonu Terasaki hücre kültür kapları kullanılarak ve EPDA metoduna göre $1,46 \times 10^8$ pfu/ml olarak belirlendi. Konsantrasyonu belirlenmiş olan virüs süspansiyonu, çalışmanın ilerleyen basamaklarında kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edildi.

3.8.4. *amv248*’in AMEV Genomundan Silindiğini Doğrulama

Rekombinant AmΔgt/gfp virüsün inşasından sonra, homolog rekombinasyon sayesinde genomdaki delesyonun istenen sırada meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için, hem yaban tip AMEV’den hem de AmΔgt/gfp’den genomik DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA’lar kalıp olarak kullanılmak üzere, PCR reaksiyonu uygulandı. Reaksiyonlar sonucunda, yaban tip AMEV DNA’sıyla 1518 bp’lik bir sıra çoğaltırken AmΔgt/gfp virüs DNA’sıyla 1737 bp’lik bir sıra çoğaltıldı. Ayrıca, AmΔgt/gfp’den yapılan PCR ürününde, AMEV’den gelen bandın ağırlığına uyan ve kontaminasyon anlamına gelecek herhangi bir bant görülmedi. Bu da, rekombinant virüsün (AmΔgt/gfp) yaban tip virüsten (AMEV) arındırılmış olarak saflaştırılmış olduğunu gösterdi (Şekil 50).



Şekil 50. Plak deneyi ile saflaştırılan rekombinant virüsün doğrulanması.

Jelde oluşan iki PCR bandı (AMEV ve AmΔgt/gfp virüslerine ait) klonlandı ve DNA dizi analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, AMEV kalıbından elde edilen PCR ürününün AMEV ile ve AmΔgt/gfp kalıbından elde edilen PCR ürününün Şekil 51'deki öngörülen AmΔgt/gfp sırayla %100 uyumlu olduğu belirlendi (Şekil 51). Böylece, yaban tip AMEV genomundan *amv248* kodlu genin çıkarıldığı ve çıkarılan genin yerine, sferoidin promotoru altında *gfp* geni taşıyan DNA parçasının eklendiği, şüpheye yer bırakmayacak şekilde doğrulanmış oldu.

gctctagagcgaagat tttcaacaa cagatttaaa
 204241 ttataacatt ataccattta tttctagtga tttgtatta tgtaaagata aatgccta
 204301 atatattaaa aaaaaatata attccatcaa agaattaaaa aaacaaaaga aaaaagtgg
 204361 tgaagtagca tatatatata aaaataataa atatataatt tatattatta ttgcagatta
 204421 tatagaaagt aaagtaaata tattaaatat tctaagagca ttggataatt taaaattat
 204481 tttagaaaaa ttaaaaataa ctgatattat gacttctaga tcacatattg aagatgtgta
 204541 cgaaactgat aaattatata aatatttaag agagataatg ccagaagaat taaattata
 204601 tttattatta tagtttatgt atgaaaaaaa atgactatga taacaaatga acgaagataa
 204661 ttatataatt ttggcaacaa tcgtaacatt tatatacatt attgaatgca tgattaaagt
 204721 tatgtattta ttattagttt ttatatataa tatgtataga attgttatac aagtataca
 204781 agttatacat ataacttaata atattatata taatattatt ataataaata tggaaaatta
 204841 tcatattatt atattaacaa ttaaaagaaa ttctgacagGGATCC
 CGAATCACTAGTGAATTCactagtgatgcacgattaataaaattcTCACTTGTACAGCTCgtccatg
 ccatgtgtgatccagcagcgggtcacaactccagcaggaccatgtggctctcttttcgttgggatcttttagacagggcagactgg
 gtggacaggtaatgggtgtctgggaggagcacagggccgtcgccgattggagtggtctgttgataatggcggccagctgcacgg
 atccatcctcaatgtgtgtctgatcttgaagttgacctgatgccattctttgctgtcgccatgatgtacacattgtgggagttatagt
 tgtattccagctgtggccgagaatgtttccatcctcctaaagtcattgcccttcagctcgattctattcaccagggtgtcaccttcgaa
 cttgacttcagcgcgggtctgttagtcccgatctttgaaaaagatgggtctctcctgcacatagccctcgggcatggcgctcttga
 aaaagtcagctgctcatatgggtctgggtatctgaaaagcactgcacgccataggtcagggtagtgaccagtggtggccatggca
 cagggagctttccagtggtgcagatgaatttcagggtgagctttccgtatgtggcatcaccttcaccctctccgtgacagaaaattt
 gtgccattcacatgccatccagttccacgagaattgggaccacgccagtgaaacagttcctcgccctgtcctgcagccccggg
 gatccgttgctaaaggtacgttactcatttattattataataataaaaaataaaagtccttttagataaaatatataaaaaattatgatt
 gatattataataatattataatgtatttatgatgtattggccatcaataatcttaataatctacaatCGTTAGATGTTTCGAC
 AGTAgagctctcgatgcaatcGAATTCGATTCCCaagcttgtag tagatgttgc
 205681 ggagaatgca aaaaaataat tatatgataa atgatattat tgtttttgt tgtatattt
 205741 tttattgtga ttgtaatat tatattttat agtattttaa atagattata tttagataaa
 205801 ttaatttttg aaaatgcaaa aaatcaatta agaactaccg taagttgtat aaatgatcat
 205861 tggtttgttg ttcgaagaaa tacaagattt tttagattat tagctgttaa aagagattca
 205921 gaatatttaa attgtaatac taatccaata tccagtgata tattagaatc gtgtgtttaa
 205981 aatggtagat ttaataatag atcagaatat tgttcacaag ctttggtaga attaatgttt
 206041 actttataaa aaattttatg aaattttata caaattatgg ataggtattt tatatttatg
 206101 tattgtatta aatatggatg ttaattttc agaatatgtt gacatgagtg gttataaaaa
 206161 aataataaca cataacaatg aatttaaatt gagaaagtat tctcatcag atgatataga
 206221 taaagcacta atacttaata atttaattaa atcattatca tcacacacat atataagtat
 206281 tatagatatt aatgaacaaa aatcacaaga taataattca aatatatgta agaataaatg
 206341 caatatatgc tgtaaaaaaa ataacattaa aaaaaatcaa aacataataa aacgtttttt
 206401 aaacataata ttaaaacatt aattaacata aggtaaaatt tcaagcttta atttaaggat
 206461 ctgagtcgggtacccc

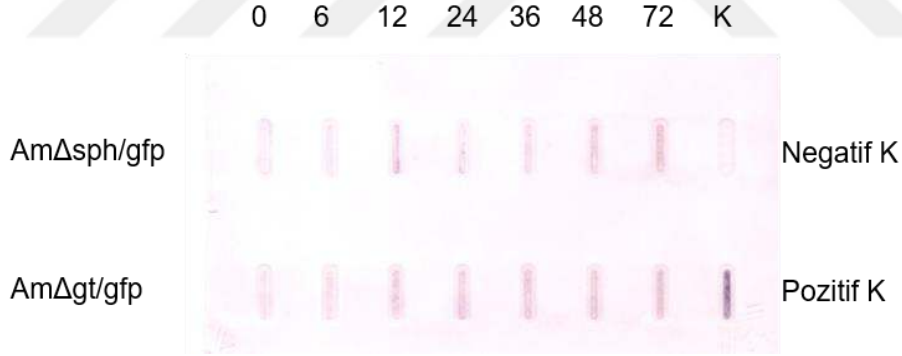
Şekil 51. Rekombinant virüse transfer edilen bölgenin DNA dizisi. Açık gri sıralar *gfp* genini; altı noktalı çizili olan kısımlar AMV248upfw ileri ve AMV248uprv geri primerlerini; altı kesik çizgili olan kısımlar AMV248downfw ileri ve AMV248downrv geri primerlerini; altı çizili olan atg bazları başlangıç kodonunu, taa bazları stop kodonunu göstermektedir. GFP proteininin üretimi, *amv248*'e ait olan ilk ATG'den değil, *gfp* genine ait ikinci ATG'den, sferoidin promotörü sayesinde gerçekleşir.

3.9. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Replikasyon Özellikleri

3.9.1. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) DNA Replikasyonu

Rekombinant virüsün DNA replikasyonu, slot-blot Hibridizasyonu yöntemi ve DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Kat No: 11 745 832 910) ile işaretli prob kullanılarak belirlendi. Replikasyon işleminde, AmΔsph/gfp karşılaştırma yapmak için kullanıldı. Bu yüzden, hibridizasyon işlemi için, iki tip virüs için de geçerli olan prob seçildi. Her bir virüsten, 0, 6, 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde alınan hücre lizati örnekleri membrana emdirildi. Membrandaki DNA'ların, hibridizasyon fırınında, işaretli prob ile hibridizasyonu sağlandı. Membranın renklendirme işlemi tamamlandıktan sonra, slot-blot hibridizasyonundan elde edilen sonuçlar kaydedildi.

Sonuçlara göre, hem AmΔsph/gfp'de hem de glikozil transferaz geni bakımından kusurlu AmΔgt/gfp'de, viral DNA replikasyonu ilk olarak enfeksiyondan sonra 12. saatte görülmeye başladı ve 72. saatte de devam etti (Şekil 52). Buna göre, AmΔgt/gfp'de AmΔsph/gfp'ye göre DNA replikasyon zamanında bir değişiklik olmadığı belirlendi.

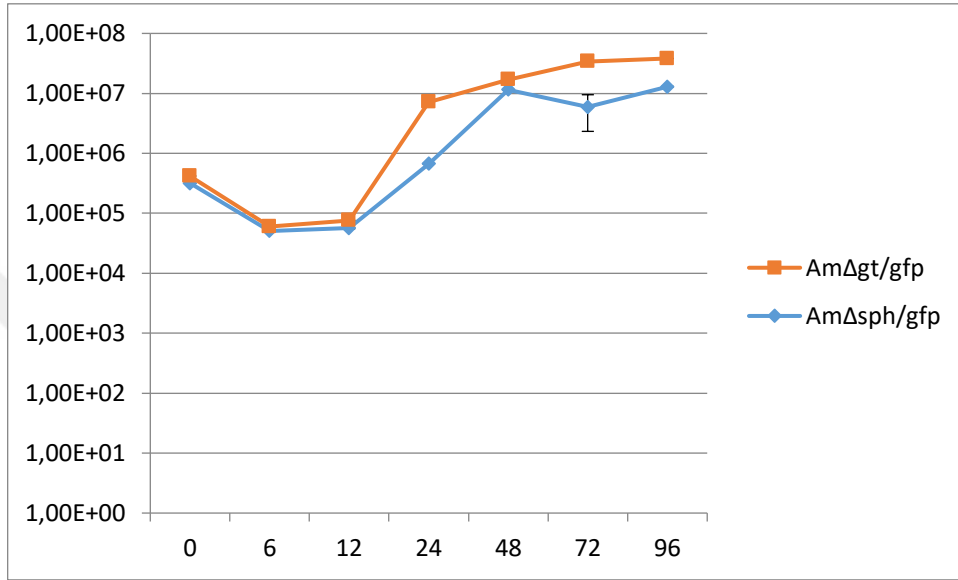


Şekil 52. Rekombinant virüs ile kontrol virüs DNA replikasyonlarının karşılaştırılması. Rekombinant AmΔgt/gfp'nin DNA replikasyonu, slot-blot hibridizasyonu yöntemi kullanılarak, AmΔsph/gfp ile karşılaştırıldı.

3.9.2. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Enfektivitesi

Virüs enfektivitesinin belirlenmesi, virüs konsantrasyonunun AmΔsph/gfp virüse göre kıyaslanması ile gerçekleştirildi. Hem AmΔsph/gfp (*sph* geni yerinde *gfp* geni içeren rekombinant virüs) hem de AmΔgt/gfp ile enfekte edilen Ld652 hücrelerinden,

enfeksiyondan sonra 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde virüs süspansiyonu elde edildi. Elde edilen süspansiyonların konsantrasyonları, EPDA deneyi ile belirlendi. Deneyler, üç tekrar olarak yapıldı ve oluşan ortalama değerler kullanılarak grafik hazırlandı. Elde edilen değerlere SPSS independent-sample T analizi uygulandı. Bu sonuçlara göre rekombinant virüs enfeksiyonunda önemli bir değişme olmadığı belirlendi (Şekil 53).

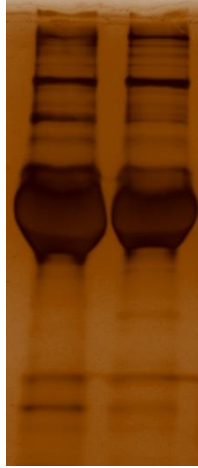


Şekil 53. Rekombinant virüs ve kontrol virüsün enfektivitesinin karşılaştırılması.

3.9.3. Rekombinant Virüsün (AmΔgt/gfp) Protein Profili

amv248 geninin AMEV genomundan silinmesi sonrası yapılan deneylerde virüsün DNA replikasyonunun kontrol virüs ile farklılık göstermeyişi, aynı zamanda virüslerin halen enfektif olması bir takım yeniden düzenlemeler sonucu bazı gen ve gen ürünlerinin miktarında değişiklikler olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla rekombinant virüs ile AmΔsph/gfp virüs protein içerikleri bakımından karşılaştırılmıştır.

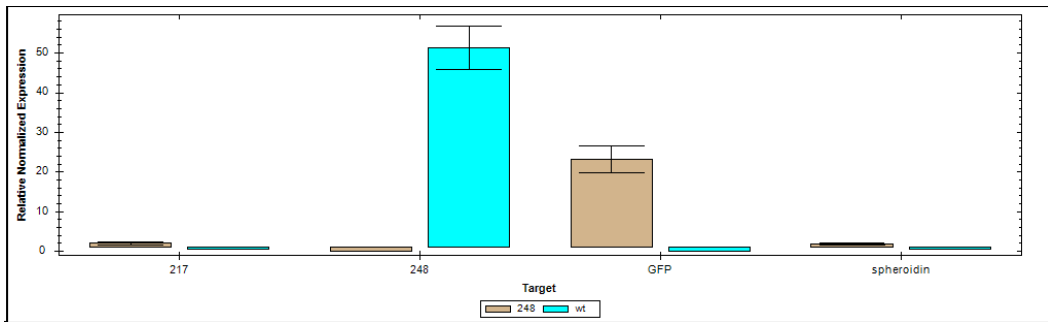
SDS-PAGE sonrası oluşan protein profili görüntülenmesi amacıyla jel gümüş boyamaya tabi tutulmuş ve ardından fotoğraflanmıştır (Şekil 54). Elde edilen protein profilleri incelendiğinde temel olarak bant profillerinin benzerlik gösterdiği, fakat bazı bantların yoğunluklarında değişiklikler olduğu görülmektedir.

Am Δ sph/gfp Am Δ gt/gfp

Şekil 54. Rekombinant virüs ile kontrol virüsün protein profillerinin karşılaştırılması.

3.9.4. Rekombinant Virüsün (Am Δ gt/gfp) Transkripsiyonel Analizi

Rekombinant virüs ile yaban tip AMEV viral glikozil transferaz (*amv248*), *gfp*, sferoidin (*sph*), *amv217* genleri ve referans gen olarak GAPDH geni kullanılarak transkripsiyonel seviyede karşılaştırıldı. Bu amaçla üretilmiş olan Am Δ gt/gfp virüs ile yaban tip virüsten RNA izolasyonu yapıldı, bu RNA'lar kalıp olarak kullanılarak cDNA üretilip qPCR metodu uygulandı ve elde edilen gen transkripsiyon grafiği Şekil 55'de, kantitatif değişim ise Tablo 9'da gösterildi.



Şekil 55. Rekombinant virüs ile yaban tip virüsün transkripsiyonlarının karşılaştırılması. 217: *amv217*, 248: *amv248*, GFP: rekombinant virüse eklenmiş olan *gfp* genini belirtmektedir.

Tablo 9. Rekombinant virüs ve yaban tip virüsün qPCR analizi ile karşılaştırılması.

Hedef Gen	Virüs	Regülasyon (Değişim)	Kontrolle göre değişim
<i>amv217</i>	AmΔgt/gfp	4,08576	Artış
<i>amv217</i>	Wt AMEV	1,00000	Sabit
<i>amv248</i>	AmΔgt/gfp	-2598,77373	Azalım
<i>amv248</i>	Wt AMEV	1,00000	Sabit
<i>gapdh</i>	AmΔgt/gfp	-	Sabit
<i>gapdh</i>	Wt AMEV	-	Sabit
<i>gfp</i>	AmΔgt/gfp	539,89867	Artış
<i>gfp</i>	Wt AMEV	1,00000	Sabit
<i>sferoidin</i>	AmΔgt/gfp	3,86237	Sabit
<i>sferoidin</i>	Wt AMEV	1,00000	Sabit

Elde edilen bulgular beklenildiği üzere oluşturulan rekombinant virüsün *amv248* gen ifade seviyesinde yaban tip virüse oranla yüksek miktarda azalım olduğunu (2598 kat); aynı zamanda *amv248* geni yerine genoma eklenmiş olan *gfp* gen ifade seviyesinde ise ciddi bir artış olduğunu (540 kat) göstermektedir. Kontrol amacıyla deney grubuna eklenen sferoidin gen ifade seviyesinin ise her iki virüs kıyaslandığında anlamlı bir fark oluşturmadığı fakat membran proteini kodladığı bilinen *amv217* gen ifade seviyesinde ise yaban tip virüse oranla rekombinant virüste anlamlı (4 kat) bir artış olduğu görülmektedir.

4. TARTIŞMA

Poksvirüsler oldukça geniş bir virüs gurubu olup insandan böceğe kadar çeşitli organizmaları enfekte edip hastalanmalarına hatta ölümlerine sebep olurlar. İnsanlarda çiçek hastalığına sebep olan variola virüsü asırlarca büyük felaketlere sebep olmuştur. Ancak bu virüse karşı geliştirilen aşılarda, hastalığın yeryüzünden elimine edildiği Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiş ve böylece çiçek hastalığına karşı aşılama 1980 yılı itibariyle sona ermiştir. Bununla birlikte, ciddi bir biyoterörizm materyali, gen ifade ve transfer vektörü ve virüs-konak etkileşim mekanizmalarının anlaşılması için önemli bir model olmalarından dolayı poksvirüsler üzerinde halen daha yoğun araştırmalar sürdürülmektedir.

Böceklerde enfeksiyon oluşturan poksvirüsler (entomopoksvirüsler) diğer poksvirüslerde olduğu gibi dünyanın pekçok yerinde üzerinde önemli çalışmaların yürütüldüğü bir virüs grubudur (Thézé vd., 2013; Muratoglu vd., 2016; Nakai vd., 2016). Gen ifade ve gen transfer vektörü olma potansiyelinin yanı sıra tarım ve ormanlarda önemli kayıplara sebep olan zararlı böceklerin kontrollerinde önemli bir materyal olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler. Bu potansiyellerinden dolayı entomopoksvirüslerin önemli bir tip türü olan *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Virüsün konak seçiciliğini ve enfeksiyonun nasıl başladığını anlayabilmek ve amaca uygun olarak değiştirebilmek için enfeksiyonunun başlamasında rol alan proteinlerin neler olduğunun anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Daha önce yapılan AMEV'in DNA dizi çalışmalarında, *amv248* açık okuma zincirinin vaksinya virüs *h3l* geni homologu olduğu ileri sürülmüştür (Bawden vd., 2000). Böylece, bu tez çalışmasında *h3l* geni hakkında bilinenlerden yola çıkarak AMV248 açık okuma zincirinin moleküler yapısının ve virüs replikasyonundaki rolünün aydınlatılmasına yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Virüslerin hücreye giriş mekanizmaları incelendiğinde ilk adımın viral proteinlerin konak hücre yüzey glikozaminoglikanlarına (GAG) ya da diğer çeşitli reseptörlere tutunması olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda hedeflenen GAG'ların hücre tipine, virüs çeşidine ve deneysel çalışmalara göre farklılık gösterdiği ileri sürülmektedir (Moss 2016). Poksvirüslerin hücreye girişi incelendiğinde temel olarak vaksinya virüsler (VACV) model organizma olarak öne çıkmaktadır. VACV tutunma proteinlerinden H3 ve

A27'nin hücrel GAG'lardan heparan sülfat, D8 proteininin ise kondroitin sülfat ile bağlandığı aynı zamanda antikorlarca hedeflenebildikleri belirlenmiştir. Bir diğer tutunma proteini olan A26'nın ise ekstraselüler matriks proteini laminin ile etkileştiği gösterilmiştir (Schmidt vd., 2012; Moss 2012). Ayrıca VACV'de dört farklı tutunma proteini bulunmasına rağmen bu tutunma proteinlerinden sadece bir tanesinin (H3) tüm poksvirüsler arasında korunmuş olduğu belirtilmiştir (Moss 2012). Literatürde entomopoksvirüs tutunma proteinleri ile şu ana kadar yapılan bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) genomunda H3 protein ortologu bu tezin konusu olan *amv248* kodlu açık okuma zinciri tarafından kodlanmaktadır. Bawden vd., (2000) bu ORF'nin bir muhtemel glikozil transferaz genini kodladığını belirtmiştir.

AMV248 proteininin tahmini pI noktası 8,97 olarak görülmektedir (ExpASY Bioinformatics Resource Portal http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?Q9EMF8). Aynı zamanda hücrel GAG'ların büyük negatif yüklü polisakkaritlerden oluştuğu belirtilmiştir (Salvador vd., 2013). GAG tutunma motiflerinde bazik bölgeler içerdiği göz önüne alındığında viral enfeksiyon sırasında hücrel GAG'lar ile AMV248 proteini arasında uygun bir etkileşimden söz etmek mümkündür. Bu sayede AMEV'in hücreye ilk tutunması ve füzyon kompleksinin oluşumu için ilk adımın sağlandığı düşünülmektedir.

AMV248'in dizi analizi yapıldığında intraselüler olgun viriyon (IMV) membran proteinlerine ve glikozil transferazlara benzeyen farklı iki korunmuş bölge içerdiği görülmektedir (Şekil 26). O'Reilly ve Miller (1989) *Autographa californica multiply embedded nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) ile yaptıkları bir çalışmada, üretilen ekdisteroid UDP-glukoz transferaz (EGT) adı verilen bir proteinin hücrel ekdisteroid hormon miktarında değişimlere yol açarak böceğin instarlar arası geçişini ve pupaya girişinin önlendiğini göstermişlerdir. 2016 yılında H3 proteininin 3 boyutlu yapısı oluşturulmuş ve aynı zamanda UDP-glukoza bağlanan glikozil transferaz bölge içerdiği belirtilmiştir (Singh vd., 2016). Yine 2016 yılında entomopoksvirüsler ile yapılan bir çalışmada (Nakai vd., 2016) *Mythimna separata* larvalarında entomopoksvirüs enfeksiyonu sonucunda juvenil hormon ve ekdisteroid seviyelerinde değişimler olduğu gösterilmiştir. Bütün bu veriler AMV248 proteininin entomopoksvirüslerde bu değişikliklerden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, literatür taramalarında entomopoksvirüs glikozil transferazları ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Vaksinya virüs (VACV) genleri transkripsiyonel olarak *erken*, *ara* ve *geç* olmak üzere üç farklı sınıfta ifade edilmektedirler. Buna rağmen Bawden ve arkadaşları (2000) AMEV tüm genom dizi analizini yaptıkları çalışmalarında AMEV genlerini *erken* ve *geç* olmak üzere iki ana gruba ayırmıştır. Ancak, 2014 yılında Özşahin ve arkadaşları tarafından AMEV lipaz geninin (*amv133*) transkripsiyonel analizi yapılmış ve bu genin DNA sentez inhibitörü (sitozin β -D-arabinofuranosit, Ara-C) varlığında transkriptlenmeye devam etmesine rağmen, protein sentez inhibitörü olan siklohekzimit (CHX) varlığında transkriptlenemediği belirlenmiştir. Böylece, lipaz geninin *ara* gen sınıfına ait olduğu ileri sürülmüştür (Ozsahin vd., 2014). Bu sonuç, AMEV’de de transkripsiyonun 3 farklı grup altında ifade edildiğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada moleküler özellikleri aydınlatılmaya çalışılan *amv248*’in, lipaz genine benzer olarak DNA sentez inhibitörü varlığında transkriptlenip protein sentez inhibitörü varlığında ise transkriptlenmemesi bu genin de *ara* gen sınıfına ait olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 18). Vaksinya virüs (VACV) *ara* ve *geç* genlerinin ifadeleri üzerine yapılan bir çalışmada H3L proteinini kodlayan genin de *ara* gen olduğu belirtilmiştir (Yang vd., 2011).

amv133 ve *amv248* genlerinin transkripsiyon başlangıç bölgesine göre -21 ila -82 baz arasındaki bölgede (T/A)₃AT(T/A)₂TATT(T/A)₂ dizisini içermeleri (Ozsahin vd., 2014) her iki genin de aynı sınıfa dahil olabileceğini göstermektedir. Böylece belirtilen motifin AMEV *ara* gen sınıfı için korunmuş olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca *amv248* gen transkripsiyonunun enfeksiyonu takiben 3 ila 6 saatler arasında başladığı ve 24. saate kadar artarak devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 16). Bu durum bir başka *ara* gen olan *amv133* ile karşılaştırıldığında iki genin de transkripsiyonlarının aynı zaman aralığında başladığını ve artarak devam ettiğini göstermektedir. Böylece, bu ve daha önce yapılan çalışmalardan, AMEV’in gen ifadesinin, vaksinya virüslerinde olduğu gibi *erken*, *ara* ve *geç* gen ifade sınıflarına ayrıldığı, *ara* sınıfa ait genlerin ortak bir korunmuş diziye sahip olduğu ve transkripsiyonlarının enfeksiyondan sonra 3-6. saatler arasında başlayıp 24. saate kadar artarak devam ettiği ortaya konulmuş oldu.

amv248 geninin transkripsiyon başlangıç ve bitiş noktaları, 5’/3’ RACE analiziyle belirlendi. 5’ RACE analizine göre, transkripsiyon başlangıç bölgesinin 126 bazdan oluştuğu belirlendi (Şekil 21). AMEV *ara* gen sınıfına ait diğer üye *amv133* incelendiğinde bu genin transkripsiyon başlangıcının -77 olduğu görülmektedir. AMEV genomunda 5’ UTR bölgesi belirlenmiş bir diğer gen ise *erken* bir protein kodlayan protein kinaz genidir (*pk*). Bu genin 5’ UTR bölgesinin 54 bazdan oluştuğu belirtilmiştir (Muratoğlu vd., 2010).

Yang vd., tarafından bir çalışmada vaksinya virüs *ara* genlerinin ise 5' UTR bölgesinin 0-97 nükleotid arasında değiştiği belirtilmiştir. Ayrıca *amv133* için 3' UTR bölgesi belirlenememişken (yayınlanmamış bilgi), protein kinaz geninin ise 32 ve 22 nükleotidlik iki 3' UTR bölgesi içerdiği gösterilmiştir (Muratoğlu vd., 2010). AMV248 geninin 3' UTR bölgesinin ise 50-84 nükleotid uzunluğu aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar hedef gen olan *amv248*'in yukarı ve aşağı translasyona uğramayan bölgelerinin sırasıyla 126 ve 50-84 nükleotid boyutunda olduğunu göstermiştir.

Bütün bu bilgiler ışığında *amv248* geninin transkripsiyonu ve klonlama ve gen ifadesi çalışmalarında gerekli olan genin yapısı hakkında önemli bilgiler elde edilmiş oldu. Bunun yanı sıra, AMEV genlerinin çok azında çalışılmış olmasından dolayı genin transkripsiyonunun başlama ve bitiş yerleri (5' UTR) ile translasyonunun başlama ve bitiş yerleri (3' UTR) arasındaki nükleotit sayısı ve motiflerinde önemli bir benzerlikten söz edilemeyeceği görülmüş oldu.

Proteinlerin 3 boyutlu yapısının bilinmesi etkileşebileceği diğer proteinler veya daha küçük moleküllerin belirlenmesi için büyük önem taşımaktadır. Singh ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada vaksinya virüs H3 proteininin 3 boyutlu yapısı belirlenmiş, heparan sülfat ve UDP-glukoz ile bağlandığı gösterilmiştir. Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda AMV248 proteininin 3 boyutlu yapısı H3 proteini kalıp olarak kullanılarak çizilmiştir (Şekil 29). AMV248 proteini ve hücresel GAG'ların etkileşim simülasyonu otomatize docking server kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 31A). AMV248'in heparin ile *in silico* ortamda bağlanabileceği gösterilmiştir. Bu bilgiler AMV248'in viral enfeksiyon için gerekli ve önemli bir protein olduğunu göstermektedir.

AMV248 proteininin dizi analizleri sonucunda glikozaminoglikan bağlanma motiflerinin ikincil ya da üçüncül yapılarda görülebileceği öngörülmüştür. Yapılan docking analizleri sonucu AMV248 proteini ile heparin molekülü arasında lizin (90) aminoasiti ile Wander vaals etkileşimi, asparajin (141) aminoasiti ile konvensiyonel hidrojen bağı ve lizin (144) aminoasiti ile heparin molekülü arasında iyonik çekim gücü sonucu etkileşim olduğu ve bu bölgelerden bağlandığı görülmektedir (Şekil 31B). Bu aminoasitler incelendiğinde lizin aminoasitinin bazik asparajinin ise polar yüksüz aminoasit olduğu XBBBX motifinin BBB bölgesini bu aminoasitlerin oluşturabileceği görülmektedir. Bu bilgiler 3 boyutlu yapının inşası sırasında GAG bağlanma motiflerinin oluşabileceği önerisini önemli ölçüde desteklemektedir. Ayrıca Xie ve arkadaşları (2002) yapmış oldukları çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak adeno-associated virüs serotip

2'nin sahip olduğu heparan sülfat bağlanma bölgesinin 4 arjinin ve 1 lizin aminoasitlerinden oluşan bir pozitif yüklü yüzeyden oluştuğunu önermişlerdir (Xie vd., 2002). Böylece, biyoinformatik araçlar kullanılarak AMV248'in GAG'lara nasıl bağlandığı ilk defa bu çalışmada modellenmiş oldu.

In silico bağlanma testlerinden elde edilen verileri takiben, *amv248* genine ait protein (AMV248) Bac-to-Bac bakülovirüs vektör sistemi (BVS) kullanılarak üretildi (Şekil 37). BVS birçok yönüyle önemli avantajlara sahip olurken, bir böcek virüsü proteini olan AMV248'in başta antijenik özelliği olmak üzere gerekli tüm translasyon sonrası değişikliklerinin gerçekleşmesinin mümkün olduğu önemli bir sistemdir (van Oers 2011). Bu sistemde üretilen rekombinant proteinin virüs yapısındaki antijenik ve fonksiyonel özelliklerini en iyi şekilde korumuş olduğu kabul edilmektedir. Böylece, üretilen rekombinant protein daha sonra proteine karşı antikor üretmede ve *in vitro* heparin bağlanma deneylerinde kullanıldı.

BVS'de üretilen rekombinant AMV248 proteini kullanılarak virüs yapısında olan bu proteine karşı monoklonal antikor üretimi hizmet alımıyla gerçekleştirildi. Üretilen antikorum rekombinant proteine ve virüse bağlandığını western blot hibridizasyonu ile gösterilmesi (Şekil 40) bu antikorum immünolojik çalışmalarda virüse karşı kullanabileceğini gösterdi. Böylece ilk defa bu entomopoksvirüse karşı bir antikorum üretimi bu çalışmayla başarılmış oldu.

Şu ana kadar AMV248'in entomopoksvirüsler için korunmuş tek tutunma proteini olduğu bilinmektedir. VACV tutunma proteinleri ile yapılan çalışmalarda bu proteinlerin antikorlarca hedeflenebildikleri ve nötralizasyonları sonucu viral enfeksiyonda değişikliklere yol açılabildiği görülmüştür (Davies vd., 2005; Su vd., 2005; Su vd., 2007; Nelson vd., 2008; Moss 2012). Bu çalışma kapsamında oluşturulan antikor daha sonra viral stok ile enfeksiyon öncesi inkübasyona tabii tutuldu ve bu sayede immün nötralizasyon gerçekleştirilmiş oldu. Farklı konsantrasyonlardaki antikorla muamele sonrası enfeksiyon miktarında büyük oranda azalma olduğu tespit edildi (Şekil 39). Yüksek miktarda antikor kullanılmasıyla virüs üretiminin tamamen engellendiği belirlendi. Bu durumun daha önce VACV ile yapılan çalışmalarla ve AMV248 proteininin viral enfeksiyonda önemli bir rol aldığı varsayımına uyumlu olduğu görülmektedir. Vaksinya virüs H3 proteininin viral antiserum ile nötralizasyonu sonucu plak oluşumunda %60'a varan azalma görüldüğü gösterilmiştir (Lin vd., 2000). AMV248'in antikor ile nötralizasyonu için yapılan çalışmada da yavru virüs üretiminde %100'e varan azalma olduğu belirlenmiştir.

BVS’de üretilen rekombinant AMV248 proteini heparin bağlı boncuklar ile inkübe edildi, heparin boncuklara tutunduğu tahmin edilen proteinler heparin boncuklardan ayrıştırıldıktan sonra western blot analizine tabi tutuldu. Sonuç olarak, membranda AMV248’e ait band proteine özgü antikor ile belirlendiğinden, bu proteinin heparine bağlanmış olduğu böylece teyit edildi (Şekil 38). Bu sonuçlar, virüse ait AMV248 proteininin konak hücre yüzeylerinde de bulunan bir molekül olan heparine başarılı bir biçimde bağlanabileceğini gösterdi. Daha önce yapılan birçok çalışmada viral glikoziltransferazların hücresel GAG’ları hedeflediği gösterilmiştir (Chung vd., 1998; Lin vd., 2000; Salvador vd., 2013; O’Hearn vd., 2015; Singh vd., 2016).

Rekombinant AMV248 proteinin heparine bağlandığı göz önüne alındığında, AMEV’in kendisinin de heparine bağlanabileceği düşüncesi oluştu. Virüsün heparine tutunma kapasitesini test etmek amacıyla viral stok heparin boncuklar ile inkübe edilerek daha sonra heparin boncuklardan geri kazanıldı. GFP proteinine özgü antikor primer antikor olarak kullanılarak western blot analizi yapıldı ve virüslerin heparine *in vitro* koşullarda bağlandığı gösterildi (Şekil 40). Virüsün heparin ile bağlanma göstermesi, AMEV enfeksiyonu için tutunma mekanizmasında konak hücre yüzeyindeki heparinlerin görev aldığını göstermektedir. Filovirüslerle yapılan bir çalışmada 5 farklı virüsün heparin bağlı boncuklara bağlandığı gösterilmiştir (Salvador vd., 2013; O’Hearn vd., 2015). Elde edilen bu sonuçların tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Hücre yüzeylerinde bulunan glikozaminoglikanlar genel olarak hyaluronan, heparin/heparan sülfat, kondroitin sülfat/dermatan sülfat ve keratan sülfat olmak üzere 4 aileye ayrılmaktadır (Kamhi vd., 2013). Hücresel glikozaminoglikanların viral enfeksiyon için hedef olabildikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda birçok hastalık yapıcı virüsün GAG’ları hedefleyerek enfeksiyonu başlattıkları gösterilmiştir (Kamhi vd., 2013). Çözünebilir GAG’ları hedefleyen proteinlerin doyurulması amacıyla virüsler ile pre-inkübasyona bırakılmaları ve ardından enfeksiyon miktarındaki değişiklikler ile karşılaştırma yapılmasına literatürde sıkça rastlanılmaktadır. Filovirüslerin glikozaminoglikanlara bağlandığı gösterildiği bir çalışmada, enfeksiyon yapılan virüslere ve hedef hücrelere göre enfeksiyonun inhibisyonunun farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Salvador vd., 2013). Bununla birlikte, çözülebilir heparinin en düşük konsantrasyonda bile belirgin bir inhibisyona yol açtığı bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Yine herpesvirüslerin hücresel GAG’lardan heparan sülfatı hedeflediği bilinmektedir (Shieh ve Spear 1994).

Vaksinya virüs enfeksiyonunun GAG'lar ile etkileşimi ile ilgili yapılan bir çalışmada A27 proteininin heparan sülfata bağlandığı ve ayrıca cowpox, rabbitpox, Shope fibroma virüs ve myxoma virüsün heparan sülfata bağlandığı gösterilmiştir (Chung vd., 1998). Ld652 böcek hücrelerinin yüzeyinde bu GAG'lardan hangilerinin bulunduğu ve AMEV'nün bunlardan hangisine ne ölçüde bağlandığı konusunda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada AMEV enfeksiyonunun tüm çözünebilir glikozaminoglikanların varlığında düşük doz uygulamasında dahi virüs üretiminin büyük oranda azalış gösterdiği belirlendi (Şekil 41). Yine tez çalışmasına paralel olarak VACV ile yapılan bir çalışmada da çözünebilir heparin ve heparan sülfatın 50 µg/ml konsantrasyonda nötral pH koşullarında viral enfeksiyonu sırasıyla %90 ve %60 azalttığı belirlenmiştir (Bengali vd., 2009). Bu veriler, AMEV'in yüzeyinde en azından heparine bağlanma proteinlerini içerdiği ve virüsün bu GAG'lar ile doyurulması sonucunda enfeksiyon başlatma kapasitesinin ortadan kalktığı gösterilmiştir.

Dizi analizi sonuçlarına göre AMEV genomundaki tek tutunma proteininin AMV248 olduğu öne çıkmaktadır (Bawden vd., 2000; Moss 2012). Hücrel GAG'ların enzimatik olarak hücre yüzeyinden uzaklaştırılması sonucu enfeksiyonun inhibisyonu hem viral enfeksiyonda GAG bağımlı yolağın önemini belirlemek hem de alternatif yolların olup olmadığının araştırılması bakımından önemlidir. Filovirüsler ile yapılan bir çalışmada (Salvador vd., 2013) sadece heparan sülfatları çıkaran heparinaz III ve hem heparan sülfat hem de heparinleri çıkaran heparinaz I enzimleri uygulanan hücrelerin virüs tipine göre farklı inhibisyon oranlarına sahip oldukları belirlenmiştir. Bu doğrultuda Ld652 hücrelerinin yüzeyinden heparin ve heparan sülfatın heparinaz I ve III enzimleriyle uzaklaştırılmasının AMEV replikasyonuna etkisi araştırıldı. Elde edilen bulgular incelendiğinde AMEV enfeksiyonunun inhibisyon oranının heparinaz I ile hücrel GAG'ları çıkarılan hücrelerde uygulanan enzim miktarına göre artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 42). Heparinaz III uygulaması yapılan hücrelerde ise enfeksiyon miktarında azalış görülmedi (Şekil 43). Bu da *Amsacta moorei entomopoxvirus* enfeksiyonunun, hücrel GAG'lardan olan ve heparinaz I ile enzimatik olarak çıkarılabilen heparin ile etkileşim sonucu başladığı önerisini doğrulamaktadır.

Elde edilen tüm bulgular incelendiğinde AMV248 proteininin viral enfeksiyonda önemli bir rol oynadığı yürütülen mevcut çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca AMEV'in ve AMV248 proteininin antikorlarca hedeflenebilir olduğu gösterilmiştir. AMV248 proteininin heparin ile bağlanması hem *in silico* hem de *in vitro* ortamlarda test edilmiş ve

benzer sonuçlar alınmıştır. Hem çözünebilir GAG'lar varlığında hem de enzimatik yolla GAG'ları çıkarılan hücrelerin enfeksiyonu sonucu elde edilen bulgular AMEV enfeksiyonunun heparin bağımlı başladığını açıkça ortaya koymaktadır.

Bu aşamaya kadar yürütülen çalışmalarda *amv248* geninin AMEV'in Ld652 hücrelerinde replikasyonun başlamasında önemli rol oynadığı, bu rolünü hücre yüzey GAG'larından olan heparine bağlanarak başlattığı sonucuna varılmıştır. Ancak, AMV248 proteininden başka virüs protein(ler)inin herhangi birinin bu rolü üstlenip üstlenmediği hususunda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu durumu araştırmak için *amv248* geninin genomdan silinmesi sonucunda virüs replikasyonunun ne boyutta olabileceğinin test edilmesi gerekirdi. Böylece, AMEV genomundan *amv248* geni silinerek yerine homolog rekombinasyonla *gfp* işaret geni dizisi eklenmiş olan rekombinant virüs (AmΔgt/*gfp*) başarılı bir şekilde oluşturuldu (Şekil 47 – 49). Oluşturulan virüs hem mikroskopik olarak, hem de dizi analizi yapılarak ve qPCR metodu ile moleküler olarak doğrulandı. Oluşturulan rekombinant virüsün Ld652 hücrelerini enfeksiyonu sonucu üretilen plakların morfolojilerinin kontrol virüs plak oluşumuyla farklılıklar (daha küçük plak) gösterdiği belirlendi. Elde edilen bu sonuç vaksinya H3L proteinini içermeyen mutant virüs ile yapılan çalışmada oluşan plakların yaban tipten daha küçük boyutlu olduğu verisi ile de benzerlik göstermektedir.

Oluşturulan rekombinant virüsün replikasyonunun araştırılması amacıyla tez kapsamında, enfekte Ld652 hücrelerinde rekombinant virüsün DNA replikasyonu, kontrol virüs ile karşılaştırıldı. Bu çalışmada, AmΔgt/*gfp* rekombinant virüsü ile kontrol virüs (AmΔsph/*gfp*) DNA replikasyonlarının enfeksiyon sonrası 12. saatte başlayıp 72. saate kadar devam ettiği ve iki virüs arasında herhangi bir fark olmadığı gösterildi (Şekil 52). Böylece, *amv248* geninin virüs genomundan silinmesinin virüs DNA replikasyonunda herhangi bir azalmaya sebep olmadığı görüldü.

Ayrıca, rekombinant AmΔgt/*gfp* virüsün enfektivitesinin kontrol virüs (AmΔsph/*gfp*) ile karşılaştırılması yapıldı. Bu sonuçlar da kontrol virüs replikasyonu ile rekombinant virüs replikasyonu arasında önemli bir farklılığın olmadığını gösterdi (Şekil 53). Bu durum AMEV enfeksiyonunda, viral tutunma için AMV248 dışında başka protein veya proteinlerin de görevli olabileceğini düşündürmektedir. Vaksinya virüs (VACV) ile yapılan çalışmalarda enfeksiyonun H3, A27 ve D8'in GAG'lar ile tutunması sonucu başladığı biliniyor olsa da bu proteinlerce tutunma viral enfeksiyon için mutlaka olmak zorunda değildir. AMV248 proteinini içermeyen AMEV'in hala enfektif olmasına benzer olarak

H3, A27 ve D8 proteinlerinin genomdan silinmiş olan mutant virüslerin de hala enfektif oldukları rapor edilmiştir (Carter vd., 2005; Moss 2006; Singh vd., 2016).

Aynı zamanda *amv248* geninin genomdan silinmesinin protein profiline etkisini araştırmak amacıyla üretilen viral stoklardan (*AmΔsph/gfp* ve *AmΔgt/gfp*) eşit miktarda virüs SDS-PAGE elektroforezine tabii tutulmuş ve ardından oluşan protein bant profilleri gümüş boyama yapılarak karşılaştırılmıştır (Şekil 54). Elde edilen sonuçlar protein profillerinde birtakım farklılıklar oluşmakla birlikte genel itibariyle kontrol virüs ve *AmΔgt/gfp* bant profillerinin benzer olduğunu göstermiştir. Protein profillerinin daha detaylı araştırılması ile ortaya çıkan bu farklılıkların belirlenebileceği düşünülmektedir.

Diğer bir çalışmada ise, oluşturulan rekombinant virüs ile yaban tip virüsün transkripsiyonel seviyede karşılaştırılması düşünüldü. qPCR metoduyla bu amaç doğrultusunda yapılan deneyde, GAPDH geni (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) referans olarak alınmış, rekombinant virüs oluşumunun teyidi amacıyla glikozil transferaz geni (*amv248*) ve *gfp* geni kontrol olarak deneye eklenmiştir. Yaban tip virüste glikozil transferaz gen transkripsiyonu görülürken *gfp* geni eksik olduğu için bu gene özgü transkripte rastlanmamıştır (Şekil 55). Ayrıca, rekombinant virüste ise glikozil transferaz genine ait transkript görülmemiş buna karşın *gfp* gen ürününün varlığı teyit edilmiştir. Sferoidin proteini ve miristilasyonlu membran proteini kodladığı belirtilen *amv217* geninin transkripsiyonları karşılaştırılmış sferoidin proteini için virüsler arası herhangi bir anlamlı fark bulunmaz iken rekombinant virüsün transkripsiyon seviyesinin *amv217* geninde belirgin bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 55, Tablo 9). Bu durum, *amv248*'in yanısıra, *amv217* geninin de tutunmada rol oynayabileceğini işaret etmektedir. Elde edilen bu veriler, *AmΔgt/gfp*'nin rekombinant yavru virüs miktarındaki değişimin olmaması AMEV enfeksiyonunda, viral tutunma için AMV248 dışında başka protein veya proteinlerin de görevli olabileceği görüşünü desteklemektedir.

AMV217 proteini miristilasyonlu bir membran proteinidir ve aynı zamanda vaksinya virüs ortoloğu L1 proteininin virüsün hücreye giriş mekanizmasında rol aldığı bilinmektedir. L1 proteininin hücre kültüründe virüs replikasyonu için zorunlu olduğu ve L1 ifadesinin bloklanması durumunda olgunlaşmamış virionların birikimine yol açtığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Franke vd., 1990; Ravanella ve Hruby 1994). Buna göre, AMV248 proteininin varlığında AMV217'nin kısmen baskılanmakta olduğu, ancak AMV248 yokluğunda bu baskılanma ortadan kalktığı için AMV217'nin viriyonları başarılı bir şekilde üreterek hücre dışına salmakta olduğu hipotezi geliştirilebilir. Bu hipotez,

Am Δ gt/gfp'nin rekombinant yavru virüs miktarındaki önemli bir farklılığın olmamasını da açıklamaktadır. Sonuç olarak, AMEV'e ait AMV248 proteininin virüsün enfeksiyonun başlaması için hücre yüzeyinde bulunan heparine tutunmanın yanısıra, virüs replikasyonu sırasında gerçekleşen gen regülasyonunda da görev almış olabileceği düşünülmektedir.



5. SONUÇLAR

Tez kapsamında AMEV'in konak seçiciliğinde ve konak hücreye tutunmasında rol oynadığı ve virüs replikasyonun başlaması için zorunlu olduğu varsayılan bir yapısal proteini kodladığı düşünülen *amv248* kodlu genin virüsün konağa tutunmasındaki rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1) *amv248* geninin yapısının aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda;

- a) *amv248* gen transkripsiyonu viral enfeksiyonu takiben 3. ve 6. saatler arasında başlayıp enfeksiyonun ilerleyen saatlerinde de devam etmektedir.
- b) *amv248* geninin transkripsiyonunu protein sentez inhibitörü olan CHX varlığında gerçekleşmezken; DNA sentez inhibitörü olan Ara-C'nin varlığında ise gerçekleşmektedir ve *amv248 ara (intermediate)* gen sınıfına aittir. Elde edilen veriler AMEV ara gen sınıfına ait üyelerin (T/A)₃AT(T/A)₂TATT(T/A)₂ korunmuş bölgesine sahip olabileceğini düşündürmektedir.
- c) *amv248* geninin 5' translasyona uğramayan bölgesi (UTR) 126 baz uzunluğundadır ve gen transkripsiyonu AMEV genomunun 204704. sırasındaki guanin bazı itibariyle başlamaktadır.
- d) *amv248* geninin 3' translasyona uğramayan bölgesi (UTR) gen stop kodonundan itibaren 50 – 84. bazlar arasına denk gelmektedir ve muhtemel transkripsiyon sonlanma noktası AMEV genomundaki 205750 – 205784. sırasındaki bazlar arasındadır.

Transkripsiyonel çalışmalar sonucunda *amv248* geninin yapısı aydınlatılmış oldu, bu bilgilerin daha önce çalışılmış *amv133* geni bilgileriyle uyumlu olduğu görüldü, böylece virüsün ara genlerinin yapısal ve transkripsiyonel özellikleri ve muhtemel korunmuş bölgeleri hakkında genel bir sonuca varılmış oldu.

2) AMV248 ektodomeinini içeren 3 boyutlu protein yapısı oluşturulmuştur. Bu yapı *in silico* ortamda proteinin hücre yüzey GAG'larından heparin ile bağlandığını göstermiştir. Bu bağlanmanın GAG tutunma motifine (XBBBX) benzediği, motifi ise AMV248'in 90.

141. ve 144. sırada bulunan lizin, asparajin ve lizin aminoasitlerinin oluşturduğu görülmektedir.

Bu çalışmalar sonucunda diğer viral tutunma proteinlerinde olduğu gibi pozitif yüklü (bazik) aminoasitlerden oluşan, AMEV heparin bağlanma motifi ilk kez çalışılmış ve belirlenmiş oldu.

3) Rekombinant AMV248 protein oluşturulması ve bu proteine özgü antikor ürettirilerek virüsün immün nötralizasyonunun sağlanması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda;

- a) AMV248 ektodomeinini içeren rekombinant AMV248 proteini bakülovirüs vektör sisteminde başarıyla ifade edilerek 30 kDa'luk protein saflaştırıldı ve western blot analizi ile doğrulandı.
- b) AMV248 proteinine özgü üretilen antikor ile AmΔsph/gfp virüsün pre inkübasyonu sonucu en düşük miktarda antikor içeren seyreltikte bile yavru virüs üretiminde belirgin bir düşüş olduğu belirlendi.

Bu durum AMEV enfeksiyonunun AMV248 proteini hedeflenerek inhibe edilebileceğini göstermektedir. Bu çalışmalar sonucunda VACV tutunma proteinlerinden elde edilen sonuçlara benzer olarak AMEV enfeksiyonunun viral tutunma proteini hedeflenerek inhibe edilebileceği gösterildi. Ayrıca bu çalışma ile AMEV proteinlerine karşı antikor ilk kez üretilmiş oldu.

4) Virüslerin hücre yüzeylerine bağlanma özellikleri araştırıldı ve bu çalışmalarda;

- a) Rekombinant AMV248 proteininin hücre yüzey matriks elemanlarından heparin ile bağlandığı heparin bağlı boncuklar yardımıyla gösterildi.
- b) AmΔsph/gfp virüsün hücre yüzey matriks elemanlarından heparin ile bağlandığı heparin bağlı boncuklar ile etkileşim sonucu virüsün taşıdığı GFP proteinine özgü antikor yardımı ile western blot analizi ile gösterildi.
- b) AmΔsph/gfp virüs enfeksiyonunun çözülebilir glikozaminoglikanlar varlığında inhibe edildiği gösterildi. Bu amaçla çeşitli seyreltikler olarak hazırlanan çözülebilir heparin, heparan sülfat, kondroitin sülfat A ve kondroitin sülfat B virüs ile enfeksiyon öncesi inkübasyona bırakılarak en düşük seyreltikte dahi viral enfeksiyonun inhibe edildiği belirlendi.

- c) Am Δ sph/gfp virüslerin enzimatik olarak yüzey GAG'ları çıkarılan hücrelere bağlanma etkileri araştırıldı. Sadece hücre yüzeyindeki heparan sülfatları kıran heparinaz III ve hücre yüzeyindeki hem heparan sülfatları hem de heparin molekülünü kıran heparinaz I enzimleri Ld652 hücrelerine farklı seyreltikler halinde ayrı ayrı uygulanmış ve heparinaz III muamelesi sonrası viral enfeksiyonun inhibe edilemediği buna karşın heparinaz I muamelesi sonrası ise enfeksiyon miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Viral enfeksiyonların GAG'lar hedeflenerek başlatıldığı bir çok çalışmada gösterilmiştir. Yine bu çalışmada elde edilen bulgular sonucu AMEV enfeksiyonunun hücrel GAG'lardan heparin molekülü ile tutunma ile başladığı ilk defa gösterilmiş oldu.

5) Homolog rekombinasyonla glikozil transferaz geni (*amv248*) çıkartılmış rekombinant virüs oluşturuldu. Bu çalışmalar sonucunda;

- Oluşturulan rekombinant virüsün (Am Δ gt/gfp) replikasyon özellikleri çalışılmış ve DNA replikasyonunun kontrol virüs (Am Δ sph/gfp) ile benzer olarak enfeksiyonu takiben 12. saatte başlayıp 72. saate kadar devam ettiği belirlenmiştir. Bu bilgiler rekombinant virüs ile kontrol virüsün DNA replikasyonu bakımından farklarının olmadığını göstermektedir.
- Rekombinant virüsün enfektivitesi kontrol virüs (Am Δ sph/gfp) ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi.
- Rekombinant virüsün protein profili kontrol virüs (Am Δ sph/gfp) ile karşılaştırıldı ve her iki virüsün benzer protein profiline sahip olduğu belirlendi.
- Rekombinant virüs ile yaban tip virüs transkripsiyonel olarak karşılaştırılarak *amv248* geninin rekombinant virüste transkribe edilmediği, buna karşın yaban tipte transkripsiyonu gerçekleşmeyen *gfp* geninin transkribe olduğu görüldü. Ayrıca sferoidin gen (*sph*) transkripsiyonu her iki virüs için fark oluşturmazken; *amv217* geninin transkripsiyonunun rekombinant virüste 4 kat artış gösterdiği belirlendi.

Bu sonuçlar *amv248* proteinin virüsün hücreye tutunması rolünün yanında gen regülasyonunda da rol oynayabileceği ve hücrel tutunmada AMV248 proteininin yanısıra başka protein(ler)in de görev alabileceği düşüncesini doğurdu.

6. ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, AMEV yapısının ve enfeksiyon mekanizmasının aydınlatılması bakımından önemli sonuçlara varılmış olmanın yanısıra, yeni araştırmaların yapılmasına öncülük edebilecek bir takım soru ve önerilerin ortaya çıkmasına imkan sağlamıştır. Bu öneriler kısaca aşağıdaki şekilde sıralanmıştır:

1) Yapılan bu çalışmayla ve *amv133* geni ile yapılan çalışma sonucunda AMEV gen ifadesinin 3 farklı sınıfa ayrıldığı ve ara genlerin (T/A)₃AT(T/A)₂TATT(T/A)₂ motifini içerebilecekleri sonucuna varılmıştır. Böylece AMEV genomunda bulunan tüm genlerin ifade sınıflarının ve bu sınıflamaya yardımcı olabilecek ortak dizilerin belirlenmesi virüsün replikasyon mekanizmasının moleküler seviyede anlaşılması bakımından literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

2) Bu çalışmada oluşturulan rekombinant virüsün (AmΔgt/gfp) transkripsiyonel ve enfeksiyonel özelliğinin yaban tip virüs (AMEV) ile karşılaştırılması sonucu AMEV genomunda birden fazla tutunma proteini olabileceği sonucuna varılmıştır. Rekombinant virüste *amv217* geninin transkripsiyonunun artması, *amv248* gibi membran bağlanma domeini ve mrstilasyon bölgesi içermesi ve heparine bağlanma potansiyelinin olması bu geni alternatif virüs tutunma proteini olabileceğini göstermektedir. Bu yüzden *amv217* geninin yapısı ve fonksiyonu araştırılması virüs replikasyonunun erken basamağının anlaşılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

3) VACV h3 genini içermeyen virüsün elektron mikroskopi çalışmaları sonucunda morfolojik farklılıklar belirlenmiş, morfogeneziste rol alabileceği öne sürülmüştür. Böylece AmΔgt/gfp virüs yaban tip virüs ile elektron mikroskopi çalışmalarıyla karşılaştırılmalı ve AMV248 proteininin AMEV morfogenezisindeki olası rolü incelenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Oma, E., Kutish, G. F. ve Rock, D. L., 1999. The genome of *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*, Journal of virology, 73,1, 533–552.
- Alaoui-Ismaili, M. H. ve Richardson, C. D., 1996. Identification and characterization of a filament-associated protein encoded by *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Journal of virology, 70,5, 2697–2705.
- Alaoui-Ismaili, M. H. ve Richardson, C. D., 1998 Insect virus proteins (FALPE and p10) self-associate to form filaments in infected cells, Journal of virology, 72,3, 2213–2223.
- Anderson, D., Harris, R., Polayes, D., Ciccarone, V., Donahue, R., Gerard, G., Jessee, J. ve Luckow, V., 1996. Rapid Generation of Recombinant Baculovirus and Expression of Foreign Genes using the Bac-To-Bac™ Baculovirus Expression System, Focus, 17, 53–58.
- Balaj, L., Atai, N. A., Chen, W., Mu, D., Tannous, B. A., Breakefield, X. O., Skog, J. ve Maguire, C. A., 2015. Heparin affinity purification of extracellular vesicles, Scientific Reports, 5, 10266.
- 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, 120–39.
- Becker, M. N., Greenleaf, W. B., Ostrov, D. A. ve Moyer, R. W., 2004. *Amsacta moorei entomopoxvirus* Expresses an Active Superoxide Dismutase, Journal of virology, 78,19, 10265–10275.
- Becker, M. N., Todd, T. M. ve Moyer, R. W., 2008. An *Amsacta moorei entomopoxvirus* ortholog of the poly(A) polymerase small subunit exhibits methyltransferase activity and is non-essential for virus growth, Virology, 375,2, 624–36.
- Bengali, Z., Townsley, A. C. ve Moss, B., 2009. *Vaccinia virus* strain differences in cell attachment and entry, Virology, 389,1–2, 132–140.
- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Reproduction, Analytical Biochemistry, 72, 248–254.
- Broyles, S. S., 2003, *Vaccinia virus* transcription, Journal of General Virology, 84,9, 2293–2303.
- Burand, J. P. ve Park, E. J., 1992. Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae, Journal of Invertebrate

Pathology, 60,2, 171–175.

- Campbell, J. a, Davies, G. J., Bulone, V. ve Henrissat, B., 1997. A classification of nucleotide-diphosphosugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities, The Biochemical journal, 326, 3, 929–39.
- Carter, G. C., Law, M. M., Hollinshead, M. ve Smith, G. L., 2005. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans, Journal of General Virology, 86,5, 1279–1290.
- Cebulla, C. M., Miller, D. M., Knight, D. A., Briggs, B. R., McGaughy, V. ve Sedmak, D. D., 2000. Cytomegalovirus induces sialyl Lewis(x) and Lewis(x) on human endothelial cells, Transplantation, 69,6, 1202–1209.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. ve Chang, W., 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate, Journal of virology, 72,2, 1577–1585.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. ve Henrissat, B., 2003. An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases, Journal of Molecular Biology, 328,2, 307–317.
- da Fonseca, F. G., Wolffe, E. J., Weisberg, A. ve Moss, B., 2000. Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail, Journal of virology, 74,16, 7508–17.
- Davies, D. H., McCausland, M. M., Valdez, C., Huynh, D., Hernandez, J. E., Mu, Y., Felgner, P. L. ve Crotty, S. 2005. *Vaccinia virus* H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice, Journal of Virology, 79,18, 11724–11733.
- Dougherty, E. M., Kelly, T. J., Rochford, R., Forney, J. A., Adams, J. R., Effects of infection with a granulosis virus on larval growth, development and ecdysteroid production in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, Physiological Entomology, 12,1 (1987) 23–30.
- Dulbecco, R. ve Vogt, M., Some problems of animal virology as studied by the plaque technique, 1953. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 18, 273–279.
- Franke, C. A., Wilson, E. M. ve Hruby, D. E., 1990. Use of a cell-free system to identify the vaccinia virus L1R gene product as the major late myristylated virion protein M25, Journal of virology, 64,12, 5988–96.
- Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J. C. ve Bergoin, M., 1995, The *Melolontha melolontha entomopoxvirus* (MmEPV) Fusolin Is Related to the Fusolins of Lepidopteran EPVs and to the 37K Baculovirus Glycoprotein, Virology, 208,2,

427–436.

- Granados, R. R. ve Naughton, M., 1975. Development of *Amsacta moorei entomopoxvirus* in ovarian and hemocyte cultures from *Estigmene acrea* larvae, Intervirology, 5,1–2, 62–8.
- Gruidl, M. E., Hall, R. L. ve Moyer, R. W., 1992. Mapping and molecular characterization of a functional thymidine kinase from *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Virology, 186,2, 507–516.
- 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, 146,1–2, 389–92.
- Haller, S. L., Peng, C., Mcfadden, G. ve Rothenburg, S., 2014. Infection , Genetics and Evolution Poxviruses and the evolution of host range and virulence, Infection genetics and evolution, 21, 15–40.
- Henderson, D. A., Inglesby, T. V, Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Jahrling, P. B., Hauer, J., Layton, M., McDade, J., Osterholm, M. T., O’Toole, T., Parker, G., Perl, T., Russell, P. K. ve Tonat, K., 1999. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management Working Group on Civilian Biodefense, JAMA, 281,22, 2127–2137.
- Hiraiwa, N., Yabuta, T., Yoritomi, K., Hiraiwa, M., Tanaka, Y., Suzuki, T., Yoshida, M. ve Kannagi, R., 2003. Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through a variant cAMP-responsive element, Blood, 101,9, 3615–3621.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. ve Chang, W., 1999. *Vaccinia virus* envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells, Journal of virology, 73,10, 8750–8761.
- Kamhi, E., Joo, E. J., Dordick, J. S. ve Linhardt, R. J., 2013. Glycosaminoglycans in infectious disease, Biological Reviews, 88,4, 928–943.
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Müller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.W., King, J.A. ve Kleinschmidt, J.A., 2003. Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, Journal of Virology, 77, 20, 11072-11081.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227,5259, 680–685.
- Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M. ve Smith, G. L., 2006. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103,15, 5989–5994.

- Li, Q., Liston, P. ve, Moyer, R. W., 2005. Functional analysis of the inhibitor of apoptosis (iap) gene carried by the entomopoxvirus of *Amsacta moorei*, Journal of virology, 79,4, 2335–2345.
- Li, Q., Liston, P., Schokman, N., Ho, J. M. ve Moyer, R. W., 2005. *Amsacta moorei* entomopoxvirus inhibitor of apoptosis suppresses cell death by binding Grim and Hid, Journal of virology, 79,6, 3684–91.
- Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G. ve Chang, W., 2000. *Vaccinia Virus* Envelope H3L Protein Binds to Cell Surface Heparan Sulfate and Is Important for Intracellular Mature Virion Morphogenesis and Virus Infection In Vitro and In Vivo, Journal of Virology, 74,7, 3353–3365.
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y. ve Ren, J. 2015. “IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences”, Bioinformatics, 31,20, 3359–3361.
- Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., Van Etten, J. L., Korres, H., Verma, N. ve Vanderplasschen, A., 2004. Glycosyltransferases encoded by viruses, The Journal of General Virology, 85,10, 2741–54.
- Marlow, S. A., Billam, L. J., Palmer, C. P. ve King, L. A., 1993. Replication and morphogenesis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus in cultured cells of *Estigmene acrea* (salt marsh caterpillar), Journal of General Virology, 74, 1457–1461.
- Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M., Wilkinson, N. ve King, L. A., 1998. Assembly of *Amsacta moorei* entomopoxvirus spheroidin into spheroids following synthesis in insect cells using a baculovirus vector, The Journal of General Virology, 79, 623–628.
- 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, 436–47.
- Morris, G. ve Huey, R., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, Journal of computational chemistry, 30,16, 2785–2791.
- Morrissey, J. H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity, Analytical Biochemistry, 117,2, 307–310.
- Moss, B., 2006. Poxvirus entry and membrane fusion, Virology, 344, 48–54.
- Moss, B., 2012. Poxvirus cell entry: how many proteins does it take?, Viruses, 4,5, 688–707.
- Moss, B., 2015. Poxvirus membrane biogenesis, Virology, 479–480, 619–26.

- Moss, B., 2016. Membrane fusion during poxvirus entry, Seminars in Cell and Developmental Biology, in press.
- 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 Research, 215, 25–36.
- Muratoğlu, H., Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2010. Transcriptional and structural analyses of *Amsacta moorei entomopoxvirus* protein kinase gene (AMV197, pk), Annals of Microbiology, 60,3, 523–530.
- Nakai, M., Kinjo, H., Takatsuka, J., Shiotsuki, T., Kamita, S. G. ve Kunimi, Y., 2016. Entomopoxvirus infection induces changes in both juvenile hormone and ecdysteroid levels in larval *Mythimna separata*, Journal of General Virology, 97, 225–232.
- Nalcacioglu, R., Akturk, Y., Vlak, J. M., Demirbag, Z. ve van Oers, M. M., 2010. *Amsacta moorei entomopoxvirus* encodes a functional DNA photolyase (AMV025), Journal of invertebrate pathology, 105,3, 363–5.
- Nelson, G. E., Sisler, J. R., Chandran, D., ve Moss, B., 2008. Vaccinia virus entry/fusion complex subunit A28 is a target of neutralizing and protective antibodies, Virology, 380,2, 394–401.
- O’Hearn, A., Wang, M., Cheng, H., Lear-Rooney, C. M., Koning, K., Rumschlag-Booms, E., Varhegyi, E., Olinger, G. ve Rong, L., 2015. Role of EXT1 and Glycosaminoglycans in the Early Stage of Filovirus Entry, Journal of Virology, 89,10, 5441–5449.
- O’Reilly, D. R., 1995. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 25,5, 541–550.
- O’Reilly, D. R. ve Miller, L. K., 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase, Science, 245, 1110–1112.
- O’Reilly, D. R. ve Miller, L. K., 1990. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDPglucosyltransferase gene, Journal of virology, 64,3, 1321–8.
- Özsahin, E., Sezen, K. ve Demirbag, Z., 2015. *Amsacta moorei entomopoxvirus* Encodes a Functional Esterase (amv133) with Protease Activity, Intervirology, 58,1, 41–48.
- Özsahin, E., Sezen, K. ve Demirbag, Z., 2014, Transcriptional analysis of ORF amv133 of *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Archives of virology, 159,10, 2541-2547.
- Palmer, C. P., Miller, D. P., Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M. ve King, L. A., 1995. Genetic modification of an entomopoxvirus: deletion of the spheroidin gene does not affect virus replication in vitro, The Journal of General Virology,

76,1, 15–23.

- Perera, S. C., Wong, P., Krell, P. J. ve Arif, B. M., 2010. Expression of heterologous genes in the *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Journal of Virological Methods, 165,1, 1–8.
- Petersen, B. O., Hall, R. L., Moyer, R. W. ve Shuman, S., 1997. Characterization of a DNA topoisomerase encoded by *Amsacta moorei entomopoxvirus*, Virology, 230, 197–206.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. ve Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, Nature Methods, 8,10, 785–786.
- Ravanello, M. P. ve Hruby, D. E., 1994. Conditional lethal expression of the vaccinia virus L1R myristylated protein reveals a role in virion assembly, Journal of virology, 68,10, 6401–6410.
- Reed, L. J. ve Hugo M., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints, The American Journal of Hygiene, 27,3, 493–497.
- Roberts, D. W. ve Granados, R. R., 1968. A poxlike virus from *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arctiidae), Journal of Invertebrate Pathology, 12,1, 141–143.
- Salvador, B., Sexton, N. R., Carrion, R., Nunneley, J., Patterson, J. L., Steffen, I., Lu, K., Muench, M. O., Lembo, D. ve Simmons, G., 2013. Filoviruses utilize glycosaminoglycans for their attachment to target cells, Journal of virology, 87,6, 3295–304.
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E. ve Mercer, J., 2012. Poxvirus host cell entry, Current Opinion in Virology, 2,1, 20–27.
- Sezen, K. ve Demirbag, Z., 2005. Entomopoksvirüsler ve Biyolojik Kontrol, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 29,4, 280–286.
- Shieh, M. T. ve Spear, P. G., 1994. Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heperan sulfate or soluble heparin, Journal of Virology, 68,2, 1224–1228.
- Singh, K., Gittis, A. G., Gitti, R. K., Ostazeski, S. A., Su, H.-P. ve Garboczi, D. N., 2016. The vaccinia virus H3 envelope protein, a major target of neutralizing antibodies, exhibits a glycosyltransferase fold and binds UDP-Glucose, Journal of Virology, 90,10, 5020-5030.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G. ve Krogh, A., 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 6, 175–182.

- Sriskanda, V., Moyer, R. W. ve Shuman, S., 2001. NAD⁺-dependent DNA ligase encoded by a eukaryotic virus, The Journal of biological chemistry, 276,39, 36100–36109.
- Su, H.-P., Garman, S. C., Allison, T. J., Fogg, C., Moss, B. ve Garboczi, D. N., 2005. The 1.51-Angstrom structure of the poxvirus L1 protein, a target of potent neutralizing antibodies, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102,12, 4240–4245.
- Su, H.-P., Golden, J. W., Gittis, A. G., Hooper, J. W. ve Garboczi, D. N., 2007. Structural basis for the binding of the neutralizing antibody, 7D11, to the poxvirus L1 protein, Virology, 368,2, 331–341.
- Subrahmanyam, B. ve Ramakrishnan, N., 1981. Influence of a baculovirus infection on molting and food consumption by *Spodoptera litura*, Journal of Invertebrate Pathology, 38,2, 161–168.
- Thézé, J., Takatsuka, J., Li, Z., Gallais, J., Doucet, D., Arif, B., Nakai, M. ve Herniou, E. A., 2013. New insights into the evolution of Entomopoxvirinae from the complete genome sequences of four entomopoxviruses infecting *Adoxophyes honmai*, *Choristoneura biennis*, *Choristoneura rosaceana*, and *Mythimna separata*, Journal of virology, 87,14, 7992–8003.
- URL-1, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/149.html Orthopoxvirus Virion yapısı. 10 Kasım 2016.
- URL-2, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/4400.html Orthopoxvirus Yapısal proteinleri. 10 Kasım 2016.
- URL-3, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/4399.html Poksvirüs replikasyon döngüsü. 10 Kasım 2016.
- van Oers, M. M., 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system, Journal of Invertebrate Pathology, 107, 3–15
- Webb, B. ve Sali, A., 2014. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER, Current protocols in bioinformatics, 54, 5.6.1-5.6.37.
- Winter, J., Hall, R. L., Moyer ve 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.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. ve Chapman, M. S., 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99,16, 10405–10410.
- Yang, Z., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F. ve Moss, B., 2012. Pervasive initiation and 3'-end formation of poxvirus postreplicative RNAs, Journal of

Biological Chemistry, 287,37, 31050–31060.

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, Journal of virology, 85,19, 9899–9908.



ÖZGEÇMİŞ

Tez çalışmasını hazırlayan ve sunan Cihan İNAN 1986 yılında Trabzon’da doğdu. İlk ve orta öğretimini doğduğu şehirde tamamladıktan sonra 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü Biyoloji Öğretmenliği programını kazandı. Lisans eğitimini 2010 yılında tezsiz yüksek lisans mezunu olarak tamamladıktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilimdalında yüksek lisansa başladı. 2012 yılında yüksek lisans programını bitirdikten sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilimdalında doktora programına başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.