KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CHILO IRIDESCENT VIRUS (CIV) 118 L GENİNİN BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ VE ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevde Seher DABAĞ

HAZİRAN 2022
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CHILO IRIDESCENT VIRUS (CIV) 118 L GENİNİN BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ VE ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ

Sevde Seher DABAĞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05/05/2022
Tezin Savunma Tarihi : 10/06/2022

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Trabzon 2022

ÖNSÖZ

"*Chilo iridescent virus* (CIV) *118 L* geninin bakülovirüs vektör sisteminde ifadesi ve antikor geliştirilmesi" adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır. Bu tezde, CIV'ye ait yapısal bir protein kodlayan *118L* geninin fonksiyonunun aydınlatılmasına yardımcı olabilecek 118L proteinin bakülovirüs vektör sisteminde üretilmesi, bu proteine karşı antikor üretilmesi çalışmaları yapılmıştır.

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

Tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan sayın Prof.Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na ve sayın Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU'na, mikrobiyoloji laboratuvar çalışma grubu arkadaşlarımdan Dr. Aydın YEŞİLYURT'a ve Arş. Gör. Funda BİLGİLİ TETİKOĞLU'na ve tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkânlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsüne ve Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a tez çalışmama sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmaları TÜBİTAK tarafından desteklenen 119Z209 numaralı proje (Chilo iridescent Virüs'e Ait 118L Geninin Virüsün Replikasyonu ve Hücreye Giriş-Füzyonundaki Rolünün Aydınlatılması) katkısıyla gerçeklenmiştir. Katkılarından dolayı TÜBİTAK'a şükranlarımı arz ederim.

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

Tezimin hazırlanması aşamasında her zaman maddi ve manevi desteği ile yanımda olan sevgili eşim Orhan DABAĞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sevde Seher DABAĞ
Trabzon, 2022

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Chilo Iridescent Virus (CIV) *118 L* Geninin Bakülovirüs Vektör Sistemine İfadesi ve Antikor Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof.Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı ve verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz ola rak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 10/06/2022

Sevde Seher DABAĞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ IV
İÇİNDEKİLER V
ÖZET VII
SUMMARY VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ IX
TABLOLAR DİZİNİ X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ XI
1. GENEL BİLGİLER 1
1.1. Giriş 1
1.2. İridovirüsler 2
1.2.1. Iridoviridlerin Morfolojisi 7
1.2.2. Iridoviridlerde Genom Yapısı ve Replikasyon 8
1.3. *Chilo Iridescent Virüs* (CIV) 9
1.4. Protein Üretim Sistemleri 11
1.5. Bakülovirüs Gen Ekspresyon Vektör Sistemi 13
1.6. Çalışmanın Amacı 14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 15
2.1. Virüs Üretimi 15
2.2. Viral DNA Saflaştırılması 15
2.3. *118L* Geninin Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması 16
2.3.1. Primer Dizaynı ve *118L* Geninin Virüs Genomundan Çoğaltılması 16
2.3.2. 118L Geninin pGEM- T Easy Ara Vektörüne Klonlanması 16
2.3.2.1. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması 17
2.3.2.2. Transformasyon 17
2.3.2.3. Rekombinant Seçimi ve Plazmit İzolasyonu 18
2.3.2.4. Transformasyonun Restriksiyon Analiziyle Doğrulanması 19
2.4. 118L Geninin pFastBacHT A Transfer Vektörüne Klonlanması 19
2.4.1. Plazmid İzolasyonu 19
2.4.2. Transfer Vektörünün Oluşturulması 20
2.4.2.1. Klonlama Fragmentlerinin Oluşturulması 20

2.4.2.2. Fragmentlerin Agaroz Jelden Temizlenmesi 21
2.4.2.3. *118L* Geni ile İfade Vektörü pFastBacHT A'nın Ligasyonu 22
2.5. *118L* Geninin Bac-to-Bac Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması 22
2.5.1. Transfer Vektörünün *Escherichia coli* DH10Bac Hücrelerine Transformasyonu 22
2.5.2. Rekombinant Bakmid'lerin Seçimi 23
2.6. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu, Gen İfadesi ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması 24
2.6.1. Rekombinant Protein Üretilmesi 25
2.6.1.1. Rekombinant Protein Saflaştırılması 25
2.6.1.2. Rekombinant Proteinin Western Blot Analizi 26
2.6.1.3. Diyaliz Yöntemiyle 118L Proteininin Temizlenmesi 27
2.7. Rekombinant Proteine Karşı Poliklonal Antikor Üretimi 28
2.7.1. Fare İnokülasyonları 28
2.7.2. Serumların ELISA ile Titrasyonu 29
2.7.3. Saflaştırılan 118L Proteini ile Geliştirilen Antikorun Test Edilmesi 29
3. BULGULAR 30
3.1. *118L* Geninin Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması 30
3.1.1. *118L* Dizisinin Klonlama Vektörüne (pGEM-T Easy) Klonlanması ve Transformasyonu 30
3.1.2. *118L* Gen Dizisinin İfade Vektörüne (pFastBacHT A) Klonlanması ve Transformasyonu 34
3.2. *118L* Geninin Bac-to-Bac Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması 35
3.3. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Gen İfadesi 36
3.3.1. Rekombinant 118L Proteinin Saflaştırılması ve Western Blot Analizi 36
3.4. Rekombinant Proteine Karşı Poliklonal Antikor Üretimi 37
4. TARTIŞMA 40
5. SONUÇLAR 45
6. ÖNERİLER 46
7. KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VIRUS (CIV) *118 L* GENİNİN BAKÜLOVİRÜS VEKTÖR SİSTEMİNDE İFADESİ VE ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ

Sevde Seher DABAĞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimlerİ Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2022, 51 Sayfa

Chilo iridescent virus (CIV), *Iridoviridae* familyasına ait bir böcek virüsüdür. CIV, tarımda önemli zararlara neden olan çeşitli otçul böceklerde enfeksiyon oluşturduğu için ekolojik ve ekonomik öneme sahiptir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar sonucunda, CIV yapısında 54 farklı protein olduğu tespit edilmiştir. Bu yapısal proteinlerden biri virüs replikasyon döngüsü için hayati öneme sahip olabilecek potansiyel zarf proteini olan 118L açık okuma zinciri tarafından kodlanmaktadır. 118L, tüm iridoviridlerde homologları olan bir gendir. Ancak CIV'de bu gen tarafından kodlanan proteinin fonksiyonu bilinmemektedir. 118L geninin fonksiyonun aydınlatılması için genin ifadesinin gerçekleştirilmesi ve hedef proteine karşı antikor geliştirilmesi önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Bu tezde, polimeraz zincir reaksiyonu ile 118L geni virüs genomundan çoğaltıldıktan sonra gen ifade sistemlerinden biri olan bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde genin ifadesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, saflaştırılan rekombinant protein kullanılarak antikor geliştirilmiştir. Sonuç olarak virüs yapı ve replikasyonunda 118L proteinin fonksiyonunun aydınlatılmasında kullanılabilecek 118L proteini ve bu proteine karşı kullanılabilecek antikor başarıyla elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Iridovirus*, Chilo iridescent virus* (CIV), 118L açık okuma çerçevesi (ORF), Bakülovirüs vektör sistemi

Master Thesis

SUMMARY

EXPRESSION OF CHILO IRIDESCENT VIRUS (CIV) GENE OF *188 L* IN BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM AND DEVELOPMENT OF ANTIBODY

Sevde Seher DABAĞ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2022, 51 Pages

Chilo iridescent virus (CIV) is an insect virus belonging to the Iridoviridae family. CIV is of ecological and economic importance as it infects various herbivorous insects that cause significant damage in agriculture. As a result of the studies carried out so far, it has been determined that there are 54 different proteins in the CIV structure. One of these structural proteins is encoded by the 118L open reading frame (ORF), a potential envelope protein that could be vital to the virus replication cycle. 118L is a gene with homologs in all iridovirides. However, the function of the protein encoded by this gene in CIV is unknown. In order to elucidate the function of the 118L gene, the expression of the gene and the development of antibodies against the target protein constitute an important step. In this thesis, after the 118L gene was amplified from the virus genome by polymerase chain reaction, its gene was expressed in the baculovirus expression vector system, which is one of the gene expression systems. In addition, antibody development was achieved using the purified recombinant protein. As a result, the 118L protein that can be used to elucidate the function of the 118L protein in virus structure and replication and the antibody that can be used against this protein have been successfully obtained.

Key Words: Iridovirus, *Chilo iridescent virus* (CIV), 118L open reading frame (ORF), Baculovirus vector system

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Böcek larvalarında CIV patent enfeksiyonu 4

Şekil 2. İridoviridlerin birleştirilmiş 26 kor genin aminoasit dizilimine göre filogenetik analizi. 6

Şekil 3. Iridoviridlerde virion yapısının şematik görünümü 7

Şekil 4. Frog virus 3 (FV 3)' ün hayat döngüsü 9

Şekil 5. pFastBacHT A gen ifade vektörü 12

Şekil 6. PCR yöntemi ile *118L* gen fragmanının çoğaltılması 30

Şekil 7. *118L* genini içeren pGEM-T Easy vektörüyle *E.coli*'nin transformasyonu 31

Şekil 8. *118L* genini içeren pGEM-T-118L klonunun doğrulanması 32

Şekil 9. pGEM-T Easy-118L klonunun *Hind*III restriksiyon enzimiyle kesimi 33

Şekil 10. pGEM-T Easy-118L klonunun *Hind*III restriksiyon enzimiyle kesimi işleminden sonra *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesim 33

Şekil 11. pFastBacHT A ifade vektörünün *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesimi 34

Şekil 12. pFastBacHT A vektörüne *118L* geninin klonlanması sonrası restriksiyon analizinin %1'lik agaroz jel ile görüntülenmesi 35

Şekil 13. *118L* gen bölgesini içeren rekombinant bakmid DNA'sının doğrulanması 36

Şekil 14. Bakülovirüs vektör sisteminde üretilen 118L proteininin Western Blot Analizi 37

Şekil 15. Serum L antikoru ile 118L proteinin proteinin western blot analizi 38

Şekil 16. Serum R antikoru ile 118L proteininin western blot analizi 38

Şekil 17. Asitez sıvısı left antikoru ile 118L proteininin western blot analizi 38

Şekil 18. Asitez sıvısı right antikoru proteininin western blot analizi 38

Şekil 19. Balb/c antikoru ile 118L proteininin western blot analizi 39

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. İridoviridlerin özelliklerinin karşılaştırılması 4

Tablo 2. Virüs gen ekpresyon sistemlerinin karşılaştırılması..... 12

Tablo 3. *Eco*RI ve *Hind*III Restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu..... 19

Tablo 4. A: *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle pGEMT-118Lkesim reaksiyonu. B: *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle pFastBacHTA'nın kesim reaksiyonu 21

Tablo 5. CIV DNA'sı (118L) ve pFastBacHT A vektörünün ligasyon reaksiyonu 22

Tablo 6. Rekombinant bakmidlerin doğrulanması için hazırlanan reaksiyon 24

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

Amp+	: Ampisilin İçeren
AMV063	: AMEV'nin 63. ORF'sinin Protein Ürünü
AT	: Adenin ve Timin Nükleotidleri
bp	: Baz Çifti (Base Pair)
CIV	: *Chilo* Iridescent Virus
$CaCl_2$	: Kalsiyum Klorür
SF900	: *Spodoptera frugiperda'* dan Türetilen Böcek Hücre Kültürü
ddH_2O	: İki Kere Saflaştırılmış Su
dH_2O	: Saf su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
*DNaz*I	: DeoksiribonükleazI
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
dUTP	: Deoksiüridin Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPDA	: Son Nokta Seyreltme Deneyi (End Point Dilution Assay)
EPV	: Entomopoksvirüs
EtBr	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetüs Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
HCl	: Hidroklorik Asit
ICTV	: Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IIV-6	: Insect iridescent virus-6
IPTG	: İzopiropil Beta-D-tiyogalaktosid
kb	: Kilo Baz Çifti (Kilo Base Pair)
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
M	: Molar
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
mM	: Milimolar
MOI	: Hücre Başına Düşen Enfeksiyon Ünitesi (Multiplicity of Infection)
mRNA	: Mesajcı RNA
NaOH	: Sodyum Hidroksit

ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu (Phosphate Saline Buffer)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pfu	: Plak Oluşturan Ünite (Plaque Forming Unit)
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki Dönme Sayısı (Round Per Minute)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS İçeren Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TENS	: Tris-HCl, EDTA, NaOH ve SDS İçeren Tampon
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Kırık Uç Etiketleme
U	: Ünite
xg	: Dünyanın Yerçekimi İvmesi
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid
λ_{max}	: Maksimum Işıma Yapan Dalga Boyu
°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Virüsler tarih boyunca son derece tehlikeli hastalıklara neden olmuştur. Grip, çocuk felci, hepatit, kuduz, sarı humma, ensefalit, AIDS, Ebola ve Corona bu hastalıklara örnektir. Virüsler sadece insanları değil, hayvanları, bitkileri ve mikroorganizmaları da enfekte ederler. Öte yandan, virüsler gen ifade ve gen terapi vektörü ve biyolojik mücadele materyali olarak kullanılma potansiyeline de sahiptirler. Bazı virüsler birçok zararlı böceği enfekte ederek kontrol altına alınmalarına imkan sağlarlar (Ibarra and Del Rincon-Castru, 2008).

Zararlı böcekler tarım ve ormanlarda önemli zararlara sebep olurlar. İnsanoğlu uzun yıllardır bu zararlı böceklerle mücadele etmektedir. Tarımsal zararlılarla mücadelede genellikle böceklere karşı kimyasallar kullanılmıştır. Bu zararlılara karşı kimyasal kullanımı birçok kötü etkileri de beraberinde getirmiştir. 1950 yılları içerisinde, kimyasal insektisit kullanımı artmıştır. Bu nedenle zararlı böcek popülasyonları bu insektisitlere karşı dirençli hale gelmiştir. Ayrıca, kimyasal insektisitlerin seçici bir özelliğinin olmadığı da fark edilmiştir. Sonuçta zararlı olan bu insektisitler, hedeflenen zararlı böceklerin yanı sıra, doğadaki diğer yararlı böceklerinde ölümüne neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, kullanılan bu kimyasalların fazlası toprakta biriktikten sonra bitkiler tarafından alınırlar ve bitkiler aracılığıyla insanlara kadar ulaşır. Kullanılan bu kimyasal maddeler, uzun zaman sonra insan bünyesinde ortaya çıkabilecek tehlikeli hastalıklara sebep olabilirler. Bahsedilen bu zararlarından dolayı zararlı böceklerin kontrolünde kimyasal insektisitlerin yerine kullanılabilecek farklı yöntemler araştırılmaya başlanmıştır.

Bu yöntemlerden çevre dostu biyolojik kontrol materyallerinin geliştirilmesi olmuştur. Biyolojik mücadelede kullanılan materyaller böcek patojeni mikroorganizmaları (virüs, bakteri, protozoa, fungus) ve onlardan elde edilmiş olan bazı insektisidal ürünleride kapsamaktadır. Biyolojik mücadelede virüsler, zararlı böcekleri enfekte etmede kullanılabilecek ideal potansiyel materyaller olarak karşımıza çıkarlar.

Bu virüslerin başlıcaları bakülovirüsler, iridovirüsler, entomopoksvirüslerdir. Bu viral etmenlerin sahip olduğu avantajları vardır. Hedef böcek türü için doğada ayrıştırılabilmeleri, oldukça spesifik olmaları ve kendilerine karşı direnç gelişimininde

oldukça yavaş olması bakımındanda avantajlıdırlar. Ancak, kimyasal pestisitlere göre biraz daha pahalı olmaları, dar konak spektrumuna sahip olmaları ve konaklarını öldürme sürelerinin uzun olması olumsuz yanları olarak durmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi bu olumsuz özelliklerin üstesinden gelebilmek için pek çok imkan sağlamaktadır. Bu sayede çok yönlü ve endüstriyel üretim kapasitesi dikkate alındığı zaman bu alanın gelecek vadeden bir araştırma alanı olduğu ön görülmektedir.

Bu tez çalışmasında *Iridovirus* cinsine ait önemli bir böcek virüsü olan *Chilo iridescent virus* (CIV)'ün (resmi olarak *Invertebrate insect virus-6* (IIV-6) adı verilen) biyoteknolojik kullanım potansiyellerini arttırmak için virüs yapı ve replikasyonunda önemli rolü olduğu düşünülen 118L proteinin üretilmesi ve bu proteine karşı antikor geliştirilmesine yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

1.2. İridovirüsler

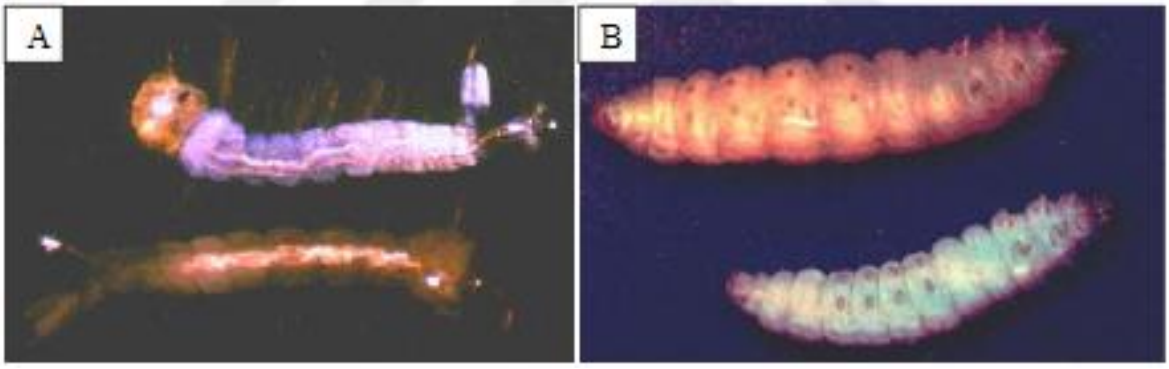
İngiltere, Cambridge Üniversitesi üyeleri olan Claude Rivers ve Nick Xeros'un çalışmaları sonucunda *Iridoviridae* familyasının ilk üyesi 1954 yılında Mart ayında bulunmuştur. Daha sonra *Tipula paludosa* (çayır sineği) böceğinden izole edilmiştir (Williams, 1996). 1971 yılında ise "*Tipula iridescent virüs"* adı verilmiştir. 1999 tarihinden beri bu virüs, *Invertebrate iridescent virus 1* (IIV1) olarak bilinmektedir. Böceklerde, virüs enfeksiyonu mavi-yeşil renk oluşturmaktadır. Bu nedenle bu virüsün adlandırılmasında İngilizce kelime olan "iridescent" gökkuşağı anlamındaki kelime kullanılmıştır (Şekil 1). O tarihlerde iridovirüslerin keşfi insanlık için merak uyandırmıştır. Daha sonra ise çeşitli böcek türlerinde iridovirüs enfeksiyonları tespit edildi ve tespit edilen bazı böcekler arasındada önemli bazı zararlılar bulunmuştur. Bu sayede bu virüslerin, potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilecekleri düşünülmüştür. İridovirüslerin büyük bir kısmının böcek larvalarında fazla miktarda üretilebilmeleri ve aynı zamanda pek çok izolatında hücre kültüründe uygulanabilmesi ve laboratuvar çalışmaları bakımından da birçok avantaja sahiptirler.

Iridoviridae familyası üyeleri iridovirüs ismiyle bilinmektedirler. Bu familya da omurgalıları ve omurgasızları enfekte eden cinsleri bulunmaktadır. Iridoviridae ailesinin üyeleri, *Alphairidovirinae* ve *Betairidovirinae* iki alt ailede sınıflandırılan büyük ikosahedral, çift sarmallı DNA (dsDNA) içeren virüslerdir ve her bir alt familyadaki virüslerin virion partikül boyutu, enfekte ettikleri konak genişliği ve genomlarının

DNA'larının metillenme durumu, majör kapsit proteinlerin amino asit dizilerinin benzerliği ve son olarak GC içeriğide göz önüne alınarak yapılmıştır (Chinchar vd., 2017). *Alphairidovirinae* üyeleri esas olarak kemikli balıklar, sürüngenler ve amfibiler gibi ektotermik omurgalıları enfekte eden üç cinsten (*Ranavirus, Megalocytivirus* ve *Lymphocystivirus*) oluşurken, *Betairidovirinae* üyeleri başlıca böcekler ile kabuklular başta olmak üzere omurgasızları enfekte eden üç cins (*Iridovirus, Chloriridovirus* ve *Decapodiridovirus*) içerir.

İridovirüsler, ICTV tarafından kabul edilmiş iki tür (*Invertebrate iridescent virus 6, Invertebrate iridescent virus 31*) ve henüz kabul edilmemiş 12 tür içermektedir (Williams, ve Ward, 2010; Pie´gu vd., 2013). Tanımlandıkları sıraya göre belirlenen *Invertebrate iridescent virus*'lere aynı zamanda izole edildikleri konakçıya göre isimler de verilmektedir. Bunlardan IIV6 veya *Chilo iridescent virüs* (CIV) olarak isimlendirilmektedir.

Bu virüslerin ağız yolu ile enfeksiyonu oldukça yavaştır. İlk olarak böcek vücudunda yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmasında çoğalırlar. Salgın enfeksiyonlara neden olmazlar. Enfekte ettikleri konak böceğin kuru ağırlığının %25'ini teşkil edecek kadar çok miktarda çoğalabilirler. Bu virüsler larvaları erken gelişim evrelerinde enfekte ederlerse larvalardaki hastalık öldürücü olabilir. Böyle gerçekleşen enfeksiyonlar ise açık enfeksiyon olarak bilinirler. Larvaların vücut rengi mavi-yeşil tonlarında renk alır (Şekil 1). Fakat daha az etkili olan enfeksiyonlarda krem renginde olan larva vücudu beyazımsı açık bir renk alır. Böyle enfeksiyonlara ise gizli enfeksiyon denir ve ölümcül değildirler. Bu şekilde gerçekleşen enfeksiyonlarda ise böcekler sağlıklı görünebilirler ve ergin dönemlerine kadar gelişim gösterebilirler. Biyolojik kontrol ajanı olarak zararlı böceklere karşı mücadelede az verime sahip oldukları düşünüldüğü için bu virüslere olan ilgi azalmıştır. Fakat iridovirüs hastalığının potansiyel etkisinin farkındalığı, böcek popülasyonlarının canlılıkları üzerine öldürücü seviyenin altında olması nedeniyle günden güne artmaktadır (Williams, 2008). *Iridovirus'* ler birçok böcek hücresinde ve hatta sürüngen hücrelerinde *in vitro* olarak çoğalabilirler. Bu virüslerin büyük bir kısmı böceklere enjekte edildiği zaman, ağız yolu ile uygulanmasına kıyasla daha fazla konak aralığına sahiptirler (Williams, 2008).



Şekil 1. Böcek larvalarında CIV patent enfeksiyonu. A: Sağlıklı (altta) ve CIV ile enfekte (yukarıda) *Aedes aegypti* larvaları B: Sağlıklı (yukarıda) ve CIV ile enfekte (aşağıda) *Galleria mellonella* larvaları. Larvalar, ağır iridovirüs enfeksiyonu nedeniyle mavileşirler (URL1).

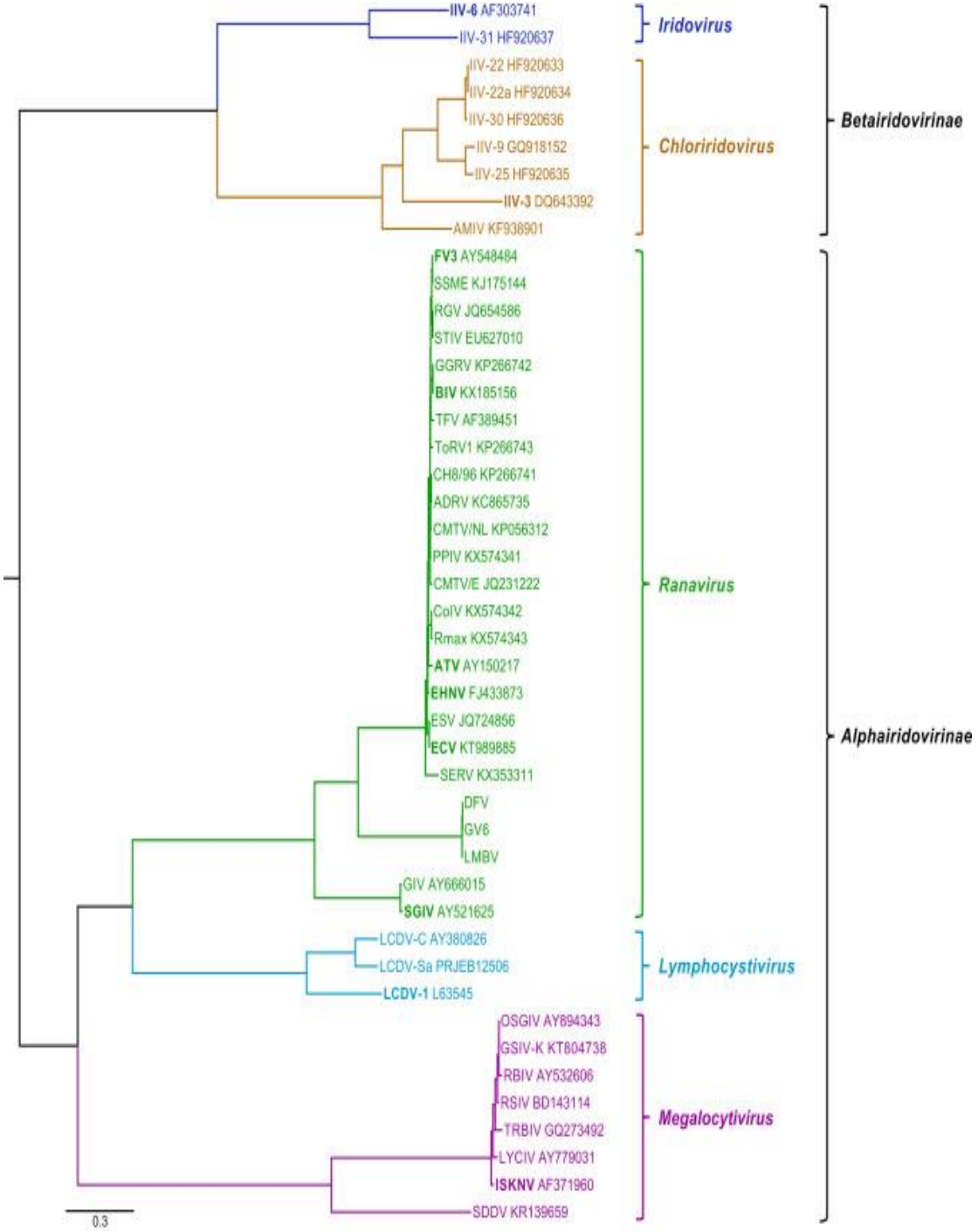
Son zamanlarda, İridovirüs cinsinin üyeleri ile aynı adı taşıyan aile üyeleri arasında karışıklığı önlemek için, iridovirüsler yerine aile üyeleri için ortak bir isim olarak "İridoviridler" terimi kullanılmaktadır. İridoviridler başlangıçta viryon partikül boyutlarına, konakçı spektrumuna, DNA metiltransferazı kodlayan genin varlığına, amino asit dizisine ve ana kapsid proteininin GC içeriğine dayalı olarak birbirinden ayrılmaktadır (Tablo 1) (Chinchar vd, 2005; King vd, 2011).

Tablo 1. İridoviridlerin özelliklerinin karşılaştırılması (Chinchar vd., 2005; King vd, 2011)

Alt Sınıf	**Cins**	**Virion Boyutu**	**Konak**	**GC İçeriği**	**DNA Metilasyon**
Betairidovirinae	*Iridovirüs*	120-130 nm	Eklem bacaklılar özellikle böcekler	29-32%	yok
Betairidovirinae	*Chloriridovirüs*	180 nm	Suda yaşayan larva evreleri olan diptera, çoğunlukla sivrisinekler	48%	yok
Betairidovirinae	*Decapodiridovirus*	158 nm	Karides, ıstakoz	35%	yok
Alfairidovirinae	*Ranavirus*	150 nm	Sürüngen, amfibi	54%	mevcut
Alfairidovirinae	*Lymphocystivirus*	198-227 nm	Pisi balığı	29.1-33%	mevcut
Alfairidovirinae	*Megalocytivirus*	140-200 nm	Deniz balığı	54.8%	Mevcut

İridoviridler arasında korunmuş (kor) genler vardır. Maksimum olabilirliğe dayalı filogenetik analiz, genom dizi analizi yapılan 45 iridoviridin hepsinde bulunan 26 kor genin birleşik dizisi üzerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Analiz sonuçlarına göre

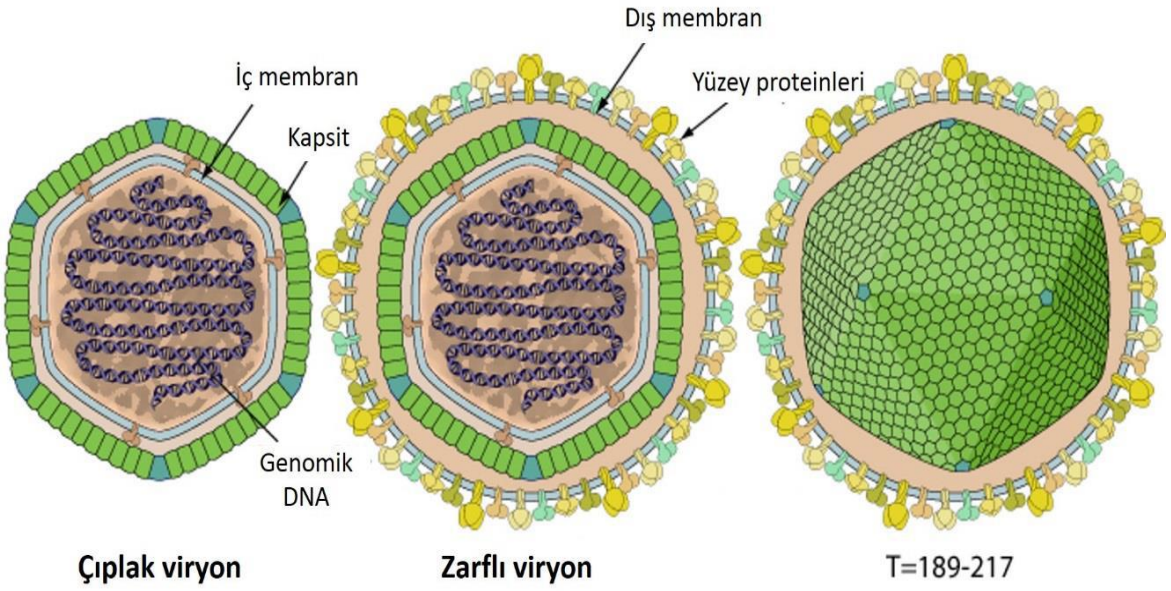
Lymphocystivirus, Ranavirus ve *Megalocytivirus* cinslerinin üyeleri birlikte bir grup oluştururken, *Iridovirus, Chloriridovirus* ve *Decapodiridovirus* cinslerinin üyeleri de ayrı bir grup oluşturmuştur. Omurgalıları (sürüngenler, balıklar ve amfibiler) enfekte eden *Lymphocystivirus, Ranavirus* ve *Megalocytivirus* cinslerinin üyeleri *Alfairidovirinae* alt familyasına, omurgasızları (böcekler, kabuklular vb.) enfekte eden *Iridovirus, Chloriridovirus* ve *Decapodiridovirus* cinslerinin üyeleri *Betairidovirinae* alt familyasına dâhildir.



Şekil 2. İridoviridlerin birleştirilmiş 26 kor genin aminoasit dizilimine göre filogenetik analizi. Alphairidovirinae (Lymphocystivirus, açık mavi; Megalocytivirus, mor; Ranavirus, yeşil) ve Betairidovirinae (Chloriridovirus, kahverengi; Iridovirus, lacivert) içindeki cins ayrımını göstermektedir (Chinchar ve diğerleri, 2017; Chinchar ve Waltzek, 2017).

1.2.1. Iridoviridlerin Morfolojisi

İridoviridlerde kapsit ikosahedral yapıya sahiptir. En dış kısımda protein yapıda bir kapsit tabakası bulunur. Orta kısımda lipit bir membran ve en iç kısımda ise protein ve DNA'ların etkileşim halinde bulunduğu öz (kor) bölgesi ile toplamda üç tabakadan oluşurlar (Şekil 3) (Williams, 1998; Yan vd., 2000; Yan vd., 2009). Viral kapsidler normalde 120-200 nm çapındadır, ancak 350 nm çapa ulaşanlar da olabilir (örn. *Lymphocystivirus* cinsi) (Chinchar vd., 2017). Virion çekirdeği, 12.5 kDa'lık bir ana bileşen ve maksimum 81 kDa boyutunda en az 5 ek polipeptit içerir (Cerutti ve Devauchelle, 1985). Frog virüsü 3 (FV-3) ile yapılan dondurup-kırma çalışmaları, DNA protein kompleksinin uzun bir sarmal filamentte 10 nm genişliğinde çubuklar olarak düzenlenebileceğini göstermiştir (Tripier-Darcy ve Nermut, 1983).



Şekil 3. Iridoviridlerde virion yapısının şematik görünümü. Bir iridovirid parçacığının enine kesitinin şematik gösterimi (URL2).

Chloriridovirus ve *Lymphocystivirus* cinsinin üyelerinde kapsidin dış yüzeyi elastik fibrillerle kaplıdır. Bu fibrillerin genellikle oldukça kısa olduğu ve terminal düğümlere sahip olabileceği geleneksel elektron mikroskobu (EM) çalışmaları ile gösterilmiştir. Bununla birlikte, CIV üzerinde EM çalışmaları, her trimerik kapsomerin 2 nm genişliğinde ve merkezden dışarı doğru uzanan yaklaşık 35 nm uzunluğunda tek bir fibrile sahip

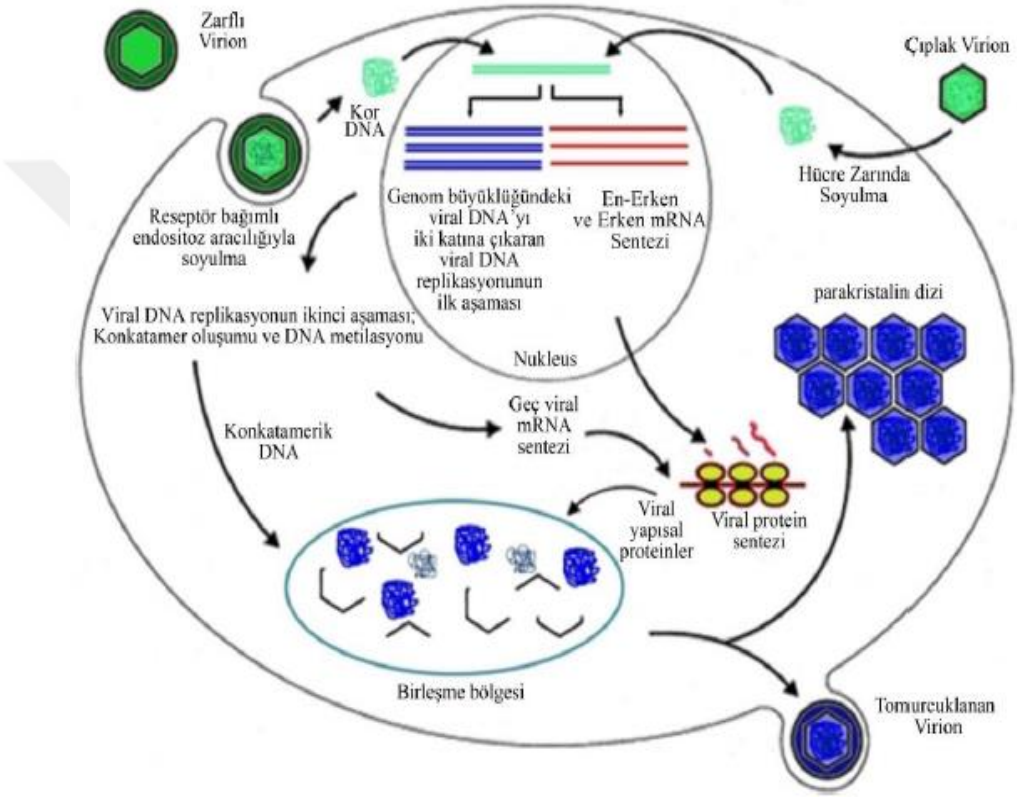
olduğunu göstermektedir. Ranavirüslerde ve Megalocytivirüslerde hiçbir fibril rapor edilmemiştir. Fibrillerin rolü bilinmemektedir (Chinchar vd, 2017).

1.2.2. Iridoviridlerde Genom Yapısı ve Replikasyon

Omurgasız iridoviridlerin (IIV) genomu, lineer çift sarmallı bir DNA molekülüdür. Ancak bu genomlar restriksiyon endonükleaz analizi ile haritalandığında dairesel permütasyonlar gösterdikleri belirlendi. Konkatamer özellikli DNA'yı paketlemek için hacim kapasiteli paketleme sistemi kullanır. İridovirid genomlarının dairesel permütasyon ve terminal özellikleri ilk olarak FV-3 için önerilmiştir (Goorha ve Murti, 1982). Daha sonra, IIV-6 (CIV), IIV-9 ve IIV-16'nın genom analizi ile doğrulanmıştır (Delius vd, 1984; McMillan vd, 1990; Ward ve Kalmakoff, 1987; Webby ve Kalmakoff, 1999). IIV-3 ve IIV-6 genomları, sırasıyla %48 ve %29 gibi oldukça farklı GC içeriğine sahiptir. IIV genomları, dizilerindeki çeşitlilik ve eşdoğrusallık eksikliği nedeniyle %10' dan daha az homoloji gösterir (Webby ve Kalmakoff, 1999). IIV-3 ve IIV-16 genomları sırasıyla %20 ve %39 tekrarlayan DNA dizileri içerir (Delhon ve diğerleri, 2006; McMillan, 1990). IIV-6' da tekrarlayan bölgelerin karakterizasyonu, bu yapıların serpiştirilmiş tekrarlardan ve örtüşen bölgelerden oluşan karmaşık bir tekrar yapısı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fischer ve diğerleri, 1988). Omurgalı iridoviridlerinin genomlarının ayırt edici özelliklerinden biri, viral olarak kodlanmış bir metiltransferaz ile (Song ve diğerleri, 2004) genomlarındaki sitozinlerin yaklaşık %20'sinin metillenmiş olmalarıdır (Willis ve Granoff, 1980). Buna karşılık, omurgasız iridoviridlerin genomları metillenmez, CpG %5 'inden azı metillenir. İridoviridlerin gen transkriptlerinde intron olduğuna dair bir kanıt yoktur ve viral mRNA' larda poli (A) kuyrukları yoktur (Eaton vd, 2007; Ince vd, 2013; Song vd, 2004; Tsai vd, 2007). Bununla birlikte, biyokimyasal ve *in siliko* çalışmalar, viral gen ifadesini düzenleyebilen viral mikroRNA'ların (miRNA' lar) varlığını göstermektedir (Bronkhorst vd, 2012). Frog virüs 3 (FV-3) model organizmadır ve iridoviral genom replikasyonunu ve transkripsiyonunu açıklamak için kullanılır (Granoff, 1984).

İridoviridlerin replikasyonu iki aşamalıdır. İlk aşama çekirdekte, ikinci aşama sitoplazmada gerçekleşir. Virüs, hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak ve klatrin aracılı endositoz veya makropinositoz yoluyla konakçı hücre tarafından alınır (Wang ve ark., 2014). Konak hücreye girdikten sonra viryonlar çekirdeğe doğru hareket eder. En erken ve gecikmiş erken transkriptler, virion DNA' sından sentezlenir (Barray ve Devauchelle,

1987; D'Costa, 2004). Geç genlerin ifadesi ve DNA replikasyonu için çok önemli olan proteinler bu transkriptlerden kodlanır (Barray ve Devauchelle, 1985). Daha sonra, yeni sentezlenen viral DNA, çekirdekten sitoplazmaya aktarılır ve viral DNA replikasyonunun ikinci aşaması gerçekleşir. Burada DNA konkatemerleri oluşur (Goorha, 1982). Yeni sentezlenen viryonlar sitoplazmada parakristal diziler oluşturabilir ve lizis veya tomurcuklanma yoluyla hücreden salınabilir (Şekil 4).



Şekil 4. Frog virus 3 (FV 3)' ün hayat döngüsü (Chinchar vd., 2011)

1.3. *Chilo Iridescent Virüs* (CIV)

Chilo iridescent virus (CIV) veya *Insect iridescent virus* 6 (IIV-6), *Iridoviridae* ailesine ait *Iridovirüs* cinsinin bir tip türüdür. İlk izolasyon Japonyada (Fukaya ve Nasu, 1966) pirinç kök kurdu (*Chilo supressalis-Lepidoptera; Pyralidae*) larvalarından yapılmıştır (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; Fukuda, 1971; McLaughlin vd., 1972). Virüs, adını, böceklerde yapmış olduğu enfeksiyonun mavi-yeşil renk oluşturmasından dolayı gökkuşağı anlamında olan "iridescent" kelimesinden alır. CIV, çeşitli böcek larvaları için

oldukça patojeniktir ve bu muhtemel bir biyolojik insektisit olarak kullanım potansiyeli oluşturur. Virüs inşası, enfekte olmuş hücrenin sitoplazmasında meydana gelir. Böceklerde, özellikle pupa veya larva evrelerinde belirgin (patent) ölümcül veya ölümcül olmayan (gizli) enfeksiyonlara neden olabilir. Ölümcül olmayan enfeksiyonlarda böcekler sağlıklı görünebilir, gelişebilir ve yetişkin evresine kadar çoğalabilir. Böcek iridovirüsleri, nemli veya su habitatlarında özellikle sivrisinekler ve toprağa bağlı *Lepidoptera* ve *Coleoptera* takımlarına ait böcekler olmak üzere önemli tarımsal ve tıbbi hasara neden olan böcek türlerini enfekte eder (Williams vd, 2005). Ekolojik ve ekonomik olarak ziraat alanında zararlı olan bazı herbivor böcekleri enfekte ettiği için özel bir öneme sahiptir (Smith, 1976). Enfekte ettiği önemli zararlılar arasında *Colladonus montanus* (Homoptera; dağ kirazı kurdu), *Nephotettix cincticeps* (Homoptera; pirinç kurdu), *Anthonomus grandis* (Coleoptera; pamuk göz kurdu), *Bemisia tabaci* (Homoptera; pamuk beyaz sineği), *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera; kök kurdu), *Drosophila melanogaster* (Diptera; sirkesineği), *Trichoplusia ni* (Lepidoptera; lahana kurdu), *Galleria mellonella* (Lepidoptera; büyük balmumu güvesi) yer almaktadır. 1966 yılında CIV'nin keşfinden bu yana, viral genom yapısını ve farklı viral gen ürünlerinin amino asit dizilerini aydınlatmak için birçok girişimde bulunuldu.

CIV'nin kodlama kapasitesi ve stratejisinin aydınlatılması, viral enfeksiyon, replikasyon ve virüs-konak etkileşiminin altında yatan mekanizmaları anlamaya yönelik ilk adımdır. CIV genomunun kodlama kapasitesi, 2432 ile 40 amino asit arasında değişen polipeptitleri kodlayan 468 açık okuma çerçevesini (ORF) temsil eden 212.482 bç'den oluşan tam DNA nükleotit dizisinin analizi ile belirlendi (Jakob ve Darai., 2002).

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla virüs genomunda bulunan ORF'lerden 54 tanesinin yapısal protein kodladığı bilinmektedir (İnce vd., 2010). Ancak, bu proteinler arasında hangisinin virüsün hücreye tutunması ve girişinde rol oynadığı konusunda herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, 118L ORF'sinin homologları olan Frog virus 3 ORF53R muhtemel myristoylated membran proteini ve Singapore grouper iridovirus ORF088L zarf proteini ile gerçekleştirilen çalışmalarda, bu proteinlerin virüs girişi ve replikasyonu için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Whitley vd, 2010; Zhou vd, 2011). Bu bilgiler ışığında IIV-6 genomu tarafından kodlanan bu genlerin homoloğu olan 118L ORF'sininde kodladığı proteinin virüsün hücreye girişinde ve replikasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca laboratuvarımızda yürütülen bir başka çalışmada 118L proteinin virüse ait yapısal proteinler arasında 9 farklı protein ile etkileşime girdiği

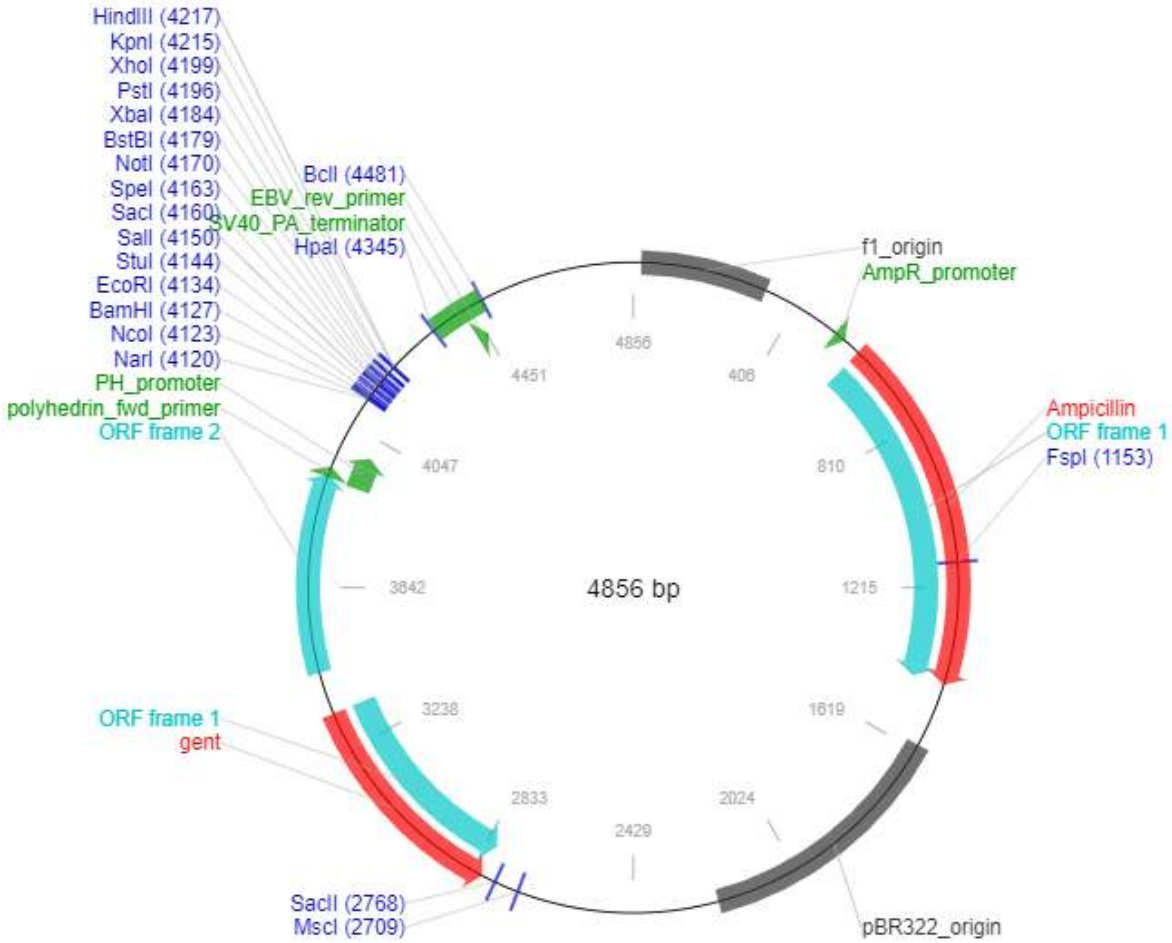
belirlenmiştir (Özşahin vd., 2018). 118L, viral füzyon işleminde gerekli olan transmembran (TM) domainine sahip bir zarf proteinidir (Braunwald vd, 1979). *118L* geninin bir zarf proteini olması, homologunun Iridoviridae familyasındaki diğer virüslerde bulunması, bahsedilen homologlarla yapılan çalışmalar *118L* geninin virüs için önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Böylece 118L tarafından kodlanan proteinin fonksiyonunun aydınlatılması virüsün hücreye girişinin aydınlatılmasına önemli katkı sunacaktır.

Protein fonksiyonlarının aydınlatılması amacı ile çeşitli protein üretim sistemleri kullanılmaktadır. Bu tezde kullanılcak olan protein üretim sistemlerinden biri olan Bakülovirus ekspresyon vektör sistemi yaygın olarak kullanılan önemli bir vektör sistemidir.

1.4. Protein Üretim Sistemleri

Bilimsel araştırma, sağlık, endüstri gibi alanlarda ihtiyaç duyulan proteinlerin üretilmesi için çeşitli gen ifade (ekspresyon) sistemleri geliştirilmiştir. Gen ifade sistemleri, yapısal biyolojiden *in vivo* çalışmalara kadar çeşitli yöntemlerde veya terapötik ajanlar olarak kullanılan proteinleri ifade etmek için kullanılır. Bir gen ifade sistemi, rekombinant proteinlerin üretimi için gerekli olan üç farklı bileşenden oluşur. Bunlar tüm işlemlerin gerçekleştirildiği canlı bir sistem olan hücre, hücreye hedef geni aktarmak için kullanılan vektör ve ihtiyaç duyulan proteini kodlayan hedef geni de içeren vektöre yerleştirilecek olan gen ifade kaseti Şekil 5'de gösterilmiştir.

Protein üretimi için çok çeşitli hücreler veya organizmalar kullanılmaktadır. Bu genel bakışta, en yaygın olarak kullanılan sistemler Tablo 2'de özellikleriyle gösterilmektedir. Bu sistemler arasından bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS) protein üretimi için çeşitli virüs gen ürünlerinin kullanılabilmesi, ökaryotik bir ortam olması, güçlü gen promotörlerinin olması (*polh* ve *p10*), insert büyüklüğü, aşırı üretim, olgunlaşmamış genlerin yüksek oranda ifade edilmesi (örneğin, cDNA'lar) ve güvenilir olması özelliklerinden dolayı en çok tercih edilmektedir (Demirbag vd., 1998).



Şekil 5. pFastBacHT A gen ifade vektörü (URL3).

Tablo 2. Virüs gen ekpresyon sistemlerinin karşılaştırılması

Karakteristik Özellikleri	*Adenovirüs*	*Retrovirus*	*Lentivirus*	*Adeno-associated virüs*	*Bakülovirüs*
Enfekte	Bölünen hücreleri enfekte eder.	Bölünen hücreleri enfekte eder.	Bölünmeyen hücreleri enfekte eder.	Bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte eder.	Bölünen hücreleri enfekte eder
Uygulama alanı	Gen terapi ve aşı	Gen terapi ve aşı	Gen vektörleri	Gen terapi	Gen terapi ve aşı üretimi
Boyut	7.5 kb	8 kb	8 kb	4-5 kb	>15kb
Aksiyon modu	konak genomuna entegre olmaz.		provirüs kalır ve hücre soyuna geçer.	konak genomuna entegre olur.	konak genomuna entegre olur.
Konak bağışıklığı	Güçlü	Orta	Orta	Hafif	Hafif

1.5. Bakülovirüs Gen Ekspresyon Vektör Sistemi

Endüstriyel, zirai, tıbbi açıdan oldukça önemli bazı bakteriyal, viral, hayvansal ve bitkisel proteinlerin, farklı özelliklerde olan ekspresyon vektörleri aracılığıyla sentezlenmeleri biyoteknolojide oldukça önem arz etmektedir. Son zamanlarda biyoteknolojide yeni bir çağ başlamıştır. Böcek virüslerinin DNA'larından önemli proteinlerin üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak yararlanılmaları bu çağı aydınlatmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında bakülovirüslerin replikasyonda zorunlu olmayan bazı viral genler vardır. Bu genlerin yerine besin, toksin, ilaç maddesi gibi farklı ve çeşitli ürünleri kodlayabilen yabancı genler klonlanır ve bu sayede çok fazla miktarda protein üretilir (Luckow ve Summers, 1988; Summers, 2006; Yin vd., 2007).

Yabancı genlerin ifadesi için geliştirilen bakülovirus ekspresyon vektör sistemi, (BEVS) diğer vektörlere göre önemli üstünlüklere sahiptir (Demirbağ, 1998). Bilim insanları tarafından bakülovirüslerin, virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması, daha kullanışlı ve etkili olan ekspresyon vektörü haline getirilmesi üzerine yapılan çalışmaları günümüzde devam ettirilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde biyoteknolojinin gelecekte önemli bir materyali olmalarına yardımcı olacaktır.

Bakulovirus ekspresyon vektör sisteminin en önemli özelliği sahip oldukları inklüzyon yapı matriks (polihedrin) proteinlerini kodlayan genlerden, p10 ve polihedral (*p10 ve polh*) gelmektedir. Bu proteinler, virüs replikasyon siklusunun en geç safhasında enfekte olan hücrelerde fazlaca üretilir. Doğada virüs partiküllerini koruyan inklüzyon yapıların oluşumunda polihedrin proteini görev yapar. Ayrıca virüs partiküllerinin inklüzyon yapı içerisine paketlenmesinde de polihedrin proteinine ihtiyaç duyulur. Polihedrine böceklerin ağız yolu ile enfeksiyonunda ihtiyaç duyulur. Fakat hücre kültüründe yapılan çalışmalarda virüs replikasyonu aşamasında ihtiyaç duyulmaz. Bu yüzden genleri kodlayan bu bölgeler çıkarılır. Çıkarılan yerlere arzu edilen yabancı genler eklenerek bakülovirüs ekspresyon vektör sistemleri geliştirilmektedir.

Smith ve arkadaşları (1983), Pennock ve arkadaşlarının (1984) bakülovirüslerin ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmasına yönelik yaptıkları ilk çalışmalar, *Autographa californica nükleopolihedrovirüs* (AcNPV) kullanılarak *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde β-galaktozidazı ve β-interferonu üretmeleri üzerine yapılan çalışmalar olmuştur. İlerleyen yıllarda ise bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi

kullanılarak farklı rekombinant proteinler fazla miktarda üretilmiştir. Bu proteinler ekonomik, tıbbi, ve endüstriyel öneme sahip bakteriyal, viral, bitkisel, fungal, hayvansal kaynaklı olabilmektedirler. Günümüzde özellikle tıbbi alanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda yaygın olarak kullanılan çeşitli birçok hastalıklara karşı yeni antijenler, kinazlar, büyüme faktörleri üretilmektedir (Vlak ve Keus 1990). Geliştirilmiş yeni ilaçlar sayesinde yeni tedavi yöntemleri de ortaya çıkarılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sayesinde insülin, immünoglobulinler, interlökin, interferon gibi proteinler de fazlaca üretilmiştir (Hasemonn ve Capra 1990). Bu sistem kullanılarak çeşitli birçok bitkisel proteinler sentezlenerek endüstriyel alanda büyük önem kazanmışlardır. Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi sayesinde bazı patojenik özelliğe sahip proteinler üretilerek, zararlı böceklere karşı zirai mücadele çalışmalarında kullanılmaktadır (Martens vd., 1990).

1.6. Çalışmanın Amacı

Chilo iridescent virus (CIV), üzerinde gerçekleştirilen proteomiks çalışmalar sonucunda, CIV'nin 54 adet yapısal proteine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapısal proteinlerden biri virüs replikasyon döngüsü için hayati bir öneme sahip olabilecek potansiyel zarf proteini olan 118L açık okuma zinciri tarafından kodlanmaktadır. Aynı zamanda, 118L proteini virüs yapısında bulunan başka 9 proteinle etkileşim içerisinde bulunmaktadır (Özşahin vd., 2018). Ayrıca, 118L ORF'sinin homologları olan Frog virus 3 ORF53R myristoylated membran proteini ve Singapore grouper iridovirus ORF088L zarf proteini ile gerçekleştirilen çalışmalarda, bu proteinlerin virüs girişi ve replikasyonu için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Whitley vd, 2010; Zhou vd, 2011). Böylece, 118L açık okuma zinciri tarafından kodlanan proteinin virüs replikasyonun başlangıç aşamasında önemli rol oynayan bir orkestra şefi olduğu anlaşılmaktadır. Bu görevlerinin aydınlatılmasına yönelik yapılması gereken çalışmalarda ana materyal olan 118L proteininin ve bu proteine karşı antikor üretilmesi büyük önem arz etmektedir.

Böylece bu tezde, CIV'ye ait yapısal bir protein kodlayan 118L geninin fonksiyonunun aydınlatılmasına yardımcı olabilecek 118L proteinin bakülovirüs vektör sisteminde üretilmesi, bu proteine karşı antikor üretilmesi amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Virüs Üretimi

Bu tez çalışmasında Iridovirüs cinsine ait olan *Chilo iridescent virüs* CIV), (Dr. C. Joel Funk-USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona'dan) kullanıldı. Virüsü çoğaltmak amacıyla konak olarak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları kullanıldı. Larvaların virüs ile enfeksiyonu, enjeksiyon kullanılarak gerçekleştirildi. Enfekte olan larvalar 3 hafta boyunca 27 °C'de bekletildi. Enfeksiyonun gerçekleştiği larvalar –80 °C'de muhafaza edildi.

2.2. Viral DNA Saflaştırılması

Virüsün saflaştırılması için Marina ve arkadaşlarının (1999) geliştirmiş oldukları metod uygulandı. Muhafaza edilmiş enfekte larvalardan 1 adet –80 °C'den alındı. 1 ml steril ddH_2O içerisinde homojen oluncaya kadar parçalandı. Homojen olan sıvı, sıralı bir şekilde 10 dakika 500xg, 960xg ve 1.250xg'de santrifüj yapılarak kaba partiküllerden, doku parçalarından temizlendi. Daha sonra 15.300xg'de santrifüj edildi ve çökelti haline getirildi. Çökelti haline gelen virüs 500 µl ddH_2O içerisinde çözüldü. Ardından % 30'luk sukroz çözeltisinin üzerine bırakılarak 30 dakika 15.300×g`de santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan çökeltiye 1 kez yıkama yapıldı ardından 1 ml dd$H_2O$ içerisinde çözüldü. Saflaştırılan virüs 0,22 µm`lik filtreden süzüldü ve steril tüplerde toplanarak 4°C'de muhafaza edildi. Virüsün konsantrasyonunun tayini spektrofotometrik olarak yapıldı ve 260 nm de 1 absorbans değeri 55 µg/ml olarak kabul edildi (D'Costa vd., 2001).

2.3. *118L* Geninin Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması

2.3.1. Primer Dizaynı ve *118L* Geninin Virüs Genomundan Çoğaltılması

Virüs genomundan 118L genini elde etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. Gen bankasından CIV'e ait *118L* gen bölgesinin nükleotid sırası alındı. PCR'da kullanılmak üzere genin başlangıç ve bitiş kısımlarına uygun olacak şekilde primerler tasarlandı. Primerlerin uç kısımlarına klonlama işlemlerinde kullanmak amacıyla restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri (*Eco*RI, *Hind*III) eklendi.

118 L geninin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri;

118L Fw 5'- GA**GAATTC** CAATGGACTGTGAGAGAAATATCT-3'
118L Rw 5'- **AAGCTT**GCCTATAACCATTGTTTTTTACTTTCAA-3'

Genlere uygun olarak tasarlanan primerler ile PCR reaksiyonu kuruldu. Deney tüpüne 1 µL CIV genomik DNA'sı, 2.5 µL 1 mM geri primeri, 2.5 µL 1 mM ileri primeri , 4 µL 10 mM dNTP, 5 µL $MgCl_2$ Buffer, 0,4 µL Taq DNA polimeraz enzimi eklendi. Karışımın son hacmi ddH_2O ile 50 µL'ye tamamlandı.

2.3.2. 118L Geninin pGEM- T Easy Ara Vektörüne Klonlanması

PCR koşulları, 98 °C'de 30 saniyelik denatürasyon ve 35 döngü olacak şekilde, 98 °C'de 10 saniye, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR sonunda çoğaltılmış olan DNA fragmentleri ise 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Yürütme sonrası jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. Ardından jel dikkatli bir şekilde kesildi. Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma (Macherey-Nagel) kiti kullanıldı ve prosedüre uygun olarak jelden temizlenmesi gerçekleştirildi. En son olarak DNA'nın konsantrasyonu ile saflığı nanodrop cihazıyla tespit edildi.

pGEM-T Easy vektörüne ligasyon için hazırlık yapıldı. Mikrosantrifüj tüpüne buzun içinde; 1 µL pGEM-T Easy vektörü, 4 µL insert DNA, 6 µL 2xbuffer ve son olarak 1 µL T4 DNA ligaz konuldu ve ligasyonun gerçekleşmesi için 1 gece 16 °C'de inkübasyona bırakıldı. Transformasyon için kompetent hücre hazırlandı.

2.3.2.1. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Kompetent hücre hazırlama aşamasında ilk olarak bakteri suşlarının büyümesi için uygun besiyeri hazırlandı. Bu aşama için ticari Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri kullanıldı. Toz halindeki besiyeri distile suda çözüldükten sonra cam şişede otoklavlandı ve 4 ºC'de muhafaza edildi. Katı olan Luria Bertani (LB) agar besiyeri distile suda çözüldü ve erlenmeyerde otoklavlandı. Besiyeri otoklavdan alındıktan sonra ısısının düşmesi beklendi ve ısı düştüğü zaman içerisine ampisilin antibiyotiği (0,1 mg/mL) eklendi. Petri kaplarına dökülerek soğutuldu ve katılaştırma işlemi gerçekleştirildi. Luria Bertani (LB) agar içeren petrilerinin kapakları kapatıldı ve 4 ºC'de muhafaza edildi.

E. coli DH10β suşu, bir gün önceden 3 mL LB sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi. 37 ºC'de 200 rpm'de 16 saat boyunca sallayıcı inkübatörde büyütülmeye bırakıldı. Büyüyen *E. coli'*nin yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 1 mL'lik küvetler kullanılarak ölçüldü. Hücrelerin yoğunluğu 30 mL LB sıvı besiyerine OD_{600}'de 0,1 olacak şekilde inokülasyon yapıldı. Kültür, 37 ºC'de 1 saat kadar OD_{600}'de 0,4-0,5 olana kadar sallayıcıda büyütüldü. Ardından büyümüş olan hücreler soğutmalı santrifüjde 5 dakika, 4ºC'de, 4500 rpm'de, santrifüj edildi. Santrifüjden alınan örneklerin süpernetant kısmı döküldü. Pelletin üzerine 100 mM'lık 10 mL soğuk $CaCl_2$ çözeltisi eklendi. Karışım hafifçe sallanarak süspansiyon haline getirildi. Daha sonra 30 dakika buzda bekletilmeye bırakıldı ve 30 dakika sonra karışım 5 dakika, 4 ºC'de, 4500 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atılarak kompetent hücre bulunduran pellet kısmı 2 mL $CaCl_2$ çözeltisinin içerisinde çözüldü ve kullanılıncaya kadar saklandı. Kompetent hücreler 4ºC'de en çok 2 gün, en az 2 saat içerisinde kalabilir bu süre zarfı içerisinde kullanılmalıdır.

2.3.2.2. Transformasyon

Transformasyon aşaması için, 7 µL ligasyon ürünü ve 200 µL kompetent *E. coli* DH10β hücresi, mikrosantrifüj tüpüne eklenerek karıştırıldı. Bu karışım ilk olarak mikrosantrfiüj tüpünde 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 30 dakikanın sonunda 45 ºC'lik ısıtıcı blokta 2 dakika ısıtma yapılarak ısı şokuna maruz bırakıldı. Bu ısı şoku ile kompetent hücrelerin gözeneklerinin açılması ve bu sayede rekombinant vektöründe hücrenin içine girmesi sağlandı. Isı şokunun ardından tekrar mikrosantrifüj tüpü buz

üzerine konuldu ve 2 dakika bekletildi. Daha sonra cam tüpün içerisine 1 mL LB sıvı besiyeri aktarıldı ve içine karışım eklenerek 1 saat 30 dakika 37 ºC'de sallayıcı cihaza konularak büyümeye bırakıldı. Sallayıcı cihazdan sonra hücreler alındı ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 3 dakika, 6000 xg'de çöktürülmesi yapıldı. Çöktürme sonrası süpernetanın bir kısmı dökülerek tüpte 50 µL kalacak şekilde dibinde bırakıldı. Pellet ise dip kısımda bırakılan besiyeri içinde pipetleme ile al-ver yapılarak yavaşça çözüldü. Steril kabin içerisinde, pellet, 40 µL IPTG (100 mM, izopiropil beta-D-tiyogalaktosid;), ampisilin (100 mg/mL) antibiyotiği ve 40 µL X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolilbeta-D-galakto-piranosid,50 mg/mL) içeren LB agar petrisine yayma ekim ile yayıldı. Daha sonra petriler 16 saat 37 ºC'lik etüvde inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrasında oluşan koloniler gözlemlendi. Oluşan kolonilerden beyaz olanları seçildi.

2.3.2.3. Rekombinant Seçimi ve Plazmit İzolasyonu

İnkübasyon sonrası beyaz koloniler seçildi ve 1 mL LB sıvı besiyeri içerisine amfisilin antibiyotiği eklenerek gece boyu büyütüldü ve büyüyen hücreler mikrosantrifüj (1,5mL) tüpüne aktarılarak 4 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Tüp içerisinde 50 µL bırakılarak süpernetant dikkatlice döküldü ve kalan besiyeri içerisinde pellet kısmı vorteks ile çözülerek pelletin üzerine TENS solüsyonundan (1 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM Tris-HCl, pH 8,8; %0,5 SDS, 0,1 N NaOH) 300 µL eklendi. Daha sonra karışım yavaşça 5-6 kez alt-üst edildi. Üzerine 150 µL sodyum asetat (pH 5,2, 3M) çözeltisi eklenerek 5 dakikada bir karışım yine dikkatlice alt üst edildi. Ardından karışım, buz üzerine konularak 10 dakika bekletildi ve buz üzerinde de 5 dakikada 1 alt üst yapıldı. Buz üzerinden alınan karışım 13.000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi. Kromozomal DNA ve hücre atıkları pellet kısmında biriktiği için plazmid DNA içeren süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine oda sıcaklığında 900 µL %95'lik etanol (EtOH) eklendi. Karışım alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Plazmidleri temizlemek amacıyla pelletin üzerine %70'lik 500 µL EtOH eklendi, 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı tekrar atılarak tüp steril kurutma kağıdı üzerine ters çevrildi ve 37 ºC'de 10 dakika kadar kurutuldu. Bu işlem ile pellet içerisinde bulunan plazmidin, alkol kalıntısından kurtarılması sağlandı. Daha sonra 30 µL ddH_2O pellete eklendi. Buz üzerinde 30 dakika bekletilerek pellerin çözülmesi sağlandı.

2.3.2.4. Transformasyonun Restriksiyon Analiziyle Doğrulanması

Plazmidleri izole ettikten sonra, *118L* dizisi içerdiğini anlamak amacıyla yapılacak doğrulama için, *Eco*RI restriksiyon enzimi (10 U/µL, Kat. No:ER0275, Thermo Scientific) ve *Hind*III (10 U/µL, Kat. No:E0505, Thermo Scientific) enzimi kullanıldı. İzole edilen bu plazmidlerden restriksiyon kesimi yapmak amacıyla bir kesim reaksiyonu hazılandı (Tablo 3). Plazmid DNA izolasyonuna reaksiyon karışımında kullanılan distile suyun içerisine 1/1000 oranında RNaz (10 mg/mL, Thermo Scientific, Kat. No: EN0531) eklenerek ortamda bulunan RNA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Karışım 37 ºC'de 1 saat 30 dakika etüv içerisinde inkübe edildi. Ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek *118L* dizisinin görülmesi beklenen uzunluktaki bantı sayesinde doğrulandı. Elde edilen bu plazmid, pGEM-T::118L olarak etiketlenerek muhafaza edildi.

Tablo 3. *Eco*RI ve *Hind*III Restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu

Restriksiyon Karışım	**Hacim**
10X Tampon	3 µL
*Eco*RI (10 U/µL) enzimi	1 µL
*Hind*III enzimi (10 U/µL)	1 µL
Plazmid DNA	10 µL
RNaz'lı (100 µg/mL) ddH_2O	15 µL
Toplam Hacim	30 µL

2.4. 118L Geninin pFastBacHT A Transfer Vektörüne Klonlanması

2.4.1. Plazmid İzolasyonu

Klonlanan pGEM-T-*118L'*nin doğruluğunu teyit ettikten sonra *118L* sırasının klonlama vektöründen ifade vektörüne (pFastBacHT A) aktarılması gerekmektedir (Şekil 6). Doğrulanan kolonilerden bir tane alındıktan sonra, 5 mL LB besiyeri içerisine ampisilin eklenerek 37 ºC'lik sallayıcıda gece boyu büyütüldü. Bu süre sonunda, ticari plazmid izolasyon kiti (Nucleospin Plasmid Miniprep Kit) kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. Aynı zamanda, *E.coli* hücrelerinde stoklanan pFastBacHT A vektörünün de izolasyonu gerçekleştirildi.

İzolasyon için, büyütülen gece kültürleri mikrosantrifüj tüpüne alınarak 3 dakika, 11.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernetant kısmı atılarak pelletin üzerine protokole uygun bir şekilde 250 µL "A1 Buffer" solüsyonu eklendi ve vorteks yapılarak karışım çözüldü. Daha sonra 250 µL "A2 Buffer" solüsyonu eklendi. Tüp dikkatlice 5 kez alt üst edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra karışıma, 300 µL "A3 Buffer" solüsyonu eklendi, alt üst edildi bu işlemle genomik DNA kırıldı. Daha sonra temizleme aşamasına geçildi ve 10 dakika 11.000rpm'de santrüfüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak, kitin içerisinde bulunan (Nucleospin Plasmid/ Plasmid Nolid) içerisinde mini filtresi bulunan toplama tüpüne alındı. 1 dakika boyunca 11.200 rpm'de santrifüj gerçekleştirildi. Filtrenin içerisinden geçen sıvı, tüpün dibinde birikti ve bu sıvı atıldı. Daha sonra filtre yeni bir toplama tüpüne takıldı. Filtrenin üzerine iki kere ayrı ayrı 500 µL "yıkama" solüsyonu eklendi. 1'er dakika 11.200 rmp'de santrifüj edilerek yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Yıkama sonrası filtre alınarak yeni mikrosantrifüj tüpüne takıldı. Filtrenin üzerine 30 µL "elüsyon" tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Plazmidlerin filtreden geçerek alttaki tüpte birikmesi için örnekler 2 dakika 11.200 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra izole edilmiş olan pGEMT-*118L* ve pFastBacHT A plazmidlerinin konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü.

2.4.2. Transfer Vektörünün Oluşturulması

2.4.2.1. Klonlama Fragmentlerinin Oluşturulması

Kit kullanılarak izole edilmiş olan pGEM-T-*118L*, *118L* dizisinin primerinin 5' ucuna eklenmiş olan *EcoR*I ve 3' ucuna eklenmiş olan *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesildi. pFastBacHT A ifade vektöründe de klonlama bölgesinde bu her iki enzim içinde kesme bölgesi bulunur ve bu yüzden aynı işlemler ifade vektörüne de yapıldı. Kesim reaksiyonları hazırlandı (Tablo 4) ve 37 ºC'de 2 saat etüvde reaksiyon gerçekleştirildi. Kesim ürünü olan 118L dizisi ve ifade vektörü (pFastBacHT A) %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Yürütme sonrası olması gereken hizada oluşan DNA bantları bir lanset yardımıyla dikkatlice agaroz jelden kesildi ve jelden temizleme kiti kullanılarak DNA jelden temizlendi.

Tablo 4. A: *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle pGEMT-118Lkesim reaksiyonu. B: *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle pFastBacHT A'nın kesim reaksiyonu.

	A	**B**
Restriksiyon Karışımı	**Hacim**	**Hacim**
10X Tampon	5 µL	5 µL
*Eco*RI (10 U/µL) enzimi	1 µL	1 µL
*Hind*III enzimi	1 µL	1 µL
Plazmid DNA	9 µL	7 µL
ddH_2O	34 µL	36 µL
Toplam Hacim	50 µL	50 µL

2.4.2.2. Fragmentlerin Agaroz Jelden Temizlenmesi

Agaroz Jel üzerinden alınan DNA bantlarının temizlenmesi için "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up" kiti kullanıldı. Kesilen jel parçaları mikrosantrifüj tüpüne alındı. Protokole uygun olarak jelin üzerine 500 µL NT1 tamponu eklendi ve 5 kez alt-üst yapılarak karıştırıldı. Karışım 50 ºC'de 10 dakika ısıtıcı bloğa yerleştirildi ve bekletildi. Tüp ısıtıcı bloktayken arada bir alt üst edilerek jelin iyice erimesi sağlandı. Jelin tamamen eridiği görüldükten sonra mikrosantrifüj tüpü içerisindeki karışım kite ait filtresi bulunan toplama tüpüne mikropipet ile aktarıldı. Karışım 30 saniye 12.000 xg'de santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra filtrenin içerisinden geçip tüpün alt kısmında biriken sıvı atılarak filtrenin üzerine 700 µL yıkama solüsyonu olan NT3 solüsyonundan eklendi. Tüp, 30 saniye 12.000 xg'de santrifüj yapıldı. Son yıkama ile yapılan santrifüjden sonra filtreden geçerek tüpte biriken sıvı atıldı ve tüp 1 dakika 11.000 xg'de boş olarak santrifüj edilerek kurutulma tamamlandı. Kurutmanın ardından toplama tüpü atıldı ve filtreye yeni mikrosantrifüj tüpü takıldı. 30 µL "Elüsyon" tampon filtrenin tam ortasına eklendi ve sıvının filtreye tam olarak nüfuz etmesi için oda sıcaklığında 2 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra 1 dakika 11.000 xg'de santrifüj edildi ve bunun sonucunda elde edilen DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü.

2.4.2.3. *118L* Geni ile İfade Vektörü pFastBacHT A'nın Ligasyonu

Jelden temizlenen *118L* genini ifade vektörü olan pFastBacHT A ile ligasyon için reaksiyon mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı (Tablo 5). Karışım içerisine konulacak vektörün (pFastBacHT A) ve DNA'nın (*118L* Dizisi) ligasyon reaksiyonunda ise vektör:insört oranı önerilen şekilde 1:3 (50 ng/150 ng) oranında yapıldı. Hazırlanmış olan karışım, gece boyunca 4 ºC'de inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde pFastBacHT A-118L plazmidinin ligasyonu sağlanmış oldu.

Tablo 5. CIV DNA'sı (118L) ve pFastBacHT A vektörünün ligasyon reaksiyonu

Restriksiton Karışımı	**Hacim**
10X Tampon	2 µL
T4 Ligaz enzimi	1 µL
CIV(*118L*) DNA'sı (12 ng)	4 µL
pFastBacHT A vektör (35 ng)	2 µL
ddH_2O	11 µL
Toplam Hacim	20 µL

2.5. *118L* Geninin Bac-to-Bac Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması

2.5.1. Transfer Vektörünün *Escherichia coli* DH10Bac Hücrelerine Transformasyonu

İfade vektörü olan pFastBacHT A vektörünün bakülovirüs vektör sisteminde ifade edilmesi için *E.coli* DH10Bac hücrelerine transformasyonu olması gerekir. DH10Bac hücreleri özel hücrelerdir ve transpozisyon için gerekli enzimi üreten bakteriyal replikasyon orjinine sahip *Autographa California multi nükleopolihedrovirüs* (AcNPV) viral DNA'sına (bakmid) ve yardımcı plazmide sahiptirler. Bu hücreler kompotent hücre olarak hazırlandı. 3 ml LB besiyerine geceden aşılanan *E. coli* DH10Bac hücrelerinden sonraki gün 2.3.2.1. başlığında anlatıldığı gibi kompetent hücreler hazırlandı. pFastBacHT A-118L vektörünün transformasyonu için 100 µL kompetent hücre (DH10Bac), 5 µL (1 ng) rekombinant vektör mikrosantrifüj tüpüne alındı. Buz üzerinde yarım saat bekletildi ve 45 ºC'de 45 saniye ısıtıcı blokta ısı şokuna maruz bırakıldı. Isı şokundan sonra buzda 2

dakika bekletildi ve ardından 900 µL LB sıvı besiyeri ile birlikte mifrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 4 saat boyunca 37 ºC, 225 rpm'de inkübe edildi. Bu süre sonunda, transformasyonda petrilere yayma ekim yapmadan önce oluşacak olan kolonileri seyreltmek için 10 kat seyreltmesi yapıldı.

2.5.2. Rekombinant Bakmid'lerin Seçimi

Rekombinant bakmidlerin seçimi için; 40 µL X-gal ve 40 µL IPTG içeren LB agar petrisinin üzerine yayma ekim yapıldı. LB agarın içerisine; Kanamisin (bakmid seçimi için) gentamisin (gen bölgesini içeren ve donör plazmid olan pFastBacHT A'nın seçimi için) ve tetrasiklin (transpozisyon için gerekli enzimi üreten yardımcı plazmid seçimi için) olmak üzere 3 çeşit antibiyotik bulunmaktadır. LB agar petrisinin üzerine yayma ekim yöntemi ile yayıldı. Daha sonra 10 kat seyreltilmiş transform hücreler yayma ekim ile petrilere yayıldı. Petriler 48 saat 37 C'de inkübasyona bırakıldı. Bakmid seçimi için, boş olan bakmidler *lacZ* genini içermekte ve transpozisyon bu *lacZ* geni içinde gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, beyaz kolonilerin oluşması ile transpozisyon olanlar belirlenmektedir. Transformasyon ardından bakmid DNA ile ara transfer vektörü arasında her ikisininde bulunan homolog bölgelerden dolayı transpozisyon olması gerekmektedir. Büyüyen hücreler beyaz renkte ise transpozisyonun gerçekleştiği anlamına gelmektedir. 48 saat sonra oluşan büyük beyaz koloniler seçilir. Kolonilerin tamamen saf olmasını sağlamak amacı ile besiyeriye tekrar çizgi ekim yapıldı. Ardından 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 48 saatin sonunda transformasyon sonucu seyreltilmiş olan hücrelerden koloni oluşumları gözlemlendi. Oluşan mavi-beyaz kolonilerden beyaz olanlar seçildi ve seçilen kolonilerden gece kültürü atıldı. 16 saat 37 C'de 200 rpm hızda sallayıcıda büyütüldü. Bu gece kültüründe LB Bacmid Besiyeri kullanıldı. Bu besiyerinin içerisine yayma ekimde kullanılan 3 çeşit antibiyotik (kanamisin, gentamisin ve tetrasiklin) eklendi.

DH10Bac hücrelerine transform edilen pFastBacHT A-118L vektörün DNA izolasyonu ve PCR ile doğrulanması için transformasyondan sonra oluşmuş olan kolonilerden seçilerek gece kültürü hazırlandı. Kültürden TENS yöntemi kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Bakmidin *118L* genini ihtiva edip etmediği PCR yöntemi ile doğrulandı (Tablo 6). PCR sonucu %1'lik agaroz jel elektroforezi üzerinde görüntülendi.

Tablo 6. Rekombinant bakmidlerin doğrulanması için hazırlanan reaksiyon

PCR Karışımı	**Hacim**
$MgCl_2$ Tampon	2,5 µL
dNTP	2 µL
İleri Primer	1,25 µL
Geri Primer	1,25 µL
Taq DNA polimeraz enzimi	0,4 µL
DNA	1 µL
ddH_2O	12,6 µL
Toplam Hacim	20 µL

2.6. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu, Gen İfadesi ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması

Bir gün öncesinden *Spodoptera frugiperda* (Sf9) böceğine ait hücreler 6 gözlü hücre kültür kaplarına her bir gözde $2x10^6$ hücre olacak şekilde bırakıldı. Kabın tabanına tutunmalarını sağlamak için 28 °C'de etüvde bekletildi. 1 µg rekombinant bakmid, 5µL DNA ile 100 µL katkısız Grace's Insect medium (Gibco) karıştırıldı. Diğer taraftan 8 µL Cellfectin II Reagent (Invitrogen) ve 100 µL katkısız Grace's Insect besiyeri bir tüp içerisinde karıştırıldı. Daha sonra iki solüsyon bir ependorf tüp içerisinde dikkatlice birbirine karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakikada bir alt-üst edilerek 30 dakika boyunca bekletildi. Celfektin lipit türevi olduğundan DNA'ya bağlanma özelliği vardır. DNA ile lipit türevi kompleks oluşturarak hücre içine DNA'nın girmesini kolaylaştırır. Tabana tutunan hücrelerin üstünden besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler katkısız Grace's Insect besiyeriden 2 mL alınarak yavaş bir şekilde hücrelerin üzerlerinden gezdirilerek yıkama yapıldı. Katkısız Grace's Insect besiyeriden 800 µL alınarak, Celfektin-DNA karışımının üzerine yavaşça karıştırılarak eklendi. Hücreler bu şekilde 5 saat 28 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyon solüsyonu hücrelerin üzerinden uzaklaştırılarak solüsyonun üzerine 2 mL Sf-900 II SFM (Gibco) besiyeri eklendi (%5 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren). 28 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı ve transfeksiyon gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından oluşmuş olan rekombinant virüslerin temini için hücreler 5 dakika 500 x g'de santrifüj yapılarak çöktürüldü. Çöktürme sonrası oluşan süpernatant viral stok

olarak adlandırdı. Elde edilen viral stoğun çoğaltılması amacıyla T75 flasklere bırakılan 9,0x10^6 hücre 1 mL virüs kullanılarak enfekte edildi. Enfeksiyonun ardından hücreler 5 gün sonra toplanarak rekombinant bakmid DNA'ları içeren süpernatant kısmı 4°C'de muhafaza edildi. Süpernatant kısmı bakülovirüsü içerdiği için sonraki enfeksyionlarda kullanılmak üzere saklandı bu şekilde virüs üretimi gerçekleştirildi.

2.6.1. Rekombinant Protein Üretilmesi

Hücre kültüründe ilk olarak *118L* genine ait proteini üretmek için Sf9 hücreleri T75 flasklere, 9,0x10^6 hücre/flask olacak şeklinde dağıtıldı. Hücreler *118L* genini bakmid DNA içeren rekombinant bakülovirüs ile enfekte edildi. Ardından enfeksiyon için ise T75 flasklerde bulunan hücrelerin üzerine hacmi 2 mL olacak şekilde virüs solüsyonu yavaşça ilave edilerek yatay sallayıcıda 2-2,5 rpm hızda 2 saat boyunca sallanmaya bırakıldı. Bu işlem ile virüslerin hücrelere tutunması sağlandı. Daha sonra flasklere %5 FBS içeren Sf900 II SFM(1X) besiyeri ilave edildi ve son hacim 10 mL'ye tamamlanarak 28 ºC'lik etüvde inkübasyona bırakıldılar. 120 saatlik enfeksiyonun sonunda hücreler içerisinde bulundukları besiyeride süspansiyon haline getirilerek 1000 g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pellet protein saflaştırması için kullanıldı.

2.6.1.1. Rekombinant Protein Saflaştırılması

"MagneHis-Protein Purification System (Promega)" kiti kullanılarak protein saflaştırılması gerçekleştirildi. Bu işlemde N-terminal kısmında His-tag uzantısı olan proteinler seçilerek saflaştırılma yapıldı. Her 2,5x10^6 hücre için 1 mL olacak şekilde PBS (1X Phosphate Buffered Saline)'te çözülen pelletin üzerine 1 µL DNaz I ve 110 µL hücre lizis tamponu ilave edildi. Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 20 rpm hızda rotator ile döndürülerek inkübasyona bırakıldı. Her 1 mL örnek için 30 µL nikel partikülü ilave edildi. Proteinin nikel partiküllere bağlanması için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından örnekler magnetik tutucuya konuldu. Bu sayede nikel parçacıklarının çekilmesi sağlandı ve daha sonra geri kalan sıvı atıldı. 500 mM NaCl içeren yıkama/bağlanma tamponuyla proteine bağlanan nikel tozları süspansiyon hâline getirildi. Ardından magnetik tutucu yardımıyla çekilmeleri sağlanarak yıkama yapıldı ve işlem 3 kez

tekrarlandı. Son olarak ise başlangıçta kullanılan her 1 mL örnek için 100 µL olacak miktarda çözücü tamponu ve 30 µl imidozol eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık 2 dakika bekletildi. Daha sonra magnetik tutucuya yerleştirildi ve içerisinde protein olduğu bilinen sıvı kısmı alınarak, sonraki aşamalarda kullanılmak amacıyla -20 °C'de muhafaza edildi.

2.6.1.2. Rekombinant Proteinin Western Blot Analizi

SDS-PAGE ile ayırma işlemi yapıldı. SDS-PAGE için alt jel (seperated gel) ve üst jel (stacking gel) olmak üzere iki jel hazırlandı. Alt jel %30 acyrlamidemix 6 mL, 1.5 M Tris (pH8.8) 3.8 mL, %10 SDS 0.15 mL,%10 amonyumpersülfat 0.15 mL, TEMED 6 µL, H_2O 4.9 mL, olacak şekilde hazırlandı ve SDS-PAGE standında iki cam arasında dökülerek yarım saat kadar donması beklendi. Daha sonra üst jel %30 acyrlamidemix 0.5 mL, 1 M Tris (pH6.8) 0.38 mL, %10 SDS 0.03 mL, ,%10 amonyumpersülfat 30 µL, TEMED 0.003 mL, H_2O 2.1 mL, olacak şekilde falkonda hazırlandı ve donmuş olan alt jelin üzerine pipetle dikkatlice dökülerek standın tarakları takıldı. Üst jelde yarım saat donması beklendi ve taraklar yavaşça çıkartıldı. Jel tankına elektroforez tamponu ilave edilerek düzenek hazır hale getirildi. Kuyucuklara yüklenecek örneklere muamele tamponu (%0,1 bromofenol blue, 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %2 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %25 Gliserol) ilave edilerek örnekler 95 ^oC'de 5 dakika bekletildi. Ardından kuyucuklara protein örnekleri yüklendi. Yükleme tamamlandıktan sonra jel tankının kapağı kapatılarak güç kaynağının bağlantıları takıldı. Örnekler 80V sabit akımda ayırma işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında jel elektroblotlama aşaması için hazırlandı. SDS-PAGE'den alınan jel boyutunda 2 adet Whatman kağıdı ve 1 adet PVDF (Polivinilidendiflorid) membran kesildi. Whatman kağıtları 80 ml elektroblotlama (48 mM Tris-HCl, 39 mM Glisin, % 0,0375 SDS) ve 20 mL metanol solüsyonu ile ıslatıldı. Membran ise ilk olarak methanol ile muamele edildi. Daha sonra methanol-elektroblotlama tamponuyla ıslatıldı. Elektroblotlama cihazına whatman kağıdı, membran, jel, whatman kağıdı sırasıyla üst üste dikkatlice konuldu. Cihaz 40 mA 'da 1 saat 30 dakika çalıştırıldı. Bu şekilde proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Elektroblotlama sonrası için 2 ayrı Yıkama ve bloklama solüsyonları hazırlandı. 1 saat 30 dakika sonra cihazdan alınan Nitroselüloz membran bloklama solüsyonu (%5 süt tozu ve %0,05 Tween-20 içeren 50 ml PBS) içerisine alındı. Solüsyon içerisinde 37 ^oC'lik sallayıcıda 45 rpm'de 1 saat boyunca sallandı. Süre sonunda bloklama solüsyonu dökülerek yıkama solüsyonu (%0,05 Tween20 içeren 500 ml PBS ve

%0,5 süt tozu) membranın üzerini geçicek şekilde eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika sallayıca bırakıldı. Bu işlem 3 kere tekrar edilerek yıkama gerçekleştirildi. Yıkamanın ardından 50 ml'lik falkon içerisine 2,5 µL anti-His antikoru ile 5 ml yıkama solüsyonu eklendi. Membran falkonun cidarına yerleştirildi ve döndürücüde 1 gece oda sıcaklığında antikor ile muamele edildi. 1 gece sonra membran falkondan alındı ve tekrar 10 dakika ve 3 tekrar olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra yeni bir 50 ml'lik falkona 5 ml yıkama solüsyonu ve 2,5 µL Anti-Fare IgG (Alkalin Fosfataz antikoru (1:1000 sulandırma)antikoru eklendi. Membran aynı şekilde falkonun cidarına yeleştirildi ve döndürücü cihazda 2 saat antikor ile muameleye bırakıldı. Süre sonunda membran yıkama solüsyonu yine 10 dakika ve 3 tekrar olacak şekilde yıkandı. Yıkama sonrasında membran 10 dakika ve 2 tekrar olacak şekilde AP solüsyonu (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 5mM $MgCl_2$, pH 9,5,) ile yıkama yapıldı. Yıkama solüsyonu atıldı ve membran üzerine 100 µL NBT/BCIP (Bromochloroindolyl fosfat, Nitroblue tetrazolium ve Roche, 11681451001) ve 10 mL AP içeren karışım döküldü. Bantlar görünür oluncaya kadar sallamaya devam edildi. Bantlar görünür olduğu anda membran dH_2O ile yıkanarak durduruldu ve ardından kurutuldu.

2.6.1.3. Diyaliz Yöntemiyle 118L Proteininin Temizlenmesi

Kit kullanılarak saflaştırılan proteinin, kitin içerisindeki kimyasallardan temizlenmesi amacıyla diyaliz yöntemi uygulandı. Diyaliz membranı yarı geçirgen zardır. Bu membran yaklaşık (10 kDa MWCO (Molecular weight cut-off)) 15 cm uzunluğunda olacak şekilde kesildi. Behere 1 mM EDTA ile %2 $NaHCO_3$ eklendi ve 500 ml distile su içerisinde yaklaşık 10-15 dakika kaynatıldı. Daha sonra ise distile olan su içerisine diyaliz membran alındı. Distile su içerisinde yaklaşık 10-15 dakika daha kaynatıldı ve diyaliz membran kullanıma hazır hale getirildi. Diyaliz membranın bir ucu kıskaç ile tutturularak açık olan uç kısmından saf olan 118L proteini diyaliz membran içine dikkatlice doldurulduu. Daha sonra zarın açık olan bu uç kısmıda kıskaç ile tutturuldu bu şekilde iki uçta tamamen kapatılmış oldu. Beher içerisine PBS tamponu eklendi protein içeren diyaliz membran behere konuldu ve manyetik karıştırıcı sayesinde döndürülmeye başlandı. Beher karıştırıcı blok üzerine konularak hızı 20 rpm'e ayarlandı. Manyetik karıştırıcı sayesinde diyaliz membran dönerek diyalize maruz bırakıldı. 6 saatte bir PBS tamponu değiştirilerek

yenisi eklendi. Diyaliz sayesinde küçük moleküler ağırlığa sahip proteinler ve saflaştırmada kullanılan imidazolun 118L proteininden uzaklaştırılması sağlandı.

Protein miktarının tayini ise 1976 yılında Bradford'un geliştirmiş olduğu metoda göre yapıldı (Bradford 1976). Kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisinde 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 µg BSA içeren çözeltiler dH_2O ile son hacim 500 µL'ye tamamlandı. Konsantrasyonları öğrenilmek istenen örneklerden ve bu çözeltilerden 10'ar µL alındı. Daha sonra üzerlerine 200 µL boya (Protein Reagent, Sigma) eklenerek vortekslendi. 3 tekrarlı olacak şekilde 96 gözlü kaplara aktarıldı. 15 dakika inkübasyona bırakıldı. SpectraMax M2 (Molecular Devices) cihazıyla 595 nm'de ölçüm yapıldı.

2.7. Rekombinant Proteine Karşı Poliklonal Antikor Üretimi

Üretmiş olduğumuz rekombinant 118L proteini kullanılarak antikor üretimi Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsünde (Prof. Dr. Erkan YILMAZ tarafından) aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

2.7.1. Fare İnokülasyonları

Üç adet Balb/c fareye complete freund's adjuvant (CFA) içinde CIV rekombinant 118L proteininin intraperitonel enjeksiyonu yapıldı (3 fare, 3'er enjeksiyon, 50 µg/enjeksiyon)) ve enjeksiyon 21 gün arayla tekrarlandı. İkinci enjeksiyon ve sonrası incomplete freund's adjuvant varlığında gerçekleştirildi. Üçüncü enjeksiyondan 21 gün sonra kuyruk veninden 50 µL kan alınarak antikor oluşumunu test etmek amacıyla ELISA yapıldı. Kandaki anti-118L antikor titrasyonu 1:100.000 seviyesinde pozitif reaksiyon verene kadar incomplete freund adjuvant varlığında rekombinant 118L proteininin intraperitonel enjeksiyonuna devam edildi. Uygun titrasyona ulaşıldığında son (boost) enjeksiyon yapılarak 3 gün beklendi ve anestezi altında farelerden terminal kan ve dalak alındı.

2.7.2. Serumların ELISA ile Titrasyonu

Üretilen rekombinant 118L proteini, PBS içerisinde 2 µg/mL ve 4 ug/mL konsantrasyonda 96 kuyucuklu mikro plakalara kaplandı (100µL). +4°C'de bir gece bekletildikten sonra %5 BSA ile oda sıcaklığında, 2 saat bloklama yapıldı. Blok solüsyonu dökülerek fare serumu seri dilüsyonlar (1:100, 1:1000, 1:10.000, 1:50.000, 1:100.000, 1:200.000, 1:500.000) hazırlanarak ilave edildi, çalışmalar tekrarlı gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında 2 saat çalkalamada bekletildikten sonra PBST ile 5 kez yıkandı (0.1% Tween 20, PBS) ve HRP işaretli anti-mouse IgG sekonder antikoru (100ul) ile 1:2000 dilüsyonda, 2 saat tutulduktan sonra yine 5 kez yıkandı. Fare serumundan gelen rekombinant 118L'ye karşı olan antikorlar primer antikor olarak adlandırıldı. HRP'nin substratı TMB ile reaksiyon doyana kadar oda sıcaklığında yaklaşık 15 dk bekletildi ve % 2'lik sülfirik asit ile reaksiyon durduruldu. 450 nm'de ELISA plaka okuyucuda okunarak numunelerde bulunan antikor konsantrasyonları hesaplandı.

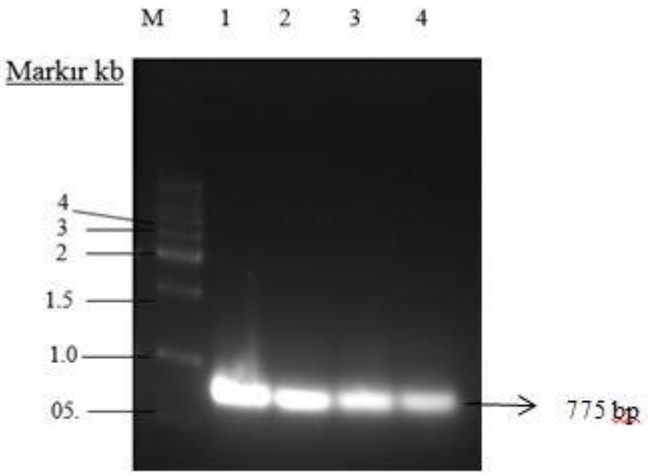
2.7.3. Saflaştırılan 118L Proteini ile Geliştirilen Antikorun Test Edilmesi

Saflaştırılan 118L proteini ve geliştirilen anti-118L antikoru ile western blot analizi gerçekleştirildi. Üretilen 118L proteini %12'lik SDS-PAGE 'de elektroforez yapıldı ve ardından jel içeriği Western-blot analizi için PVDF membrana aktarıldı. Bunun için, 2.6.1.2. de anlatıldığı şekilde Western analizi yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. *118L* Geninin Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması

Virüsün hücreye giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olduğu ve konak hücre zarı proteinlerine tutunduğu düşünülen *118L* geninin aktivitesini bulmak amacıyla ilk olarak CIV'e ait *118L* geni agaroz jelde yürütüldü ve 118L DNA dizisinin varlığı, agaroz jel elektroforezinde görülmesi beklenen 775 bç'lik bant sayesinde doğrulandı. DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazıyla tespit edildi. Sonuçta 59,4 ng/µL olarak belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6. PCR yöntemi ile *118L* gen fragmanının çoğaltılması. M: 100 bç'lik markır (Biobasics), 1,2,3,4: 118LFW ve 118LRV primerleri ile çoğaltılan 118L dizisinin 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren, %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülenmesi.1-4 numaralar: *118L* gen dizisine ait.

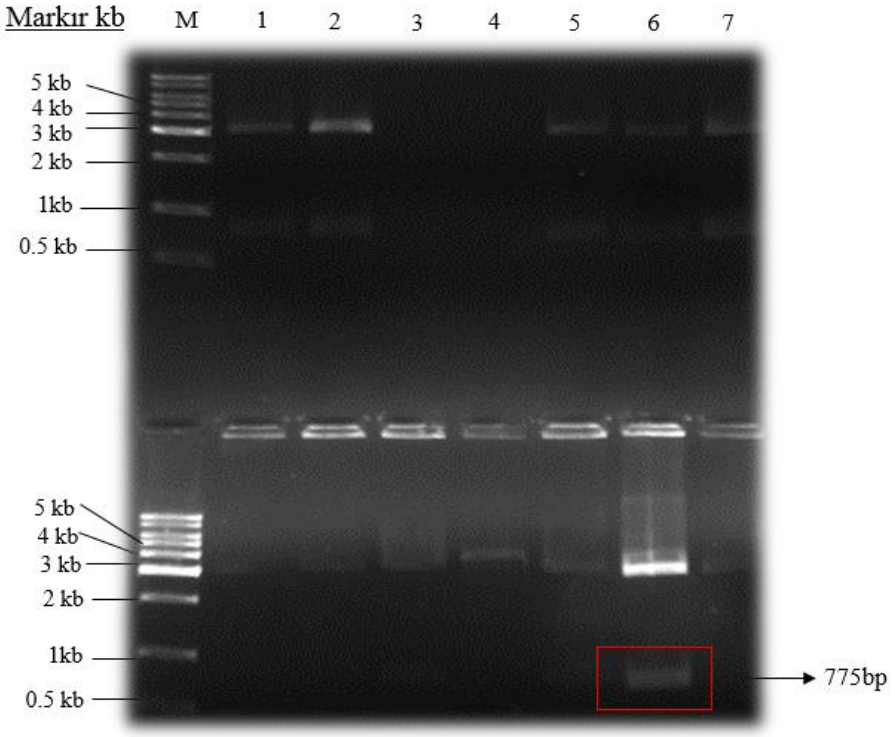
3.1.1. *118L* Dizisinin Klonlama Vektörüne (pGEM-T Easy) Klonlanması ve Transformasyonu

PCR reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılan DNA dizileri ile pGEM-T Easy vektörünün ligasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon için, *Escherichia coli* DH10β kompetent

hücreleri ve $CaCl_2$ metodu kullanıldı. Transformasyon sonrası *118L* DNA dizisi, vektörde *lac*Z bölgesinin arasına girdiği için, 118L DNA dizisini içeren transformantların beyaz koloniler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 7).

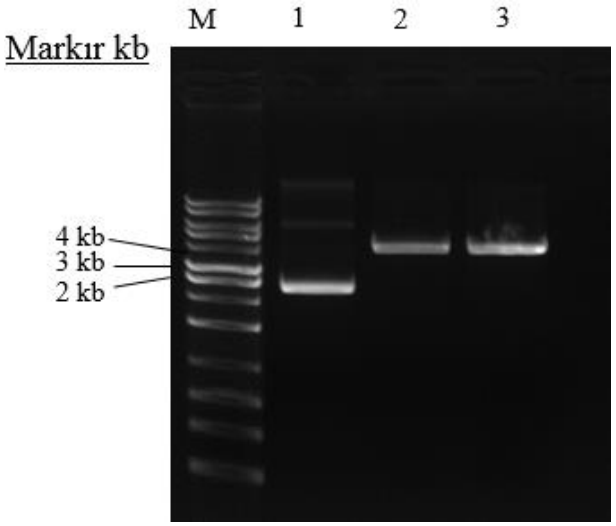
Şekil 7. *118L* genini içeren pGEM-T Easy vektörüyle *E.coli*'nin transformasyonu. Geni taşıyan vektör beyaz kolonileri ve geni taşımayan vektör mavi kolonileri oluşturur (URL 4).

Beyaz transformatlar seçildi. Plazmid DNA'ları *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesildi. Sıralı kesim yapılan işlemlerde ilk olarak *Hind*III restriksiyon enzimi ile daha sonra *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirildi ve *118L* DNA dizisi agaroz jelde yürütüldü ve beklenen 775 bç'lik bant doğrulandı (Şekil 8). Jel üzerinde gürüntülenen 3015 bç'lik bant ise pGEM-T Easy vektörüne aittir.



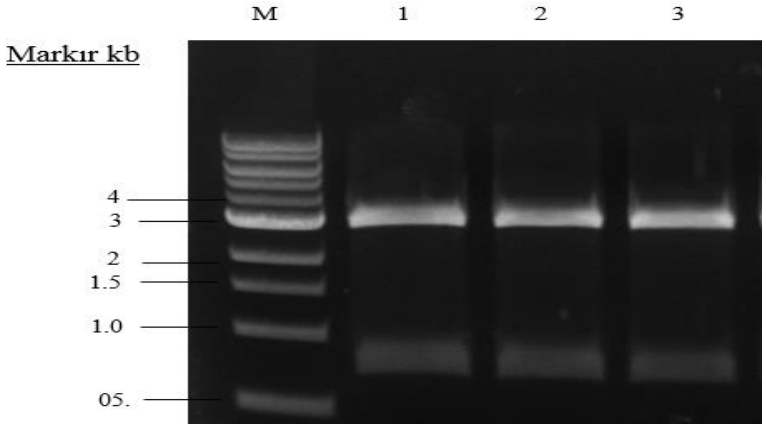
Şekil 8. *118L* genini içeren pGEM-T-118L klonunun doğrulanması. Doğrulama için *Hind*III ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri kullanılarak 4 saat 37 °C'de kesim yapıldı.1,2,3,4,5,6,7: *Eco*RI ve *Hind*III enzimi ile kesim işlemi sonrasında alttaki bant CIV *118L*'ye ait (775bç) DNA ve üstteki bant pGEM-T vektörü (3015 bç), M; Markır.

Doğrulamadan sonra plazmid izolasyonu yapılarak tekrar *Hind*III ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Kesim işlemleri sıralı kesim olarak gerçekleştirildi. İlk olarak pGEM-T Easy-118L *HindIII* restriksiyon enzimiyle kesim reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 9).



Şekil 9. pGEM-T Easy-118L klonunun *Hind*III restriksiyon enzimiyle kesimi. Reaksiyon ürünü %1'lik agaroz ve 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. M; Markır.

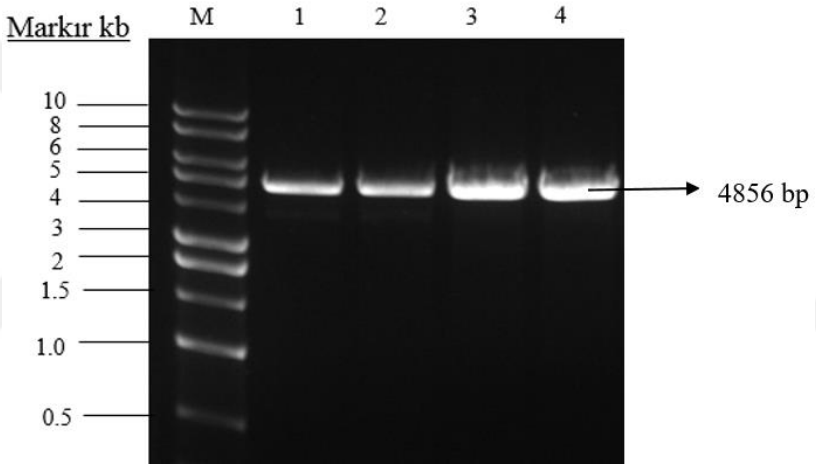
pGEM-T Easy-118L *HindIII* restriksiyon enzimiyle kesimi gerçekleştirildikten sonra *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile ikinci kesim yapıldı (Şekil 10). 775bç'lik bant görüntülenmesinin ardından jelden temizlemesi yapıldı ve klonlama vektöründen ifade vektörüne (pFastBacHT A) aktarımı gerçekleştirildi.



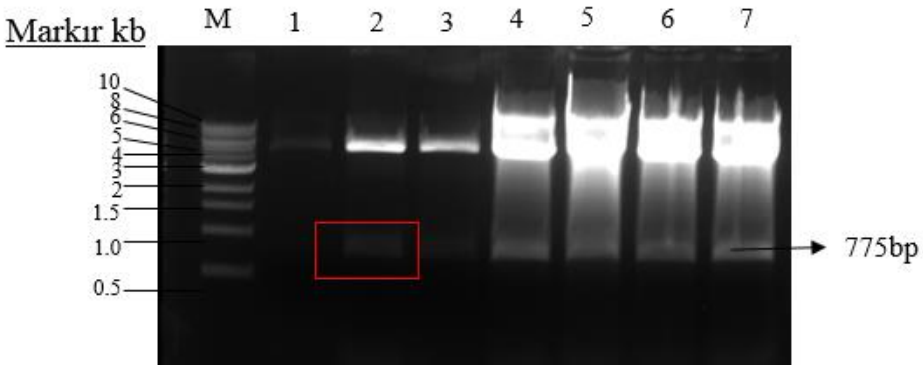
Şekil 10. pGEM-T Easy-118L klonunun *Hind*III restriksiyon enzimiyle kesimi işleminden sonra *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesim. Reaksiyon karışımı 1'lik agaroz ile 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. M: Markır.

3.1.2. *118L* Gen Dizisinin İfade Vektörüne (pFastBacHT A) Klonlanması ve Transformasyonu

pGEM-T -*118L* vektörü ihtiva ettiği doğrulanan kolonilerden ve boş pFastBacHT A vektörü ihtiva eden kolonilerden, kit kullanırak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmid DNA'lar *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile çift kesim yapıldı (Şekil 9-10). Reaksiyon süresinin sonunda ise DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Jelden kesilip temizlenen *118L* dizisinin pFastBacHT A vektörüne ligasyonu, ürünün *E. coli* DH10Bac kompotent hücrelerine transformasyonu ve kanamisin antibiyotiğine göre seçilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı.



Şekil 11. PFastBacHT A ifade vektörünün *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesimi. Reaksiyon karışımı %1'lik agaroz jel ile yürütüldükten sonra görüntülendi. M: Markır 1 kb markır (Promega). 1, 2, 3, 4: Lineeer vektör bantları.

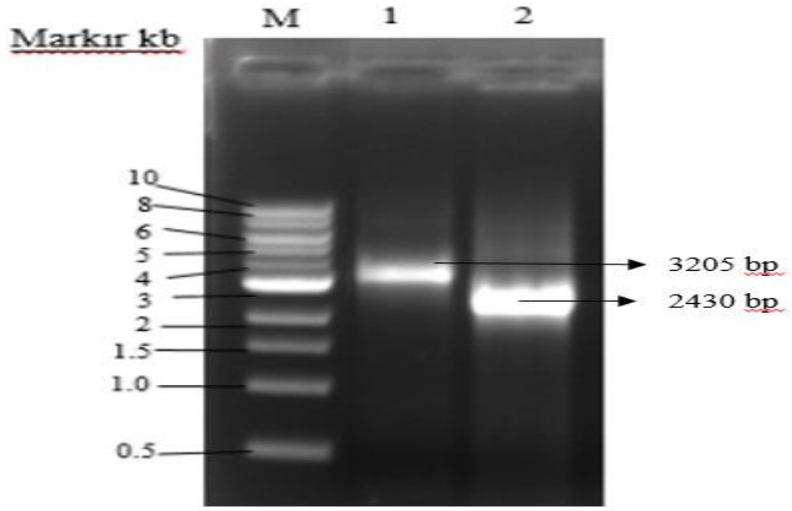


Şekil 12. pFastBacHT A vektörüne *118L* geninin klonlanması sonrası restriksiyon analizinin %1'lik agaroz jel ile görüntülenmesi. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: Kesim ile oluşan üst bant pFastBacHT A vektörüne (4856 bç), alt bant *118L* genine (775 bç) aittir. M: 1 kb markır (Biolabs).

İzole edilen plazmidler, *Eco*RI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tutularak, agaroz jel elektroforeziyle yürütme yapıldıktan sonra *118L* DNA dizisinin pFastBacHT A vektörü içindeki varlığı belirlendi. (Şekil 12). 118L DNA dizisinin varlığı agaroz jel elektroforezinde beklenen 775 bç'lik bandın görülmesiyle doğrulandı. Jelde gürüntülenen 4856 bç'lik ağır bant, pFastBacHT A vektöre aittir. Jelden temizlenen vektör pFastBacHT A-118L olarak isimlendirildi.

3.2. *118L* Geninin Bac-to-Bac Bakülovirüs Vektör Sistemine Aktarılması

118L gen bölgesini içeren pFastBacHT A ara vektörünün bakülovirüs vektör sistemine aktarılması amacı ile *E.coli* DH10Bac kompotent hücrelerine 2.5.1.de anlatıldığı şekilde transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası bakmid DNA ile ara transfer vektörü arasında ikisinin de var olan homolog bölgelerden dolayı transpozisyon olması gerekmektedir. Transpozisyonun gerçekleşmesi için büyüyen hücrelerin beyaz renkli olması sağlanacaktır. 48 saat sonra oluşan beyaz kolonilerden seçilerek kolonilerinin saf olması için çizgi ekim yapıldı ve 37 ^{o}C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan beyaz kolonilerden rekombinant bakmid DNA izolasyonu yapıldı. *118L* genine özgü primerler kullanılarak elde edilen bu bakmid DNA'sı PCR ile doğrulandı (Şekil 13).



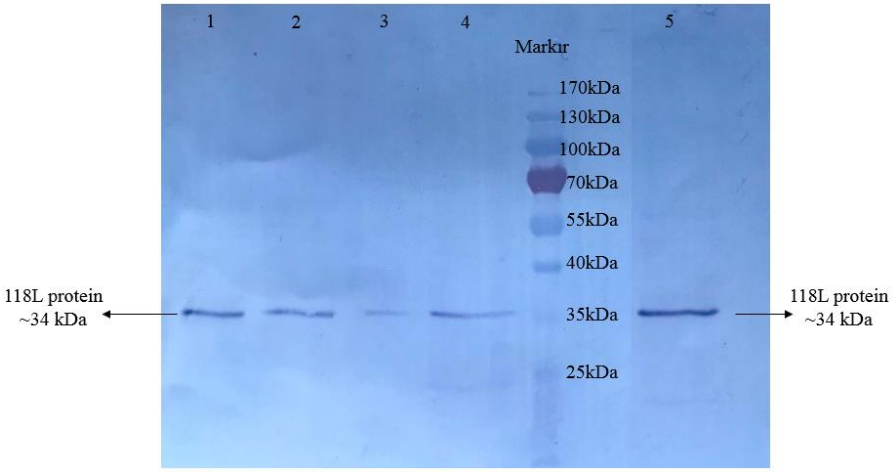
Şekil 13. *118L* gen bölgesini içeren rekombinant bakmid DNA'sının doğrulanması. 1: 118L içeren bakmid DNA'sı, 2: 118L içermeyen bakmid DNA'sı. M: 1 kb markır (Biolabs).

3.3. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Gen İfadesi

Hücre kültüründe, doğrulanan ve elde edilen bakmid DNA'sı kullanılarak Sf9 hücrelerine transfeksiyonu 2.6.'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Enfeksiyon sonrası elde edilen süpernatant viral stok olarak adlandırıldı. Bu viral stok kullanılarak, 118L proteini hücre kültüründe 2.6.1.'de anlatıldığı şekilde yüksek miktarda üretildi.

3.3.1. Rekombinant 118L Proteinin Saflaştırılması ve Western Blot Analizi

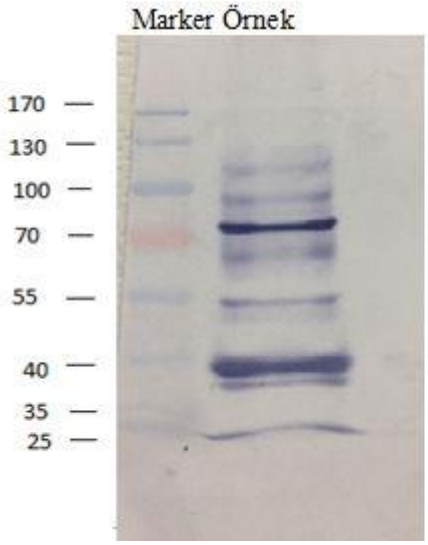
Bakülovirüs vektör sisteminde yüksek miktarda üretilen rekombinant 118L proteini ihtiva ettiği histidin kuyruğu hedef alınarak "MagneHisTM protein saflaştırma sistemi (Promega)" kullanılarak saflaştırıldı. Protein konsantrasyonu belirlendi. Daha sonra proteinler SDS-Poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. SDS-PAGE ile ayrışan protein bantları sonrası bölüm 2.6.1.2.'de anlatılan protokole göre PVDF membrana aktarıldı ve 118L proteininin içerdiği histidin kuyruğa özgü antikor kullanılarak western blot analizi ile görüntülendi. Western blot analizi, hedeflenen ~34 kDa büyüklüğündeki protein bantta istenilen yerde görüntülendi (Şekil 14). 2.6.1.3. de anlatıldığı gibi proteinler temizlenerek konsantrasyonu belirlendi. Protein konsantrasyonları 497,95 µg/mL ve 477,56 µg/mL bulundu.



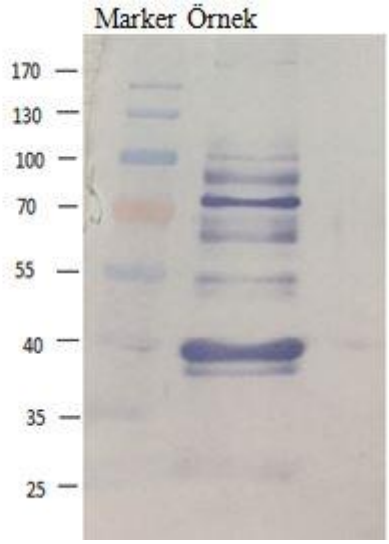
Şekil 14. Bakülovirüs vektör sisteminde üretilen 118L proteininin Western Blot Analizi. 1,2,3,4,5: Saflaştıtılan 118L proteini ~34 kDa. Markır (Fermentas, PAGE ruler).

3.4. Rekombinant Proteine Karşı Poliklonal Antikor Üretimi

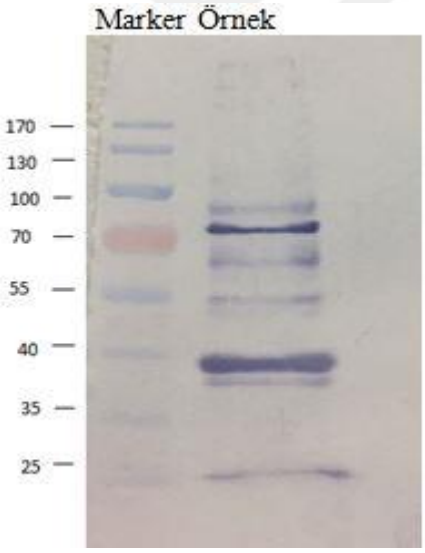
Saflaştırılan 118L proteini ve üretilen asitez sıvısı left, asitez sıvısı right, serum R, serum L ve Balb/c antikorları ile western blot analizi yapıldı. Üretilen 118L proteini %10'luk SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve daha sonra bu protein üretilen antikorlarla western blot analizinde kullanıldı. Western-blot analizinde 118L proteini %10'luk jelde yürütüldükten sonra jel PVDF membrana aktarıldı. Membran kurutuldu, tarayıcıda taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı (Şekil 15-19).



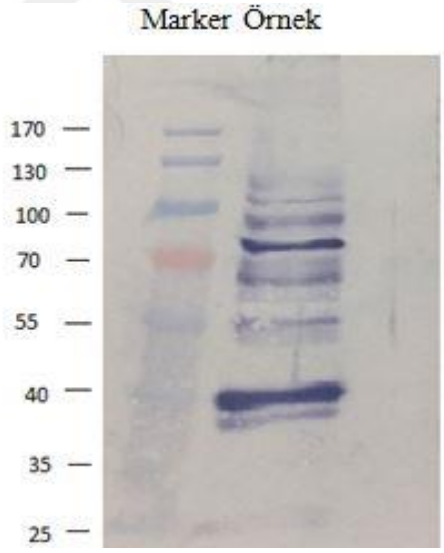
Şekil 15. Serum L antikoru ile 118L proteinin proteinin western blot analizi



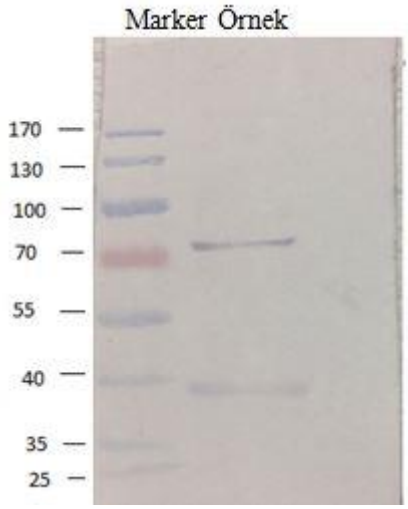
Şekil 16. Serum R antikoru ile 118L proteinin western blot analizi



Şekil 17. Asitez sıvısı left antikoru ile 118L proteinin western blot analizi



Şekil 18. Asitez sıvısı right antikoru ile 118L proteinin western blot analizi



Şekil 19. Balb/c antikoru ile 118L proteinin western blot analizi

4. TARTIŞMA

Tez çalışmasının ana materyali olan *Chilo iridescent virus* (CIV) veya resmi adıyla *Insect iridescent virus* 6, (IIV-6 olarak bilinen), *Iridoviridae* ailesine ait *Iridovirüs* cinsinin bir tip türüdür. (Chinchar vd, 2005; Williams vd, 2005). *Iridoviridae* (iridoviridler) ailesinin üyeleri, hem omurgasız hem de omurgalı canlıları enfekte eden ve semptomlarının şiddeti, konakçı uygunluğundaki küçük azalmalardan sistemik hastalığa ve büyük ölçekli ölümlere kadar değişen büyük çift zincir DNA virüsleridir. İridovirüslerin sınıflandırılması için çeşitli özellikler faydalı olmuştur. Bununla birlikte, yeni türler sürekli olarak keşfedilmektedir. (İnce vd.,2018)

CIV, 215 olası protein kodlayan açık okuma çerçevesine (ORF) (Eaton vd, 2007;Magrane ve Konsorsiyum, 2007; Tsai vd, 2007) ve doğrusal çift zincir DNA'ya sahiptir (Jakob vd, 2001;Jakob ve Darai, 2002). Çeşitli tarımsal zararlılar üzerinde insektisidal aktiviteye sahip olduğundan (Jakob ve Darai, 2002), biyolojik mücadele için potansiyel bir materyal olarak kabul edilmektedir (Hernandez vd, 2000; Jakob vd, 2002; Kleespies vd, 1999). Sahip olduğu özellikleri ve virion morfolojisi sayesinde biyoteknolojide oldukça kullanılma potansiyeline sahiptir (Williams ve Ward, 2010). CIV, aynı zamanda nükleositoplazmik büyük DNA virüslerinin (NCLDV) enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır (Yan vd., 2009; Bronkhorst vd., 2012; Bronkhorst vd., 2014). Ayrıca CIV'nin gen ifade vektörü ve terapi olarak geliştirilme potansiyelide bulunmaktadır.

Ranavirüs tip türü olan Frog virus 3 (FV3) üzerinde gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, FV3'e ait 53R ORF'sinin CIV 118L ORF'si ile homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu ORF, muhtemel bir miristoillenmiş zar proteinini kodlar. 53R geni, antisens morfolin oligonükleotid (asMOs) ile susturulduğunda virüs üretiminin %60 oranında azaldığı ve virüs asemblesinin durduğu belirlemiştir. Bu sonuçlar, FV3 replikasyonu için 53R'nin gerekli olduğunu ve viryon formunun oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Whitley vd, 2010). 118L'nin 53R ile olan dizi benzerliğinden dolayı 118L geninin de benzer bir fonksiyonunun olduğu düşünülmektedir.

Singapore grouper iridovirus (SGIV) VP088 ORF'si bir zar proteinidir ve IIV6 118L ORF ile homolojiye sahiptir. Bu proteinin geninin susturulmasının SGIV enfeksiyonunu baskıladığı ve virüsün hücre içine girişini engelleyerek enfektiviteyi azalttığı tespit

edilmiştir. Bu sonuçlar, VP088'in SGIV'nin hücreye girişinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Yuan vd, 2016). Böylece 118L proteininin de benzer bir görevinin olabileceği anlaşılmaktadır.

Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada (Özsahin, 2018) 118L'nin, 415R ile olan etkileşimi pull-down analiziyle doğrulanmış ve 415R'nin amino asid sırasında herhangi bir korunmuş domein ile homolojisi olmadığı bulunmuştur. 415R'nin ise 4 farklı membran proteini ile etkileştiği ve bunlardan birinin 118L proteini ile olduğu bulunmuştur. 415R proteininde 118L ile etkileşiminden dolayı, 118L proteinin virüs giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olabildiği ve bu yüzden virüsün konak hücreye tutunması aşamasında önemli bir görev alabildiği düşünülmektedir.

CIV, üzerinde gerçekleştirilen proteomiks çalışmalar sonucunda, CIV genomunun dizin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda 212,482 baz çifti büyüklüğünde olduğu tespit edilmiştir (Jakob vd., 2001). Genomunda 215 tane açık okuma zinciri (ORF) olabileceği biyoinformatik analiz ile belirlenmiştir (Eaton vd., 2007). Bu 215 ORF'den tek peptide göre ise 54, 2 yada daha fazla peptide göre 46 tanesi virüs yapısal proteini olarak tanımlanmıştır. Bunlardan 36 tanesinin ise diğer iridovirüs ve askovirüslerle homoloji gösterdiği belirlenmiştir (İnce vd., 2010).

CIV'nin 54 adet yapısal proteinlerden biri virüs replikasyon döngüsü için hayati bir öneme sahip olabilcek potansiyel zarf proteini olan 118L açık okuma zinciri tarafından kodlanmaktadır. 118L, viral füzyon işleminde gerekli olan transmembran (TM) domainine sahip bir zarf proteinidir (Braunwald vd, 1979).

118L'nin bir zarf proteini olması, homologunun Iridoviridae familyasındaki diğer virüslerde bulunması, bahsedilen homologlarla yapılan çalışmalar 118L'nin virüs için önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Böylece 118L tarafından kodlanan proteinin fonksiyonunun aydınlatılması virüsün hücreye girişinin aydınlatılmasına önemli katkı sunmaktadır. Protein fonksiyonlarının analizlerinde en temel aşama hedef proteinin ve bu proteine karşı antikorun üretilmesidir.

Protein fonksiyonlarının aydınlatılması amacı ile çeşitli protein üretim sistemleri kullanılmaktadır.

Bilimsel araştırma, sağlık, endüstri gibi alanlarda ihtiyaç duyulan proteinlerin üretilmesi için çeşitli gen ifade (ekspresyon) sistemleri geliştirilmiştir. Gen ifade sistemleri, yapısal biyolojiden *in vivo* çalışmalara kadar çeşitli yöntemlerde veya terapötik ajanlar olarak kullanılan proteinleri ifade etmek için kullanılır. Bir gen ifade sistemi, rekombinant

proteinlerin üretimi için gerekli olan üç farklı bileşenden oluşur. Bunlar tüm işlemlerin gerçekleştirildiği canlı bir sistem olan hücre, hücreye hedef geni aktarmak için kullanılan vektör ve ihtiyaç duyulan proteini kodlayan hedef geni de içeren vektöre yerleştirilecek olan gen ifade kasetidir.

Protein üretimi için çok çeşitli hücreler veya organizmalar kullanılmaktadır. Bu genel bakışta, en yaygın olarak kullanılan *Adenovirüs, Retrovirus, Lentivirus, Adeno-associated virüs, Bakülovirüs* gibi gen ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemler arasından bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS) protein üretimi için çeşitli virüs gen ürünlerinin kullanılabilmesi, ökaryotik bir ortam olması, insert büyüklüğü, güçlü gen promotörlerinin olması (*polh* ve *p10*), aşırı üretim, olgunlaşmamış genlerin (örneğin, cDNA'lar) yüksek oranda ifade edilmesi ve güvenilir olması özelliklerinden dolayı en çok tercih edilmektedir (Demirbag vd., 1998). Bu tezde kullanılan Bakülovirus ekspresyon vektör sistemi yaygın olarak kullanılan önemli bir vektör sistemidir (Luckow ve Summers, 1988; Summers, 2006; Yin vd., 2007).

Böcek virüsleri son zamanlarda DNA'dan önemli proteinlerin üretilmesinde faydalanılan ekspresyon vektörü olarak büyük önem taşımaktadır. Toksin, ilaç, besin maddesi gibi farklı ve çeşitli ürünleri kodlayabilen yabancı genler özellikle hücre kültüründe bakülovirüslerin replikasyonu için zorunlu olmayan viral genler yerine klonlanır ve bu sayede oldukça fazla miktarda hedef protein üretilir.

Yabancı genlerin ifadesi için geliştirilen bakülovirus ekspresyon vektör sistemi, (BEVS) diğer vektörlere göre önemli üstünlüklere sahiptir (Demirbağ vd., 1998). Bilim insanları tarafından bakülovirüslerin daha kullanışlı ve etkili ekspresyon vektörü haline getirilmesi ve virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması üzerine yapılan ve günümüzde devam ettirilmekte olan çalışmaları gelecekte biyoteknolojinin çok daha önemli bir materyali olmalarına yardımcı olacaktır.

Smith ve arkadaşları (1983), Pennock ve arkadaşlarının (1984) bakülovirüslerin ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmasına yönelik yaptıkları ilk çalışmalar, *Autographa californica nükleopolihedrovirüs* (AcNPV) kullanılarak *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde β-galaktozidazı ve β-interferonu üretmeleri üzerine yapılan çalışmalar olmuştur. Daha sonraki yıllarda ise bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi kullanılarak ekonomik, tıbbi, ve endüstriyel öneme sahip bakteriyal, viral, bitkisel, fungal, ve hayvansal kaynaklı çeşitli rekombinant proteinler fazla miktarda üretilmiştir. Günümüzde özellikle tıbbi alanda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda çeşitli

hastalıklara karşı yeni kinazlar, antijenler ve büyüme faktörleri üretilip yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Keus ve Vlak 1990). Yeni ilaçlar geliştirilmiş olup bu sayede yeni tedavi yöntemleri ortaya çıkarılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar sayesinde interlökin, insülin, immünoglobulinler, interferon gibi proteinler fazla miktarda üretilmiştir (Hasemonn ve Capra 1990). Endüstriyel öneme sahip olan çeşitli bitkisel proteinler bu sistemde yaygın olarak sentezlenmektedirler. Zirai mücadelede, zararlı böceklere karşı etkili olan bazı patojenik özelliğe sahip proteinler de bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde üretilerek, zirai mücadele ile olan çalışmalarda kullanılmaktadır (Martens vd., 1990).

Bakulovirus gen ekspresyon vektör sisteminin en önemli özelliği, p10 ve polihedral inklüzyon yapı matriks proteini (polihedrin) proteinlerini kodlayan genlerden (*p10 ve polh*) gelmektedir. Bu proteinler, enfekte olmuş hücrelerde virüs replikasyon siklusunun en geç safhasında fazlaca miktarda üretilirler. Polihedrin proteini, doğada virüs partiküllerini koruyan inklüzyon yapıların oluşumunda görev yapar (Demirbag vd,1998) Ayrıca polihedrin proteinine virüs partiküllerinin inklüzyon yapı içerisine paketlenmesinde de ihtiyaç duyulur. Polihedrine böceklerin ağız yolu ile enfeksiyonunda ihtiyaç duyulur. Fakat hücre kültüründeki virüs replikasyonunda ihtiyaç duyulmaz. Bu yüzden bu genleri kodlayan bölgeler çıkarılır ve yerlerine arzu edilen yabancı genler yerleştirilerek bakülovirüs ekspresyon vektör sistemleri geliştirilmektedir.

118L, tüm iridoviridlerde homologları olan bir gendir. Ancak CIV'de bu gen tarafından kodlanan proteinin fonksiyonu bilinmemektedir. *118L* geninin fonksiyonun aydınlatılması için genin ifadesinin gerçekleştirilmesi ve hedef proteine karşı antikor geliştirilmesi önemli bir basamağı oluşturmaktadır

Bu tezde, polimeraz zincir reaksiyonu ile 118L geni virüs genomundan çoğaltıldıktan sonra bakülovirüs gen ekspresyon vektör sistemi seçilerek, CIV'ye ait yapısal bir protein kodlayan 118L geninin fonksiyonunun aydınlatılmasına yardımcı olabilecek 118L proteinin bakülovirüs vektör sisteminde ifadesi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda *118L* geni pGEM- T easy ara vektörüne klonlanması yapıldı ve ardından *118L* Geninin pFastBacHT A transfer vektörüne klonlanması yapılarak transfer vektörü oluşturuldu. *118L* geni Bac-to-Bac bakülovirüs vektör sistemine aktarılarak rekombinant bakmidler oluşturuldu ve bakmid DNA'sının *Spodoptera frugiperda* (Sf9) böcek hücre kültürü hücrelerine transfeksiyonu ve gen ifadesi gerçekleştirilerek rekombinant proteinler yüksek miktarda üretildi.

Bakülovirüs gen ekspresyon vektör sisteminde yüksek miktarda üretilen rekombinant 118L proteini hedeflenen ~34 kDa büyüklüğündeki protein, bantta istenilen yerde görüntülendi. Bu tez çalışmasında $2x10^6$ hücre/ml enfekte hücre kültüründen 30 ml kullanarak 100 µg protein elde edildi. Elde edilen bu miktar bakteriyal sistemlerle karşılaştırıldığında düşük görülmektedir. Ancak, elde edilen protein antikor geliştirmede kullanılacağı için proteinin antijenik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda verim düşük olsada bakülovirüs sisteminde üretimin büyük önem taşıdığı tartışma götürmez bir durumdur. Çünkü bakülovirüs sisteminde üretilen proteinler proteinin doğal formuna benzer translasyon sonrası değişiklere sahip olmaktadır. Bu değişiklikler protein katlanmasında uygun katlanma olması, n-bağlı glikosilasyonun basit sialik asit olmaması, o-bağlı glikosilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, asilasyondur.

Saflaştırılan rekombinant protein kullanılarak antikor geliştirilmesi gerçekleştirildi (Antikor üretimi Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsünde Prof. Dr. Erkan YILMAZ tarafından). Antikor üretimi fara inokülasyonuyla sağlandı. Toplam 450 µg protein kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışma (3 fare, 3'er doz, 50 µg/doz) sonucunda hedef antikor olan anti-118 antikoru başarılı bir şekilde üretilmiş oldu. 118L proteini ve bu proteine karşı geliştirilen antikor kullanılarak gerçekleştirilen Western blot hibridizasyonu sonucunda antikorun bu proteine başarılı bir şekilde bağlandığı belirlenmiş oldu.

Sonuç olarak virüs yapı ve replikasyonunda 118L proteinin fonksiyonunun aydınlatılmasında kullanılabilecek 118L proteini ve bu proteine karşı kullanılabilecek antikor bu tez çalışmasında başarıyla elde edilmiştir.

5. SONUÇLAR

Tez kapsamında CIV'ye ait yapısal bir protein kodlayan *118L* geninin fonksiyonunun aydınlatılmasına yardımcı olabilmek için 118L proteinin bakülovirüs vektör sisteminde üretilmesi ve bu proteine karşı antikor oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1) CIV genom dizisinin analizi neticesinde *118L* geni için uygun primerler tasarlandı ve primerler kullanılarak *118L* geni başarılı bir şekilde virüs genomundan çoğaltıldı.
2) Elde edilen *118L* gen dizisi pGEMT- Easy ara vektörüne klonlanarak vektördeki baz dizilimleri sekans analiziyle doğrulandı.
3) Elde edilen *118L* geninin bakülovirüs ekspresyon vektör sistemine aktarılması için ara transfer vektörü olan pFastBacHT A'ya klonlanması gerçekleştirildi.
4) *118L* geni klonlanan transfer vektörü pFastBacHT A-118L klonlandıktan sonra *E. coli*'ye transfer edilerek transpozisyon ile bakmid genomuna dahil edildiler.
5) Hücre kültürü ortamında bakmid DNA *Spodoptera frugiperda 9 (Sf9)* hücrelerine virüs oluşturulması amacı ile transfekte edildi.
6) Transfeksiyon sonrası oluşan virüsler çoğaltıldı, protein üretimi sağlandı ve klonlanan *118L* genine ait ~34 kDa büyüklüğündeki 118L proteini bakülovirüs vektör sisteminde başarıyla ifade edildi.
7) Üretilen proteine karşılık anti-118L antikoru geliştirildi ve saflaştırılan protein ve üretilen anti-118L antikoru kullanılarak western blot hibridizasyonuyla her ikisinin hibridizasyonu doğrulandı.

6. ÖNERİLER

Bu tez sonucunda 118L proteini ve bu proteine karşı kullanılabilecek anti-118L antikoru başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylece CIV ile yapılabilecek pek çok çalışmaya temel teşkil edebilen iki molekül (118L proteini ve anti-118L antikoru) başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

1) Hazırlanan protein ve antikorlar kullanılarak virüsün replikasyonu, virüs enfeksiyonunun başlatılması gibi birçok olay aydınlatmaya yönelik araştırmalar yapılabilir.
2) Bu antikor virüs nötralizasyonu çalışmalarında kullanılabilir.
3) Antikor kullanılarak hedef proteinin virüs yapısında ki yeri immünoelektron mikroskobu ile tespit edilebilir.

7. KAYNAKLAR

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.

Bronkhorst, A., W., van Cleef, K., W., Vodovar, N., Ince, I., A., Blanc, H., Vlak, J., M., Saleh, M., C. ve van Rij, R., P., 2012. The DNA Virus Invertebrate Iridescent Virus 6 is A Target of The Drosophila RNAi Machinery, Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, 3604–3613, USA.

Barray, S. ve Devauchelle, G., 1987. Protein synthesis in cells infected by *Chilo iridescent virus*: Evidence for temporal control of three classes of induced polypeptides, Annales de l'Institut Pasteur/Virologie, 138, 253–261.

Chinchar, V.,G.,Hick, P., Ince, I.,A.,Jancovich, J.,K., Marschang, R.,Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.,B., Whittington, R., Williams, T.,et al.,2017. ICTV VirusTaxonomy Profile: Iridoviridae, Journal of General Vırology, 98, 890–891.

Chinchar, V., G., Essbauer, S, He, J., G., Hyatt, A. ve Myazaki, T., 2005. Iridoviridae. In:

Chinchar, V.G., Yu, K.H. ve Jancovich, J.K., 2011. The Molecular Biology of Frog Virus 3 and other Iridoviruses Infecting Cold-Blooded Vertebrates, Viruses, 3, 1959-1985.

Chinchar, V., G., Hick, P., Ince, I., A., Jancovich, J., K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T., B., Whittington, R., Williams, T., et al., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae, Journal of General Vırology, 98, 890–891.

Chinchar, V., G., Waltzek, T., B. ve Subramaniam, K., 2017. Ranaviruses and other members of the family Iridoviridae: Their place in the virosphere, Virology, 511, 259–271.

Cerutti, M. Ve Devauchelle, G., 1985. Characterisation and Localisation of CIV polpypeptides, Virology, 145, 123-131.

Cerutti, M., Cerutti, P. ve Devauchelle, G., 1989. Infectivity of vesicles prepared from Chilo iridescent virus inner membrane: Evidence for recombination between associated DNA fragments, Virus Research,12, 299–313.

D'Costa, S., M., Yao, H., J. ve Bilimoria, S., L., 2004. Transcriptional mapping in Chilo iridescent virus infections, Archives of Virology, 149, 723–742.

D'Costa, S., M., Yao, H., J. ve Bilimoria, S., L., 2001. Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells, Archives of Virology, 146, 2165–2178.

Delhon, G., Tulman, E., R., Afonso, C., L., Lu, Z., Becnel, J., J., Moser, B., A., Kutish, G., F. ve Rock, D., L., 2006. Genome of Invertebrate Iridescent Virus Type 3 (Mosquito İİridescent Virus), Journal of Virology, 80, 8439-8449.

Delius, H., Darai, G. ve Flugel, R., M., 1984. DNA analysis of Insect Iridescent Virus 6: Evidence for Circular permutation and Terminal Redundancy, Journal of Virology, 49, 609-614.

Delhon, G., Tulman, E., R., Afonso, C., L., Lu, Z., Becnel, J., J., Moser, B., A., Kutish, G., F. ve Rock, D., L., 2006. Genome of Invertebrate Iridescent Virus Type 3 (Mosquito İİridescent Virus), Journal of Virology, 80, 8439-8449.

Demirbag Z., Beldüz, A. O., ve Demir, İ. 1998. Baculovirus' ün ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması. Turkish Journal of Biology, *22*, 249-262.

Eaton, H., E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C. ve Brunetti, C., R.,2007. Comparative Genomic Analysis of The Family Iridoviridae: Re-annotating and Defining The Core Set of Iridovirus Genes, Virology Journal, 4, 11.

Fauquet, C., M., Mayo, M., A., Maniloff, J., Desselberger, U. ve Ball, L., A., 2005. Virus taxonomy: 8th report of the international committee on the taxonomy of viruses, Elsevier, 163–175, London.

Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A *Chilo Iridescent Virus* (CIV) from The Rice Stem Borer, Chilo suppressalis walker (Lepidoptera: Pyralidae), Applied Entomology and Zoology, 1, 69-72.

Goorha, R. ve Murti, K., G., 1982. The Genome of Frog Virus 3, An Animal DNA Virus, is Circularly Permuted and Terminally Redundant, Proceedings of the National Academy of Sciences, 79, 248-252.

Granoff, A., 1984. Frog Virus 3: A DNA Virus With An Unusual Life-Style, Progress in Medical Virology, 30, 187–198.

Hasemonn, C.A. ve Capra, J.D., 1990. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system, Proc. Natl. Acad. Sci, 87, 3942-3946.

Hernandez, O., Maldonado, G. ve Williams, T., 2000. An epizootic of patent iridescent virus disease in multiple species of blackflies in Chiapas, Mexico, Medical and Veterinary Entomology, 14, 458–462.

İnce İA, Özcan O, Ilter-Akulke AZ, Scully ED ve Özgen A, 2018. Invertebrate Iridoviruses: A Glance over the Last Decade. *Viruses*.;10,4,161.

Ince, I., A., Boeren, S., A., van Oers, M., M., Vervoort, J., J. ve Vlak, J., M., 2010. Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405, 253–258.

Ince, I., A., Özcan, K., Vlak, J., M. ve van Oers, M., M., 2013. Temporal Classification and Mapping of Non-Polyadenylated Transcripts of An Invertebrate Iridovirus, Journal of General Virology, 94, 187–192.

Ibarra, J., E. ve Del Rincon-Castru, M., C., 2008. Insect Vıruses Dıversıty, Bıology, And Use as Bioinsecticides, in International Commision on Tropical Biology and Natural Resources, [Eds. Kleber Del Claro, Oliveira, P. S., Rico-Gray, V., Ramirez, A., Barbosa, A. A. A., Ronet, A., Scarano, F. R., Consoli, F. L., Garzon, F. J. M., Nakajima, J. N., Costello, J. A., Sanpaio, M. V., Morris, M. Q. M. R., Rios, M. P., Ramirez, N., Junior, O. M., Macedo, R. H. F., Marquis, R. J., Martins, R. P., Rodrigues, S. C. ve Luttge, U., in Enqyclopedia of Life Support Systems (EOLXS) Developed under the Auspices of the UNESCO, EolssPublishers, Oxford, UK, [http://www.eolss.net] [Retrieved June 6,20081.

Jakob, N., J., Muller, K., Bahr, U. ve Darai, G., 2001. Analysis of The First Complete DNA Sequence of An Invertebrate Iridovirus: Coding Strategy of The Genome of Chilo Iridescent Virus, Virology, 2861, 82–196.

Jakob NJ ve Darai G. 2002. Molecular anatomy of Chilo iridescent virus genome and the evolution of viral genes. Virus Genes. 25, 3, 299-316.

King, A., M., Lefkowitz, E., Adams, M., J. ve Carstens, E., B., 2011. Virus Taxonomy:Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 6,193-210.

Kleespies, R., G., Tidona, C., A. ve Darai, G., 1999. Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range, Journal of Invertebrate Pathology, 73, 84–90.

Luckow, V.A. ve Summers, M.D., 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors, Bio/Tech, 6, 47-55.

Magrane, M. ve Consortium, U., 2011. UniProt Knowledgebase: A hub of integrated protein data, Database: the journal of biological databases and curation, Bar009.doi:10.1093/database/bar009

Martens, J.W.M., Honee, G., Zuidema, D., van Lent, J.W.M., Visser, B. ve Vlak, J.M., 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells, Appl. Environ. Microbial., 56, 2764-2770.

Ozsahin, E., van Oers, M. M., Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z., 2018. Protein-protein interactions among the structural proteins of Chilo iridescent virus, J Gen Virol, 99,6, 851-859.

McMillan, N., A., Davison, S. ve Kalmakoff, J., 1990. Comporisan of The Genomes of Two Sympatric Iridescent Viruses , Archives of Virology, 114, 277-284.

Pennock, G.D., Shoemaker, C. ve Miller, L.K., 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector, Molecular Cell Biology., 4, 399-406.

Song,W., J., Qin, Q., W., Qiu, J., Huang, C., H., Wang, F. ve Hew, C., L., 2004. Functional Genomics Analysis of Singapore Grouper Iridovirus: Complete Sequence Determination and Proteomic Analysis, Journal of Virology, 78, 12576–12590.

Smith, G.E., Summers, M.D. ve Fraser, M.J., 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, Molecular Cell Biology., 12, 2156-2165.

Summers, M.D., 2006. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector system and viral pesticides, Adv. Virus Res., 68, 3-73.

Tsai, C., T., Lin, C., H. ve Chang, C., Y., 2007. Analysis of Codon Usage Bias and Base Compositional Constraints in Iridovirus Genomes, Virus Research., 126, 196-206.

Tripier-Darcy, F. ve Nemrut, M. V., 2007. Cryodecapage d'un virus, Ie FV3 (frog virüs 3): structure fine de la capside et organisation interne, Biology of the Cell, 48, 17a.

URL-1,http://trevorwilliams.info/Iridovirus.htm. 25 Haziran 2020.

URL-2, ViralZone:www.expasy.org/viralzone. 10 Ocak 2020.

URL-3, https://www.addgene.org/vector-database/2710/ 12 Nisan 2021

URL-4, https://docplayer.biz.tr/54092924-Hucre-transfeksiyonu.html, 07 Ocak 2020

Vlak, J.M. ve Keus, F.J.A., 1990. Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines. Viral Vaccines, Advances in Biotechnological Processes, WhileyLiss, New York.

Wang, S., Huang, X., Huang, Y., Hao, X., Xu, H., Cai, M., Wang, H. ve Qin, Q., 2014. Entry of A Novel Marine DNA Virus, Singapore Grouper Iridovirus, into Host Cells Occurs via Clathrin-Mediated Endocytosis and Macropinocytosis in A Ph-Dependent Manner, Journal of Virology, 88, 13047–13063.

Ward, V. K. ve Kalmakoff, J., 1987. Physical Mapping of The DNA Genome of Insect Iridescent Virus Type 9 From Wiseana spp. Larvae, Virology, 160, 507-510.

Webby, R., J. ve Kalmakoff, J., 1999. Comparison of The Major Capsid Protein Genes, Terminal Redundancies and DNA-DNA homologies of Two New Zeland Iridoviruses, Virus Research, 59, 179-189.

Whitley, D., S., Yu, K., Sample, R., C., Sinning, A., Henegar, J., Norcross, E. ve Chinchar, V., G., 2010. Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro, Virology, 405, 448–456.

Williams, T. ve Thompson, I., P., 1995. Fatty-Acid Profiles of İnvertebrate Iridescent Viruses, Archives of Virology, 161, 1-7.

Williams, T., 1998. Ivertebrate Iridescent Viruses, In The Insect Viruses, Edited by e.L. K. Miller and L. A. Ball., New York: Plenum Press, 31-68.

Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V., G., 2005. A Decade of aAdvances in Iridovirus Research, Advances in Virus Research,65, 173-248.

Williams, T.,2008. Natural invertebrate hosts of iridoviruses (Iridoviridae),Neotropical Entomology,37, 615–632.

Williams, T. ve Ward, V.K., 2010. Insect Virology, Sassan Asgari ve Karyn Johnson Ed., Caister Academic Press, Australia.

Willis, D., B., ve Granoff, A., 1980. Frog Virus 3 DNA is Heavily Methylated at CpG Sequences, Virology, 107, 250-257.

Yan, X., Yu, Z., Zhang, P., Battist, A., J., Holdaway, H., A., Chipman, P., R., Bajaj, C., Bergoin, M., Rossmann, M., G. ve Baker, T., S., 2009. The Capsid Proteins of A Large,Icosahedral Dsrna Virüs, Journal of Molecular Biology, 385, 1287- 1299.

Yin, J., Li, G., Ren, X. ve Herler, G., 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, J. Biotech., 127, 335-347.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim hayatına Mimar Sinan İlköğretim Okulunda başladıktan sonra, lise eğitimini Trabzon Fatih Lisesi'nin sayısal bilimler alanında 2012 yılında tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Üniversite bünyesinde bulunan Yabancı Diller Yüksekokulu'nda bir yıl boyunca İngilizce dil eğitimi aldıktan sonra, 2017 yılında lisans eğitimini bölüm ikincisi olarak tamamladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.