

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO* IRIDESCENT VİRÜS'E AİT EKZONÜKLEAZ GENİNİN (012L)
MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Yeşim AKTÜRK DİZMAN

**EYLÜL 2014
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO IRIDESCENT* VİRÜS'E AİT EKZONÜKLEAZ GENİNİN (012L)
MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

Yeşim AKTÜRK DİZMAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTOR (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.08.2014

Tezin Savunma Tarihi : 22.09.2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalında
Yeşim AKTÜRK DİZMAN tarafından hazırlanan

CHILO IRIDESCENT VİRÜS'E AİT EKZONÜKLEAZ GENİNİN (012L)
MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL ANALİZİ

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 26/08/ 2014 gün ve 1567 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Üye : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Üye : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
Üye : Doç. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU
Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

"*Chilo iridescent* virüs'e ait ekzonükleaz geninin (012L) moleküler ve fonksiyonel analizi" isimli bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda 'Doktora Tezi' olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlüklerin aşılmasında beni yönlendiren, her türlü desteği ve imkanı sağlayarak değerli bilgilerinden yararlandırım hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na, laboratuarda maddi manevi imkanlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden dolayı Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU'na, çalışmalarım ile yakından ilgilenen ve yardımlarda bulunan Arş. Gör. Emine ÖZŞAHİN'e ve Mehtap DANIŞMAZOĞLU'na, bu çalışmayı yapabilmem için desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Vagif ATAMOV'a ve beni yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olan tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini daima üzerimde hissettiğim, beni yetiştiren ve bugün olduğum yeri borçlu olduğum Annem, Babam ve kardeşlerime ve tez süresince en sıkıntılı zamanlarımda her zaman yanımda olan eşim Serdar DİZMAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Maddi desteklerinden dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi (KTÜ-BAP, Proje No: 2008.111.004.2)'ne, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, Proje No: 107T916)'na teşekkür ediyorum.

Yeşim AKTÜRK DİZMAN

Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum "*Chilo* iridescent virüs'e ait ekzonükleaz geninin (012L) moleküler ve fonksiyonel analizi" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

22/09/2014

Yeşim AKTÜRK DİZMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Iridoviridae Familyası.....	2
1.2.1. İridovirüslerin Yapı ve Kompozisyonu	4
1.2.2. İridovirüslerin Genom Özellikleri ve Replikasyonu.....	5
1.2.3. İridovirüslerin Gen İfadesi ve Regülasyonu	10
1.2.4. <i>Chilo</i> Iridescent Virüs (CIV)	11
1.3. Nükleazlar	13
1.4. Çalışmanın Amacı.....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	16
2.1. Çalışmada Kullanılan Böcek Hücre Kültürü ve Virüs.....	16
2.2. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini	16
2.3. CIV 012L Açık Okuma Zincirinin Biyoinformatik Analizi	17
2.4. CIV Ekzonükleaz (012L) Geninin Transkripsiyonel Analizi	17
2.4.1. Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi.....	17
2.4.1.1. Virüs ile Enfekte Olmuş Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu	17
2.4.1.2. İzole Edilen RNA'ların DNaz I ile Muamele Edilmesi.....	18
2.4.1.3. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	18
2.4.2. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi	19
2.5. Transkripsiyon Başlangıç Noktasının Tespit Edilmesi.....	20
2.5.1. cDNA'nın 5' Ucunun Çoğaltılması (5'-RACE)	20
2.5.2. Elektrokompotent <i>Escherichia coli</i> DH5α Hücrelerinin Hazırlanması ve Elektrotansormasyon	23

2.5.3.	Plazmid DNA İzolasyonu ve Pozitif Klonların Seçimi	24
2.6.	CIV 012L Geninin Promotor Bölgesinin Analizi	24
2.6.1.	Viral Genomik DNA İzolasyonu	25
2.6.2.	Muhtemel Promotor Bölgelerinin Tayini ve Klonlanmaları.....	26
2.6.3.	Transfeksiyon.....	30
2.6.4.	Lusiferaz Proteinlerinin İzolasyonu ve Luminometrede Ölçülmesi	31
2.7.	CIV 012L Geninin Fonksiyonel Analizi.....	31
2.7.1.	Çalışmada Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler.....	31
2.7.2.	CIV 012L Geninin PCR ile Çoğaltılması	32
2.7.3.	CIV 012L Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	33
2.7.4.	CIV 012L Geninin <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde Ekspresyonunun Gözlenmesi.....	34
2.7.5.	Proteinin Saflaştırılması.....	34
2.7.5.1.	Ni-NTA Affinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırma	35
2.7.5.2.	Western Hibridizasyonu.....	35
2.7.6.	Enzimin Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	36
2.7.6.1.	Ekzonükleaz Aktivitesinde Kullanılacak Sentetik Primer Substratlarının Belirlenmesi	36
2.7.6.2.	Sentetik primer substratlardan Çift Zincir DNA Substratlarının Hazırlanması	37
2.7.6.3.	3'-OH Ucundan Biyotin İşaretli Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması	38
2.7.6.4.	Lineer Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	39
2.7.6.5.	Lineer Tek Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	39
2.7.6.6.	5'-OH Ucundan Biyotin İşaretli Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 3' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması	39
2.7.7.	Enzimin Endonükleaz Aktivitesinin Araştırılması	40
2.7.7.1.	Endonükleaz Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi.....	40
2.7.7.2.	Optimum Bir ve İki Değerlikli Katyon Derişiminin Belirlenmesi	40
2.7.7.3.	pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi	41
2.7.7.4.	Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi	42
2.7.7.5.	EDTA'nın Enzim Aktivitesine Etkisi	42
3.	BULGULAR.....	43

3.1.	CIV 012L Geninin Biyoinformatik Analizi	43
3.2.	CIV 012L Geninin Transkriptomik Analizi	44
3.2.1.	Transkripsiyon Kinetiğinin ve Sınıfının Belirlenmesi	44
3.2.2.	CIV 012L Geninin Translasyona Uğramayan 5' Ucunun Belirlenmesi.....	45
3.3.	CIV 012L Geninin Promotor Bölgesinin Belirlenmesi	46
3.4.	CIV 012L Geninin Fonksiyonel Analizi	47
3.4.1.	Genin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	47
3.4.2.	pET+exo Vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu ve Ekspresyonun Gözlenmesi	49
3.4.3.	CIV 012L Proteininin Saflaştırılması	50
3.4.4.	Enzimin Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	51
3.4.4.1.	Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	51
3.4.4.2.	Tek Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	52
3.4.4.3.	Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak Enzimin 3' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması.....	53
3.4.5.	CIV 012L Proteininin Endonükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi	53
3.4.5.1.	Endonükleaz Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi.....	53
3.4.5.2.	Optimum Bir ve İki Değerlikli Katyon Derişiminin Belirlenmesi	54
3.4.5.3.	Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	56
3.4.5.4.	Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Belirlenmesi.....	57
3.4.5.5.	EDTA'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi	58
4.	TARTIŞMA	59
5.	SONUÇLAR.....	64
6.	ÖNERİLER.....	66
7.	KAYNAKLAR	67
8.	EKLER	75

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VİRÜS'E AİT EKZONÜKLEAZ GENİNİN (012L)
MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL ANALİZİ

Yeşim AKTÜRK DİZMAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

2014, 74 Sayfa, 2 Sayfa Ek

Chilo iridescent virüs (CIV) *Iridoviridae* familyasına ait bir böcek virüsü olup, zararlı böcekler arasında geniş konak spektrumuna sahiptir. CIV'nin moleküler biyolojisi hakkında literatürde kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Bu eksikliğin giderilmesine katkıda bulunmak amacıyla bu çalışmada biyoinformatik analizlere göre ekzonükleaz fonksiyonuna sahip bir gen olarak gösterilen CIV'ye ait 012L açık okuma zincirinin (ORF) transkripsiyonel ve fonksiyonel analizi gerçekleştirilmiştir. DNA ve protein sentez inhibitörleri varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen enfeksiyonlar, 012L geninin “en erken” grubu gen olarak ifade edildiğini gösterdi. Gene ait zamana bağlı transkripsiyon profili ise transkripsiyonun, enfeksiyondan sonra 0. ve 1. saatler arasında başladığını ortaya koydu. Genin translasyona uğramayan 5' yukarı bölgesinin, translasyon başlangıç noktasına göre -30. nükleotidde başladığı belirlendi. Ayrıca ikili lusiferaz deneyleri ile gerçekleştirilen promotor analizleri, genin muhtemel promotor bölgesinin translasyon başlangıç noktasının yukarısındaki -20. ile -10. nükleotidler arasında olduğunu gösterdi. Fonksiyonel analiz kapsamında ise, 012L proteininin aktivitesi *in vitro* sistemde araştırıldı. 3' ucu biyotin işaretli oligonükleotitlerin ve lineer çift zincir DNA'nın substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda, CIV 012L proteininin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca CIV 012L proteininin, süper sarmal plazmit DNA'sını dairesel yapıya, dairesel yapıyı da lineer yapıya dönüştüren güçlü bir endonükleaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Chilo* iridescent virüs, Ekzonükleaz, Transkripsiyonel analiz, Promotor, Fonksiyonel analiz, Endonükleaz

PhD. Thesis

SUMMARY

MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF *CHILO* IRIDESCENT VIRUS
EXONUCLEASE GENE (012L)

Yeşim AKTÜRK DİZMAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program

Supervisor: Assoc. Prof. Remziye NALÇACIOĞLU

2014, 74 Pages, 2 Pages Appendix

Chilo iridescent virus (CIV), an insect virus belongs to the *Iridoviridae* family, is highly pathogenic on important pest insects. Unfortunately, information about the molecular aspects of CIV is not enough so far. Therefore, currently, we determined the transcriptional pattern, promotor region and function of CIV 012L gene. It was determined that the CIV 012L ORF has exonuclease activity according to bioinformatics analysis. The structure and transcriptional regulation of the CIV 012L gene is investigated in this study. Infection of cells in the presence or absence of Ara-C or cycloheximide showed that CIV 012L is transcribed as an immediate-early gene. Time course transcription of the gene showed that the transcription starts between 0 h p.i. and 1 h p.i. after infection. 5' RACE analysis showed that the transcription initiation site is located at 30 nucleotides upstream of the translational start codon. In a Dual luciferase reporter assay, It is clearly shown that sequences between -20 and -10 relative to the transcription start site have key promoter activity for CIV 012L gene. To test whether CIV exonuclease protein is active, functional analysis was done. Therefore, the activity of CIV exonuclease protein was analyzed *in vitro*. CIV 012L protein confirmed that this viral protein is a functional 5'-3' exonuclease that digests 3'-biotin-labelled oligonucleotides and linear double-stranded DNA molecules from their 5'-termini in a highly processive manner. It was determined that CIV 012L protein has also a potent endonuclease activity *in vitro* and converted supercoiled plasmid DNA into the open circular form and then open circular form into linear form.

Key Words: *Chilo* iridescent virus, Exonuclease, Transcriptomic analysis, Promoter, Functional analysis, Endonuclease

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Omurgasız iridovirüsü ile enfekte olmuş <i>Galleria mellonella</i> larvası.....	3
Şekil 2.	İridovirüslerin filogenetik analizi..	4
Şekil 3.	İridovirus yapısının şematik gösterimi.....	5
Şekil 4.	İridovirüs genomunun “Terminal Redundansi” özelliği.....	7
Şekil 5.	İridovirüs ile enfekte olmuş <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21) hücrelerinde virüsün sitoplazmik görünümü.....	8
Şekil 6.	<i>Frog virüs 3</i> (FV-3) DNA'sının replikasyon modeli.....	9
Şekil 7.	İridovirüslerde transkripsiyonun modeli.....	11
Şekil 8.	SPC-BM-36 hücrelerinin CIV ile inhibitörler varlığında enfeksiyonunun gösterimi.....	19
Şekil 9.	5'-RACE analizinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 10.	CIV 012L geninin lusiferaz işaret geni önüne klonlanacak potansiyel promotor bölgelerinin gösterimi	28
Şekil 11.	CIV 012L geninin amino asit sırasının belirlenen korunmuş bölgeleri.....	43
Şekil 12.	CIV 012L geninin zamana bağlı transkripsiyonunun RT-PCR sonucu.....	44
Şekil 13.	CIV 012L geninin transkripsiyon sınıfını gösteren RT-PCR sonucu.	45
Şekil 14.	CIV 012L geni transkriptinin 5' translyasyona uğramayan bölgesi.....	46
Şekil 15.	CIV 012L geninin promotor analizi.....	47
Şekil 16.	CIV 012L geninin pJET1.2/blunt vektörüne klonlanması.....	48
Şekil 17.	CIV 012L geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanması.....	49
Şekil 18.	CIV 012L proteininin <i>E.coli</i> BL21 hücrelerinde ekspresyonunun SDS-PAGE analizi	50
Şekil 19.	Saflaştırılan CIV 012L proteininin analizi.....	51
Şekil 20.	Çift zincir lineer DNA kullanılarak 5' ekzonükleaz aktivitesinin analizi	52
Şekil 21.	Tek zincir lineer DNA kullanılarak 5' ekzonükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi	52
Şekil 22.	Enzimin 3' ekzonükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi	53
Şekil 23.	Endonükleaz aktivitesinin zamana bağlı değişimi	54
Şekil 24.	Mg ⁺² derişiminin enzim aktivitesine etkisi	55
Şekil 25.	Mn ⁺² derişiminin enzim aktivitesine etkisi	55
Şekil 26.	Tek değerli iyon derişiminin (NaCl ve KCl) enzim aktivitesine etkisi.....	56
Şekil 27.	pH'in enzim aktivitesine etkisi	57

Şekil 28. Enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi	58
Şekil 29. EDTA'nın enzim aktivitesine etkisi.....	58
Şekil 30. Promotor bölgesi analizinde kullanılan 200 bp'lik bölgenin gösterimi	62

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Genomu dizin analizi yapılmış İridovirüsler.....	6
Tablo 2. Promotor plazmitlerini oluşturmak için kullanılan primerler	30
Tablo 3. Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları	32
Tablo 4. Ekzonükleaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan DNA substratları	37
Tablo 5. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan çift zincir DNA substratları	38
Tablo 6. Optimum Mg ⁺² , Mn ⁺² , Na ve K değerinin belirlenmesinde kullanılan divalent ve monovalent iyonlara ait derişimler	41
Tablo 7. Optimum pH değerinin belirlenmesinde kullanılan pH aralıkları.....	41

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
Ara-C	: Sitozin β -D-arabino-furanozit
BSA	: Sığır serum albumini
Cyc	: Sikloheksimit
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
cDNA	: Mesajcı ribonükleik asitten sentezlenmiş deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	: İki Kere Damıtılmış Su
DH5 α	: <i>Escherichia coli</i> 'nin Bir Alt Türü
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal Bovine serum
IPTG	: İzopiripil beta-D-tiyogalaktosid
5' RACE	: cDNA'nın uçlarının rastgele çoğaltılması
5' UTR	: Tranlasyona uğramayan 5' bölge
kbp	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
ORF	: Açık okuma zinciri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: H iyon konsantrasyonu
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TBE	: Tris-borik asit-etilendiamintetraasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
UV	: Ultraviyole
vd.	: ve diğerleri
X-Gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galakto-piranosid

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Böcek virüsleri, çeşitli böceklerden izole edilmiş ve o böceklerde hastalık oluşturan veya böceklerin ölümüne sebep olan biyolojik varlıklardır. Böcek virüslerinin etkili ve hedefi sınırlı biyolojik kontrol ajanları olarak bilinmeleri, önemli proteinlerin üretildiği gen ekspresyon vektör sistemlerini oluşturmaları, insan sağlığını tehdit eden virüslerin enfeksiyon mekanizmalarının anlaşılmasında model ve gen tedavisinde gen transfer vektörü olarak kullanılmaları bilim adamlarının böcek virüslerini çalışmalarında önemli etkenler olmuştur. Özellikle günümüzde, hızla artan hastalıklara karşı kullanılacak ilaçların geliştirilmesinde, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik, viral ve fungal genlerin, virüse ait gen ekspresyon sisteminde ifade edilmesinde virüsler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ikonomou vd., 2003; Jarvis, 2003; Stanbridge vd., 2003). Dünyanın birçok ülkesinde böcek virüsleri üzerinde yoğun biyoteknolojik araştırmalar yapılırken ve birçok biyoteknolojik ürün kullanıma sunulurken, maalesef ülkemiz bu konuda oldukça geri kalmıştır.

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü doğal olarak veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. Metabolik aktiviteler ve çevresel faktörler (UV ışığı gibi), DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilmektedir. Bu değişimler yararlı olabileceği gibi, çoğunlukla ölümcül sonuçlara neden olabilecek kadar zararlı da olabilirler. Bu yüzden, bütün canlı hücreleri, evrim süreçleri boyunca nesillere değişmeden aktarılması gereken DNA molekülünü korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu koruma mekanizmalarından biri nükleazlar ile yapılanıdır. Nükleazlar, ekzonükleazlar ve endonükleazlar şeklinde sınıflandırılabilir. Endonükleazlar bir nükleik asit zincirindeki fosfodiester bağımlı kesen enzimlerdir. DNA replikasyonu ve modifikasyonunda görev yapan ekzonükleazlar ise, nükleik asit zincirinin 5' ya da 3' ucundan nükleotitleri tek tek uzaklaştırırlar.

İridovirüs, bakülovirüs, entomopoksvirüs gibi bazı virüsler ekzonükleaz geni içeren önemli böcek virüsü gruplarıdır (Bawden vd., 2000; Jakob vd., 2001). Çoğu DNA virüslerinde ekzonükleaz geninin yokluğu nedeni ile metabolik aktiviteler ve çevresel faktörlerin vermiş olduğu genomik zarar tamir edilememekte ve bu durum virüsün ya mutasyona uğramasına ya da yok olup gitmesine neden olmaktadır.

Chilo iridescent virüs (CIV), ekzonükleaz genini (012L) ihtiva eden *Iridoviridae* familyası mensubu şanslı böcek virüslerinden biridir. CIV aynı zamanda “*Insect iridescent virüs type-6*” olarak da bilinir. Ekonomik öneme sahip böceklerde enfeksiyona neden olan CIV, *Iridovirus* cinsinin tip türüdür. CIV Japonya’da Fukaya ve Nasu (1966) tarafından bir lepidopter olan *Chilo suppressalis* (Asya pirinç deleni) böceğinden izole edilmiştir.

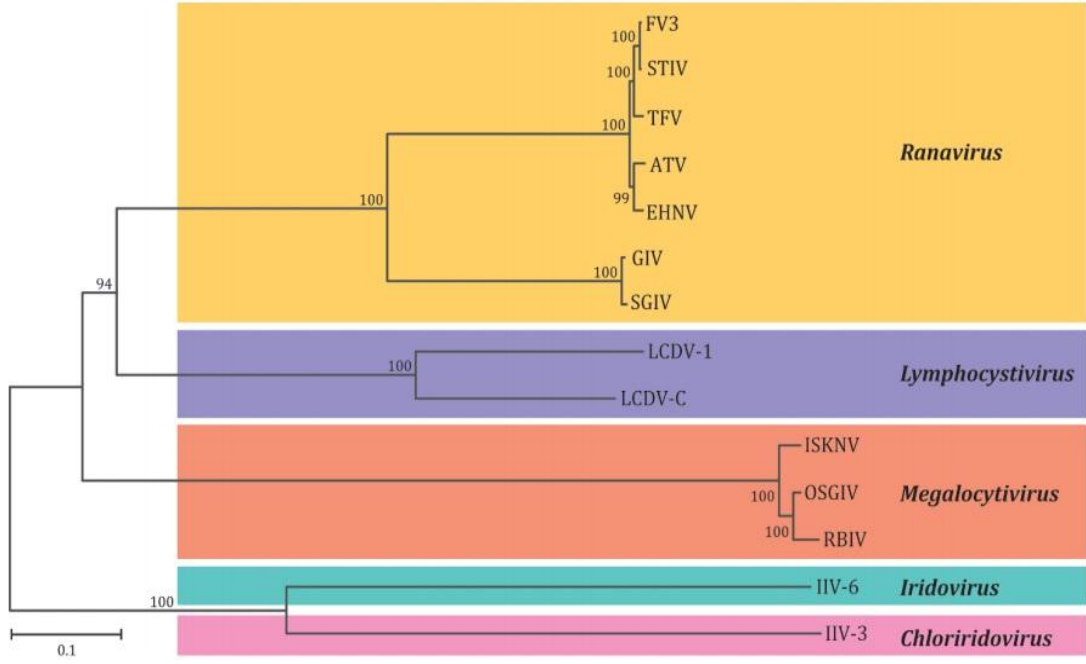
1.2. *Iridoviridae* Familyası

Iridoviridae familyası, çok sayıda omurgalı ve omurgasız konaklardan izole edilmiş, konak sitoplazmasında replike olan, “ikozahedral” yapılı ve çift zincir DNA genomlu virüsleri kapsayan bir familya olarak 1976 yılında tanımlanmıştır (Fenner, 1976). *Iridoviridae* kelimesi bu familyaya ait, omurgasız konaklardan izole edilen virüslerin çoğunluğunun ağır olarak enfekte ettikleri böceklerde oluşturdukları mavi-yeşil karışımı renk dolayısı ile kullanılmıştır. Bu virüsler ile ağır olarak enfekte olmuş böceklerde mavi-yeşil karışımı, ışık vurdukça parlayan bir renk oluşmaktadır. Dolayısı ile bu familyaya, gökkuşağı gibi rengi olan anlamındaki İngilizce “Iridescence” kelimesinden hareketle “*Iridoviridae*” adı verilmiştir. Omurgalı iridovirüslerinde ise böyle bir renk oluşturma söz konusu değildir (Williams, 1996). Şekil 1’de omurgasız iridovirüsü enfeksiyonu nedeni ile tüm vücudu mavi-yeşil renge dönüşmüş *Galleria mellonella* larvası görülmektedir. Mavi-yeşil rengin oluşumu ancak ağır enfeksiyonlarda tespit edilebilmektedir. Ağır enfekte olmayan larvalarda ise renk, enfekte olmamış kontrol larvaların rengine kıyasla belirgin şekilde beyazlaşmaktadır.



Şekil 1. Omurgasız iridovirüsü ile enfekte olmuş *Galleria mellonella* larvası. Virüs ile enfekte olmuş larva (altta) enfekte olmamış larvadan görünümünden dolayı kolayca ayırtedilebilmektedir (URL-1, 2014)

Virüslerin sınıflandırılmasını yapan ve uluslararası bir kuruluş olan “Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi” (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) tarafından yapılan son açıklamalara göre bugün *Iridoviridae* familyası altında *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* ve *Megalocytivirus* olmak üzere 5 cins bulunmaktadır (Chinchar vd., 2011; King vd., 2011) (Şekil 2). Bu sınıflandırma, virion büyüklüğü, konak spektrumu, genomun GC içeriği ve major kapsid proteini (MCP) göz önünde bulundurularak oluşturulan filogenetik analize göre yapılmıştır. *Iridovirus* (örnek tür: *Chilo* iridescent virüs) ve *Chloriridovirus* (örnek tür: *Mosquito* iridescent virüs) cinsleri omurgasızları enfekte eden virüsleri içermektedir ve *Chilo* iridescent virüs (CIV), omurgasız iridovirüsleri ile ilgili çalışmalarda model olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Iridovirus* cinsi 11 tane belirsiz tür içermektedir. Halen bu virüslerin bu cinse dahil edilebilmesi için yeteri kadar bilgi mevcut değildir (Asgari ve Johnson, 2010). Diğer cinslere ait virusler ise amfibiler, balıklar ve sürüngenler gibi soğukkanlı omurgalıları enfekte etmektedir. İridovirüsler için genel olarak model teşkil edecek birçok çalışma amfibileri enfekte eden *Ranavirus* cinsine ait *Frog virüs 3* (FV-3) üzerinde gerçekleştirilmiştir.



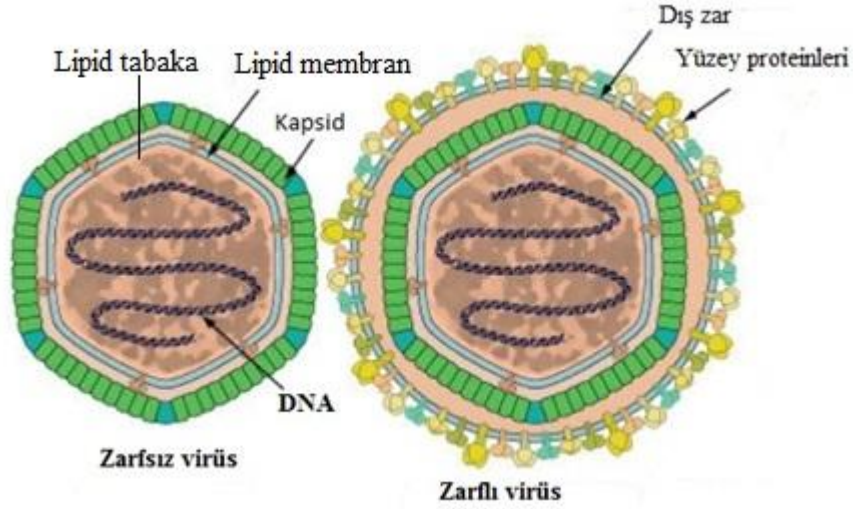
Şekil 2. İridovirüslerin filogenetik analizi. IIV-6, *Chilo iridescent virüs* (Jakob vd., 2001); IIV-3, *Aedes taeniorhynchus iridescent virüs* (Delhon vd., 2006); ATV, *Ambystoma tigrinum stebbensi virüs* (Jancovich vd., 2003); TFV, *Tiger frog virüs* (He vd., 2002); FV3, *Frog virüs 3* (Tan vd., 2004); SGIV, *Singapore grouper iridovirüs* (Song vd., 2004); GIV, *Grouper iridovirüs* (Tsai vd., 2005); STIV, *Soft-shelled turtle iridovirüs* (Huang vd., 2009); LCDV-C, *Lymphocystis disease virüs* Çin izolatu (Zhang vd., 2004); LCDV-1, *Lymphocystis disease virüs-1* (Tidona ve Darai, 1997); ISKNV, *Infectious spleen and kidney necrosis virüs* (He vd., 2001); RBIV, *Rock bream iridovirüs* (Do vd., 2004); OSGIV, *Orange-spotted grouper iridovirüs* (Lü vd., 2005); EHN, *Epizootic hematopoietic necrosis virüs* (Jancovich vd., 2010). Bu şekil Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (ICTV)'nin 9. raporundan alınmıştır (King vd., 2011).

1.2.1. İridovirüslerin Yapı ve Kompozisyonu

İridovirüslerde virion çapı 120-300 nm arasında değişmektedir. Bununla birlikte, virion çapı 350 nm'ye ulaşanlar da mevcuttur. İridovirüsler Nükleopolihedrovirüsler (NPV), Granulovirüsler (GV), Sitoplazmik Polihedrovirüsler (CPV) ve Entomopoksvirüsler'den (EPV) farklı olarak koruyucu bir protein matriks içine gömülü değildir (Williams, 1998).

İridovirüsler ikozahedral simetriye sahiptir. Virüsün yapısında sırası ile en içte proteinler ile kompleks oluşturmuş DNA, bunları çevreleyen yaklaşık 4 nm kalınlığında lipid tabaka ve bu tabakayı da çevreleyen protein yapıdaki kapsid tabakası bulunmaktadır (Şekil 3). Kapsid proteini 50 kDa civarında olup virüsün toplam proteinlerinin % 45'ini

oluşturmaktadır. Bazı iridovirüslerde kapsit örtüyü çevreleyen bir zarf bulunur. Bu zarf genellikle hücre kültüründe çoğalan iridovirüslerde virüsün hücreden tomurcuklanma yöntemi ile ayrılması durumunda kazanılmaktadır (Williams, 1998; Chinchar vd., 2005; Williams vd., 2005).



Şekil 3. İridovirus yapısının şematik gösterimi (URL-3, 2014)

Lipid tabaka, kapsid tabakasının iç kısmını kaplar (Constantino vd., 2001). Son yıllarda *Iridovirus* cinsine ait olan CIV'nin kapsidi üzerine yapılan cryo-elektron mikroskobu ve üç boyutlu görüntüleme çalışmaları, virion çapının maksimum 185 nm olduğunu ve virionun yüzeyinde fibrillerin bulunduğunu ortaya koymaktadır (Yan vd., 2009). Ayrıca bu çalışmada kapsidin yapısında MCP proteininin yanı sıra başka proteinlerin de olduğu belirtilmektedir. "Finger" protein, "zip" protein, pentamerik kompleks ve anchor proteinlerin oluşturduğu kompleks, viral kapsid yapısını meydana getirmektedir (Yan vd., 2009).

1.2.2. İridovirüslerin Genom Özellikleri ve Replikasyonu

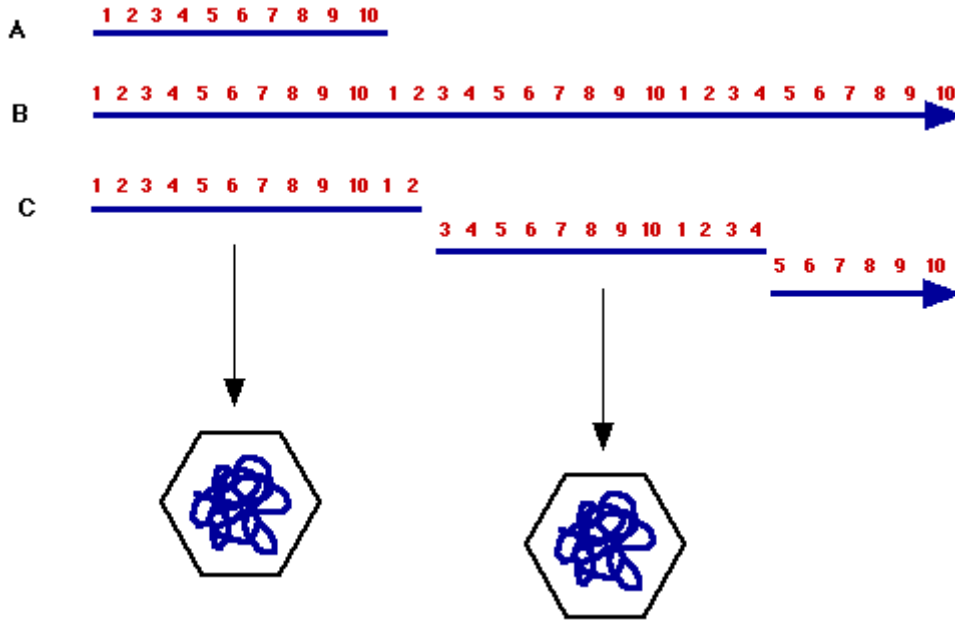
İridovirüsler 102-212 kbp büyüklüğünde lineer çift zincirli DNA genomuna sahiptirler (Jancovich vd., 2011). Şimdiye kadar 23 iridovirüsün genomu tamamen dizin analizi yapılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Genomu dizini analizi yapılmış İridovirüsler

Cins	Tür ^a	Genom Büyüklüğü (bp)	Gen Bankası numarası
<i>Iridovirus</i>	IIV-9	206,791	GQ918152
	IIV-6	212,482	AF303741
	IIV-22	197,700	NC_023615
	IIV-25	204,815	NC_023613
	IIV-30	198,533	HF920636
	IIV-31	220,222	NC_024451
<i>Chloriridovirus</i>	IIV-3	191,132	DQ643392
<i>Lymphocystivirus</i>	LCDV-1	102,653	L63545
	LCDV-C	186,250	AY380826
<i>Ranavirus</i>	TFV	105,057	AF389451
	ATV	106,332	AY150217
	FV3	105,903	AY548484
	STIV	105,890	EU627010
	EHNV	127,011	FJ433873
	SGIV	140,131	AY521625
	GIV	139,793	AY666015
	RGV	105,791	JQ654586
<i>Megalocytivirus</i>	ISKNV	111,362	AF371960
	RBIV	112,080	AY532606
	RSIV	112,414	BD143114
	OSGIV	112,636	AY894343
	TRBIV	110,104	GO273492
	LYCIV	111,767	AY779031

^aIIV-9, *Invertebrate iridovirus type 9* (Wiseana iridovirus); IIV-6, *Invertebrate iridovirus type 6* (*Chilo* iridovirus); IIV-3, IIV-22, *Invertebrate iridovirus type 22*; IIV-25, *Invertebrate iridovirus type 25*, IIV-30, *Invertebrate iridovirus type 30*; IIV-31, *Invertebrate iridovirus type 31*; *Invertebrate iridovirus type 3* (mosquito choriridovirus); LCDV-1, *Lymphocystis disease virüs 1*; LCDV-C, *Lymphocystis disease virüs - Çin*; TFV, *Tiger frog virüs*; ATV, *Ambystoma tigrinum virüs*; FV3, *Frog virüs 3*; STIV, *soft-shelled turtle iridovirüs*; EHNV, *Epizootic haematopoietic necrosis virüs*; SGIV, *Singapore grouper iridovirüs*; GIV, *grouper iridovirüs*; RGV, *Rana grylio iridovirüs*; ISKNV, *Infectious spleen and kidney necrosis virüs*; RBIV, *rock bream iridovirüs*; RSIV, *red seabream iridovirüs*; OSGIV, *orange spotted grouper iridovirüs*; TRBIV, *turbot reddish body iridovirüs*; LYCIV, *large yellow croaker iridovirüs*.

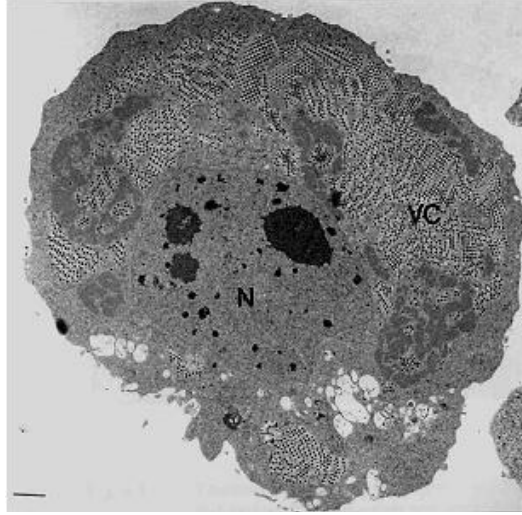
Genom, omurgasız iridovirüslerde omurgalılarınkine göre daha büyüktür (Kelly, 1985; Williams, 1998). İridovirüs genomu karakteristik olarak uç kısımlarında bazı genlerin tekrarlarını (terminal redundansi) içerir (Goorha ve Murti, 1982; Willis ve Granoff, 1985) Bu özellik ökaryotik virüsler arasında sadece iridovirüslerde mevcuttur. Şekil 4’te görüldüğü üzere replikasyon sırasında viral DNA’nın kopyaları (A) ebeveyn DNA’dan sentezlendikten sonra peş peşe eklenerek konkatemerleri (B) oluşturur. Konkatemerler halindeki viral DNA kapsit içerisine farklı bölgelerden kesilerek paketlenir (C). Paketlenmiş DNA komple virüs DNA’sının yanında genomdaki bazı genlerin tekrarlarını da içerir. Bu duruma “uç kısımların tekrarı (terminal redundansi)”adı verilir. Paketlenen DNA’nın uzunluğu bir virüsten diğerine farklılık gösterir. Bu genomik yapı şimdiye kadar çalışılmış bütün iridovirüslerde tespit edilmiştir. Omurgalı iridovirüslerin genomlarında yüksek oranda metillenme söz konusudur (Willis ve Granoff, 1980; Eaton vd., 1991). Omurgasız iridovirüslerde ise bu durum mevcut değildir.



Şekil 4. İridovirüs genomunun “Terminal Redundansi” özelliği (URL-2, 2014)

İridovirüslerde DNA replikasyonu *Frog virüs* (FV3) üzerinde ayrıntılı olarak çalışılmış ve bu, *Iridoviridae* familyasının replikasyonu için model olarak kabul edilmiştir. Ancak son yıllarda, *Ambystoma tigrinum stebbensi virus* (ATV) ve *Singapore grouper iridovirus* (SGIV) gibi ranavirüsler ve bazı megalocytivirüs izolatlarının replikasyonları üzerinde de çalışılmaktadır. Önceleri DNA genomuna sahip hayvan virüslerinin ya tamamı

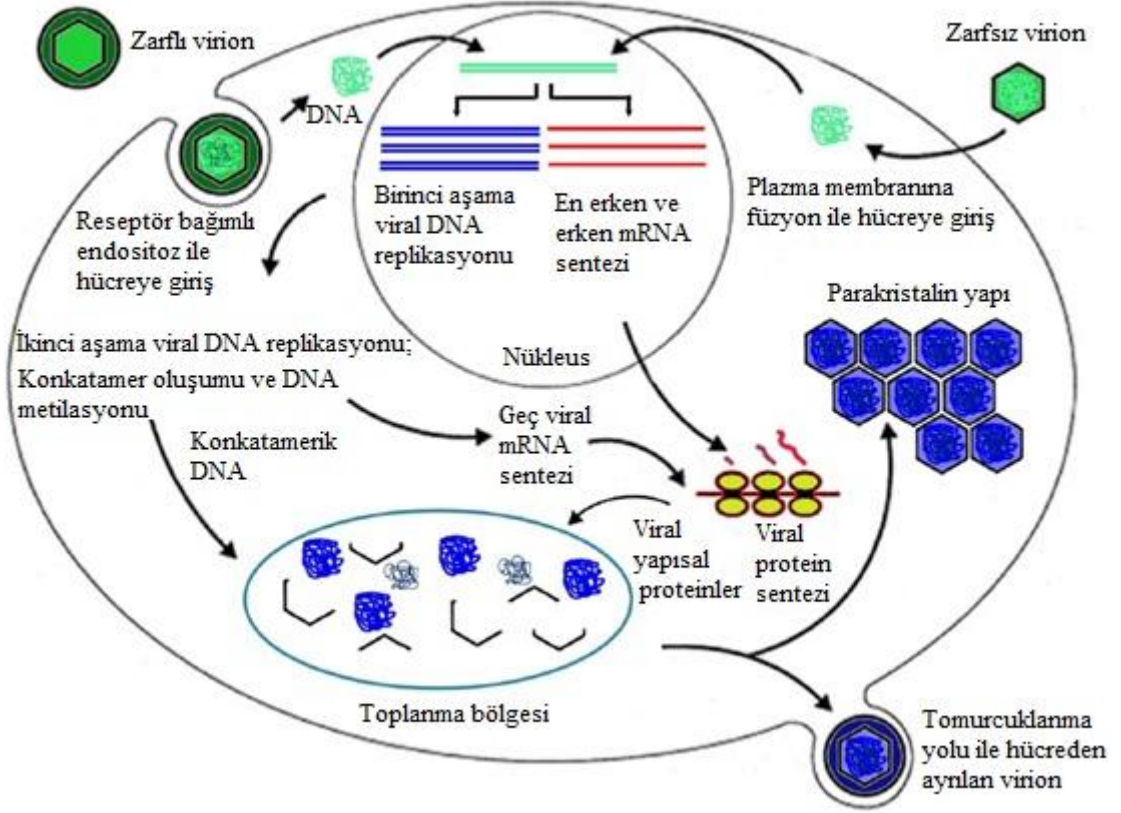
ile nükleusta (Herpesvirüs, Adenovirüs) ya da sitoplazmada (Poksvirüs) replike oldukları bilinmekteydi. Dolayısı ile iridovirüslerin de sitoplazmik virüsler oldukları bilindiği için tamamı ile sitoplazmada replike oldukları düşünülmüştür. Ancak FV3 ile enfekte edilen hücrelerin UV ile inaktivasyonu veya nükleusunun çıkarılması, virüs enfeksiyonuna engel olmuş, dolayısı ile FV3 replikasyonu için fonksiyonel bir nükleusa ihtiyaç olduğu görülmüştür. Nitekim elektron mikroskobu çalışmaları ile virüs DNA'sının, enfeksiyonun başlangıcında hücrenin nükleusunda bulunduğu, daha sonra sitoplazmaya geçtiği ve virüsü oluşturan yapıların birleşme işlemini konak hücrenin sitoplazmasında gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 5) (Goorha vd., 1977). Bu nedenle İridovirüsler nükleositoplazmik virüsler olarak bilinirler. Replikasyonları nükleusta başlar sitoplazmada tamamlanır.



Şekil 5. İridovirüs ile enfekte olmuş *Spodoptera frugiperda* (Sf21) hücrelerinde virüsün sitoplazmik görünümü. N: Nükleus, VC: Virojenik stroma (URL-2, 2014).

Enfeksiyondaki ilk basamak, virüs partikülünün konak hücre yüzeyine bağlanmasıdır. Konak hücreye bağlanmanın ardından zarflı virionlar, reseptör bağımlı endositoz ile hücreye girer. Buna karşın zarfsız virionlar ise hücre membranı ve virüs arasında meydana gelen füzyon olayı ile konak içerisine girerler (Braunwald vd., 1985). Hücreye girişin ardından viral DNA hücre nükleusuna transfer edilir ve en erken (IE; immediate early) ve erken (DE; delayed early) sınıflara ait erken viral RNA'lar virion DNA'sı kalıp olarak kullanılarak sentezlenirler (Williams vd., 2005). Bu RNA'lar DNA replikasyonu ve geç genlerin ekspresyonu için gerekli olan proteinleri kodlar. Replikasyon

nükleusta başlar ve viral genomun miktarını iki katına çıkaracak kadar DNA sentezlenir. Yeni sentezlenen DNA sitoplazmaya geçer ve konkatamerleri oluşturur (Willis vd., 1984). Geç (L; late) viral mRNA sentezi, DNA replikasyonundan sonra virüsün modifiye ettiği hüresel RNA polimeraz ya da viral RNA polimeraz II enzimiyle hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir. Geç viral RNA'lar, virion oluşumunda görevli viral yapısal proteinleri kodlar. Son olarak oluşan konkatamerler virüs kapsidi içerisine paketlenir. Virionların hücreden ayrılmaları ya tomurcuklanma yoluyla ya da hücrenin parçalanması ile gerçekleşir. FV3 DNA'sı için replikasyon modeli Şekil 6'da şematik olarak gösterilmiştir (Chinchar, 2002).



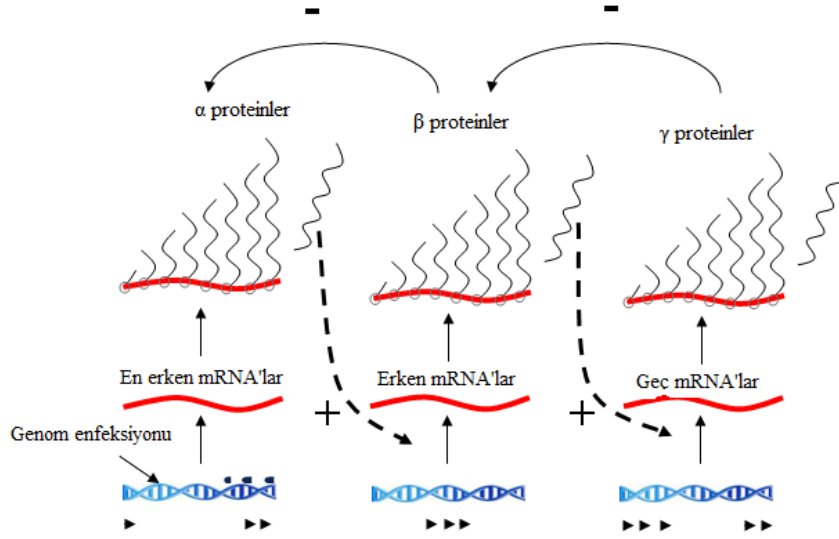
Şekil 6. *Frog virüs 3* (FV-3) DNA'sının replikasyon modeli (Chinchar, 2002)

1.2.3. İridovirüslerin Gen İfadesi ve Regülasyonu

Önceleri iridovirüslerin sadece herhangi bir polimeraz aktivitesinin olmadığı konak sitoplazmasında replike oldukları düşünüldüğü için Poksvirüsler gibi kendi RNA polimerazlarını kullandıkları farz edilmekteydi. Ancak daha sonra FV3 replikasyonunun, konak hücrenin nükleusunun varlığına bağlı olduğu görüldü (Goorha vd., 1978). Replikasyonun ikinci aşamasında gerekli olan proteinlerin ilk aşamada sentezlenmesi (Goorha vd., 1977), konak polimeraz II'sinin viral transkripsiyonun erken safhalarında rol oynadığını göstermektedir (Goorha vd., 1978; Goorha vd., 1979).

Saflaştırılmış FV3 DNA'sı hücreye verildiğinde enfeksiyonu başlatamamaktadır. Ancak virion bileşenlerinin saflaştırılmış viral DNA ile birlikte hücreye verilmesi durumunda enfeksiyonun oluşması, virüsün replikasyonu için viriona ait bir bileşenin olması gerektiğini göstermektedir (Willis ve Granoff, 1985). UV veya sıcaklık ile inaktive olmuş virüslerin hücrelerde enfeksiyona neden olmadıkları ancak her ikisinin birlikte hücreye verilmeleri durumunda enfeksiyon oluşturabildikleri görülmüştür. Bu durumda yine UV ile inaktive olmuş virüs partikülünün, sıcaklık ile inaktive olmuş virüsteki DNA'yı aktive etmek için gerekli olan polipeptidleri sağladığını göstermektedir.

İridovirüslerde gen ifadesi basamaklı bir şekilde düzenlenmektedir. İfade edilen genler en erken (α , IE), erken (β , DE) ve geç (γ , L) olmak üzere 3 sınıfa ayrılır (Şekil 7). Her sınıfın ürünleri bir sonraki sınıfın ürünlerini önemli bir şekilde etkilemektedir. En erken ve erken grubu genler DNA sentezinden önce sentezlenir. Fakat en erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duymaz iken, erken grubu genler protein sentezine ihtiyaç duyar. Geç grubu genler ise hem protein sentezine hem de DNA replikasyonuna ihtiyaç duyar.



Şekil 7. İridovirüslerde transkripsiyonun modeli (URL-2, 2014)

Çoğu iridovirüs mRNA'ları poli A kuyruğuna sahip değildir. Şimdiye kadar poli A kuyruğu sadece, TIV'ın 2 mRNA'sında ve LCDV-1 virüsünün fonksiyonu bilinmeyen bazı genlerinde tespit edilmiştir. Bütün iridovirüs mRNA'ları şapka (MeG, 7-metilguanozin) taşır, fakat intron bulundurmaları veya bulundurmamaları ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur.

İridovirüs genlerinin promotor özellikleri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur (Eaton vd., 2007). Şu ana kadar omurgalı iridovirüslerde *ranavirus* cinsinde yer alan FV 3'e ait iki erken genin (ICR-169 ve ICR-489) (Willis, 1987; Beckman vd., 1988) ve Bohle iridovirüs (BIV)'e ait iki erken genin (ICP-18 ve ICP-46) ve bir geç genin (major kapsid protein; mcp) promotor bölgeleri çalışılmıştır (Pallister vd., 2005). Omurgasız iridovirüslerde ise CIV'e ait bir erken (DNA polimeraz) ve bir de geç (major kapsid protein) genin promotor yapıları analiz edilmiştir (Nalçacıoğlu vd., 2003).

1.2.4. *Chilo Iridescent Virüs (CIV)*

Çalışmanın ana materyalini oluşturan CIV yukarıda da belirtildiği üzere omurgasız iridovirüslerinden olup *Iridovirus* cinsine mensuptur. Aynı zamanda "*Insect iridescent virus type-6*" olarak da bilinir. Virion, ikozahedral görünümde olup en dışta kapsid örtü, bunun altında lipit tabaka ve en içte lineer çift zincirli DNA molekülü mevcuttur. Lineer

durumdaki DNA molekülünün “terminal redundansı” özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Delius vd., 1984; Fischer vd., 1990; Schnitzler vd., 1994).

CIV'nin konak spektrumu araştırılmış ve 6 ordoya ait (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera) 100'den fazla böcek türünün bu virüse duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; Fukuda, 1971; Mclaughlin vd., 1972). CIV, ziraatte zararlı bazı herbivor böcekleri enfekte ettiği için ekonomik ve ekolojik olarak özel bir öneme sahiptir (Smith, 1976). Dolayısı ile bu böcek iridovirüsü potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülmektedir (Kleespies vd., 1999; Hernandez vd., 2000). Enfekte ettiği önemli zararlılar arasında *Anthonomus grandis* (Coleoptera; pamuk göz kurdu), *Nephotettix cincticeps* (Homoptera; pirinç kurdu), *Colladonus montanus* (Homoptera; dağ kirazı kurdu), *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera; kök kurdu), *Bemisia tabaci* (Homoptera; Pamuk beyaz sineği), *Drosophila melanogaster* (Diptera; sirkesineği), *Galleria mellonella* (Lepidoptera; Büyük balmumu güvesi), *Trichoplusia ni* (Lepidoptera; lahana kurdu) bulunmaktadır. CIV'nin replikasyonunun tespit edildiği çok çeşitli hücre kültürleri mevcuttur. Bunlar *Choristoneura fumiferana*, *Drosophila melanogaster*, *Pierris rapae*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliiothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella* ve *Aedes albopictus* hücreleri olarak bildirilmiştir (Constantino vd., 2001). Ayrıca D'Costa ve arkadaşları tarafından 2012'de gerçekleştirilen bir çalışmada CIV'nin *Anthonomus grandis* BRL-AG-3A (AG3A) hücre kültüründe etkili bir şekilde replike olduğu belirtilmiştir.

Yapılan ekolojik çalışmalarda, toprağın neminin ve topraktaki mikroorganizmaların CIV üzerine etkisi araştırılmış ve CIV'nin infektivitesini kaybetmesinin kuru topraklarda oldukça hızlı olduğu ancak, nemli ya da ıslak toprakta ise toprağın nem oranının virüsün inaktivasyon oranını çok fazla etkilemediği belirlenmiştir (Reyes vd., 2004). Sıcaklığın CIV inaktivasyonu üzerindeki etkisi araştırılmış ve virüsün infektivitesinin hem 4 °C'de hem de 25 °C'de yapılan enfeksiyonlarda 50 gün sonra 10 kat azaldığı tespit edilmiştir (Marina vd., 2000). Ayrıca UV'nin CIV'yi çok hızlı inaktive ettiği belirlenmiştir (Williams vd., 2005).

Bir başka çalışmada ise, CIV'nin organik çözücüler, deterjanlar ve enzimlere karşı duyarlılığı *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinde ve *Galleria mellonella* larvalarında test edilmiştir. Deterjanlar ve çeşitli çözücülerle muameleden sonra duyarlılık belirlenmeye

çalışılmıştır. Tween-80, lipazlar ve proteinazlarla muamele edildiğinde hiçbir duyarlılık belirlenmemiştir (Martinez vd., 2003).

2001 yılında Jakob ve arkadaşları tarafından CIV genomunun dizin analizi gerçekleştirilmiştir. Genom büyüklüğü 212,418 bp olarak tespit edilmiş ve baz bileşimi %71,37 oranında A+T, %28,63 oranında da G+C olarak belirlenmiştir. Yine dizin analizi sonucunda CIV genomunda 468 adet açık okuma zincirinin varlığı tespit edilmiştir. Takip eden çalışmalarda CIV virion ekstraktının hücre kültüründe apoptosisi teşvik ettiği (Paul vd., 2007) ve apoptosisi teşvik eden bu faktörün virüse ait protein kinaz olduğu belirlenmiştir (Chitnis vd., 2011).

D'Costa ve arkadaşları (2001) tarafından CIV genomunun transkripsiyonel analizi yapılmıştır. DNA ve protein sentezi inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmada CIV'ye ait 38 en erken, 34 erken ve 65 geç genin varlığı tespit edilmiştir. CIV'de promotor bölgeleri bir erken ve bir de geç gen üzerinde ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Nalçacıoğlu vd., 2003; Nalçacıoğlu vd., 2007). Fonksiyonel analiz kapsamında ise CIV'ye ait apoptosisi inhibitör geni (197R) çalışılmış ve sonuçlar bu genin fonksiyonel bir apoptosisi inhibitör genini kodladığını göstermiştir (İnce vd., 2008).

İnce ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan proteomik çalışmasında CIV'nin 54 adet yapısal proteine sahip olduğu ve bu çalışmayı takip eden bir başka çalışmada da proteinlerin 23 tanesinin en erken, 11 tanesinin erken ve 7 tanesinin de geç sınıfına ait oldukları belirlenmiştir (İnce vd., 2013). Son olarak da 2014 yılında Ozgen ve arkadaşları tarafından genomunda yeşil floresan protein geni (GFP) ekspresleyen rekombinant CIV oluşturulmuştur.

1.3. Nükleazlar

Nükleik asitler, genetik bilginin taşıyıcısı olarak işlev görürler ve genetik bilginin nesilde nesile etkin bir şekilde aktarılması için replikasyon, rekombinasyon ve tamir gibi işlemlere maruz kalmak zorundadırlar. Canlı organizmalar “nükleazlar” olarak adlandırılan ve nükleik asitlerin yapısındaki fosfodiester bağlarını kesen bir grup enzime sahiptirler. Nükleazlar, ekzonükleazlar ve endonükleazlar şeklinde sınıflandırılabilir. Ekzonükleazlar, nükleik asitlerin 5' ya da 3' ucundan keserler ve kesim için serbest uca ihtiyaç duyarlar. Endonükleazlar ise serbest uca gereksinim duymadan nükleik asitlerin iç kısımlarında yer alan fosfodiester bağlarını keserler (Marti ve Fleck, 2004). DNA ve RNA'nın kesimini

katalizleyen nükleazlar yaşam için zorunlu enzimler olup çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Bu fonksiyonlardan bir tanesi DNA zinciri üzerinde 5'-3' yönündeki ekzo ve endonükleaz aktiviteleridir. Bu aktiviteleri sayesinde DNA replikasyonu sırasında RNA primerlerini DNA yapısı üzerinden uzaklaştırırlar (Kao ve Bambara, 2003; Shen vd., 2005). Nükleazların bir diğer aktivitesi ise DNA zincirine yanlış eklenmiş nükleotitlerin uzaklaştırıldığı 3'-5'ekzonükleaz aktivitesidir (Reha-Krantz, 2010). Nükleaz aktivitesi topoizomerizasyon (Schoeffler ve Berger, 2008), bölge spesifik rekombinasyon (Grindley vd., 2006) ve RNA splayı (Patel ve Steitz, 2003) gibi nükleik asitlerin yapısal değişimleri için de gereklidir. Ayrıca nükleaz aktiviteleri, RNA'nın olgunlaşması ve RNA interferens (RNAi) olaylarında da kullanılmaktadır (Abelson vd., 1998; Chu ve Rana, 2007; Nowotny, 2009). Diğer taraftan nükleaz aktiviteleri sayesinde gerçekleşen DNA ve RNA'nın degradasyonu, mikrobiyal savunma mekanizmalarının önemli bir parçasıdır (James vd., 1996; Sorek vd., 2008).

CIV genomunda bulunan 012L kodlu açık okuma zinciri (ORF), 1875 nükleotit ve 624 aminoasit büyüklüğünde olup biyoinformatik analizlere göre potansiyel ekzonükleaz geni olarak bildirilmiştir. Bu genin aktivitesinin aydınlatılması CIV'nin sahip olduğu moleküler mekanizmaların aydınlatılması adına önem arz etmektedir.

1.4. Çalışmanın Amacı

Tezin amacı, bir ekzonükleaz olabileceği belirtilen, DNA replikasyonunda, rekombinasyonda ve tamirde önemli rolü olabileceği düşünülen ve iridovirüslerde moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunabileceğini düşündüğümüz *Chilo iridescent* virüs'e ait 012L açık okuma zincirinin transkripsiyonel ve fonksiyonel analizlerini gerçekleştirmektir. Bu amaç çerçevesinde tezin kapsamı şöyledir:

1. Tez konusu olan 012L geninin güncel ve ileri biyoinformatik yöntemler kullanılarak ekzonükleaz olma özelliğinin yeniden araştırılması,
2. 012L geninin transkripsiyonel olarak aktif olup olmadığının, aktif ise transkripsiyon periyodunun ve transkripsiyon sınıfının belirlenmesi,
3. Transkripsiyonel olarak aktif olduğu belirlenen genin anatomik yapısının (translasyona uğramayan 5' bölgesinin) aydınlatılması,
4. Genin fonksiyonel analizi gerçekleştirilerek işlevsel olup olmadığının araştırılmasıdır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Böcek Hücre Kültürü ve Virüs

Çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan ve daha önceden Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültür Koleksiyonu (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-DSMZ) kuruluşundan temin edilmiş *Bombyx mori* (SPC-BM-36) hücre kültürü kullanıldı. Hücreler 27 °C' de %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ihtiva eden Grace böcek besiyerine %1'lik NaCl eklenerek hazırlanan TN-MFH besiyerinde büyütüldü.

Ayrıca çalışmada İridovirüs cinsine ait olan *Chilo* iridescent virüs (CIV / Dr. C. Joel Funk'dan temin edilmiş, USDA-ARS Western Cotton Research Laboratory, Phoenix, Arizona) kullanıldı.

2.2. Virüsün Çoğaltılması, Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Virüsün çoğaltılması için konak olarak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları kullanıldı. Larvalar virüsle, 30 G1/2 iğne kalınlığına sahip enjektör ile enjeksiyon yoluyla enfekte edildi. Enfekte edilen larvalar 27 °C'de 3 hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda enfeksiyon gelişen larvalar -80 °C'de muhafaza edildi.

Virüsün saflaştırılması Marina ve arkadaşlarının (1999) geliştirdikleri metoda göre gerçekleştirildi. Donmuş 1 adet larva 1 ml steril ddH₂O'da homojen hale getirildi. Homojenat, virüsün saflaştırılması esnasında sırasıyla 490×g, 960×g ve 1.250×g'de 10'ar dakika santrifüj edilerek doku parçalarından ve kaba partiküllerden arındırıldı. Ardından 15.300×g'de santrifüj edilerek virüs çökelti haline getirildi. Çökelti 500 µl steril ddH₂O'da çözüldü ve % 30'luk sükröz çözeltisi üzerine bırakılarak 15.300×g'de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelti 1 kez yıkandı ve 1 ml steril ddH₂O'da çözüldü. Bu şekilde saflaştırılan virüs 0,22 µm'lik filtreden süzülerek steril tüplerde toplandı ve +4 °C' de muhafaza edildi.

Virüs konsantrasyonunun tayini spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. 260 nm de 1 absorbans değeri 55 µg/ml olarak kabul edildi (D'Costa vd., 2001).

2.3. CIV 012L Açık Okuma Zincirinin Biyoinformatik Analizi

Ekzonükleaz genine ait aminoasit sırası veri tabanından temin edildi ve sahip olduğu korunmuş bölgeler Blast analizi programı içerisindeki conserved domain programı kullanılarak tespit edildi. Ayrıca, Clustal W programı kullanılarak, CIV 012L geninin diğer organizmalara ait ekzonükleazlarla karşılaştırılması yapıldı. Veri tabanından temin edilen *Wiseana iridescent* virüs'e ait muhtemel ekzonükleaz proteini (WIV_gp048, YP_004732831.1), *Anopheles minimus* iridovirüs'e ait 5'-3' ekzoribonükleaz I (AMIV_126, YP_009021199.1), *Invertebrate iridovirus* 25'e ait 5'-3' ekzoribonükleaz I (IIV25_115R, YP_009010648.1) ve *Invertebrate iridescent virüs* 3'e ait ekzonükleaz (MIV059L, YP_654631.1) proteinlerinin aminoasit sıraları CIV 012L proteininin sırasıyla karşılaştırıldı.

2.4. CIV Ekzonükleaz (012L) Geninin Transkripsiyonel Analizi

2.4.1. Transkripsiyon Zamanının Belirlenmesi

2.4.1.1. Virüs ile Enfekte Olmuş Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu

012L geninin CIV ile enfekte olan SPC-BM-36 hücre kültüründe transkripsiyon zamanını belirlemek için, bu hücrelerden farklı zamanlarda izole edilen toplam RNA'ların RT-PCR yöntemiyle analizleri yapıldı. 0., 1., 2., 4., 6., 8., 10.,12. saatler ve kontrol olmak üzere, dokuz adet T-25 flaske, 1×10^7 SPC-BM-36 hücresi bırakıldı. Yaklaşık 3-4 saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp 1 ml virüs süspansiyonu eklendi. Virüslerin hücrelere tutunması için, flaskler 2 saat 2,5 rpm'de sallandı. İki saatin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler yıkanarak tutunmayan virüsler uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 4 ml taze besiyeri eklendi. Bu zamanın 0. saat olduğu kabul edildi. 0. saat için ayrılan flaskten, trizol (Sigma, Kat No: T9424) kullanılarak, firma tarafından tavsiye edilen yöntemle göre toplam RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra da diğer flasklerden, belirtilen toplam RNA izolasyonları yapıldı.

2.4.1.2. İzole Edilen RNA'ların DNaz I ile Muamele Edilmesi

RNA'ları, izolasyon sırasında meydana gelebilecek DNA kontaminasyonundan temizlemek için, DNaz I muamelesi yapıldı. Bu amaçla, her bir örnek 10 µg RNA, 5 µl tampon (10X, DNaz I enzimine ait) ve 2 µl DNaz I (Sigma, AMP-D1, 1u/µl) ile muamele edildi. Son hacim, ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlanarak karışım 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, 2'şer µl stop solüsyonu ilavesiyle, RNA hidrolizini katalizleyebilecek divalent iyonların inaktivasyonu sağlandı. Ardından RNA'ların konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü.

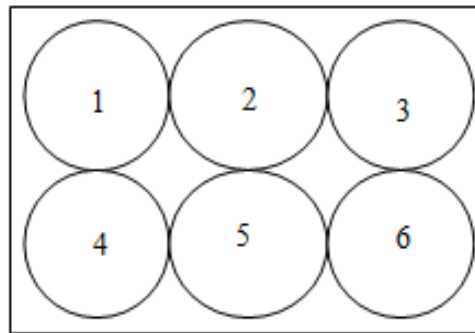
2.4.1.3. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Konsantrasyonu belirlenen RNA'lardan cDNA oluşturulması işlemine geçildi. RNA'lardan, her cDNA reaksiyonu için 2'şer µg kullanıldı. Her bir zaman dilimi için ayrı hazırlanan mikrosantrifüj tüplerine öncelikle RNA, primer (oligo dT-ankor primeri; 5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C(T)₁₆V-3') ve ddH₂O bırakıldı. Hazırlanan bu tüpler 70 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra buz üzerine alınarak soğutuldu ve içerisine 2,5 µl tampon (10X, M-MuLV Revers Transkriptaz enzimine ait) ve 2 µl dNTP (10 mM) karışımı eklendi. Son karışım 37 °C'de 2 dakika bekletildi. Bu karışıma 100 U M-MuLV Revers Transkriptaz (New England Biolabs Kat No: M0253S) enzimi ilave edildi. Karışım 37 °C'de 60 dakika inkübe edilerek cDNA oluşumu sağlandı. Ardından reaksiyon 70 °C'de 15 dakika bekletilerek enzimin inaktivasyonu sağlandı. Her bir zaman dilimi için ayrı ayrı yapılan cDNA'lar, PCR ürünü temizleme kiti (Nucleospin, Kat No: 11457) kullanılarak temizlendi. Temizlenmiş cDNA'lar kullanılarak 012L genine ait ileri ve geri primerler ile (Fw5'-CTGCTCAGGAGGTATATGGT-3'; Rv 5'-GAGAGGCTTCTGATGAAG-3') aşağıdaki şekilde PCR yapıldı ve böylece RT-PCR işlemi tamamlanmış oldu. PCR işlemi, RNA'da DNA kontaminasyonu olmadığını görmek için, RNA kalıbı kullanılarak da uygulandı.

<u>PCR İçeriği</u>		<u>PCR Reaksiyonu</u>
1 µl	Kalıp (RNA veya cDNA)	95 °C'de 3'
1 µl	012L F (İleri Primer)	} 35 döngü
1 µl	012L R (Geri Primer)	
1 µl	dNTP	
3 µl	MgCl ₂	
5 µl	10X Taq DNA polimeraz Tampon	
0,5 µl	Taq DNA polimeraz	72 °C'de 7'
37,5 µl	ddH ₂ O	4 °C'de ∞

2.4.2. Transkripsiyon Sınıfının Belirlenmesi

CIV 012L geninin transkript edildiği gen ekspresyon sınıfının tayini için DNA sentezi inhibitörü olan β-D-Arabinofuranosylcytosine (Ara-C; Sigma, Kat No: C-1768) ve protein sentezi inhibitörü sikloheksimit (Cyc; Sigma, Kat No: 7698) varlığında CIV ile enfekte olmuş SPC-BM-36 hücrelerinden RNA izolasyonları yapıldı. Enfeksiyon 6 gözlü hücre kültürü kaplarında gerçekleştirildi. Kapların her bir gözüne 2x10⁶ hücre bırakıldı. Yaklaşık 3-4 saat hücrelerin tutunması için beklendikten sonra 2, 3, 5 ve 6 no'lu gözlerdeki hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı (Şekil 8).



Şekil 8. SPC-BM-36 hücrelerinin CIV ile inhibitörler varlığında enfeksiyonunun gösterimi. 1: Hücre, 2: Hücre + Ara-C, 3: Hücre + Cyc, 4: Hücre + CIV, 5: Hücre + Ara-C + CIV, 6: Hücre + Cyc + CIV

2 ve 5 no'lu gözlerle Ara-C (100 µg/ml) inhibitörü ihtiva eden besiyeriden, 3 ve 6 no'lu gözlerle ise Cyc (200 µg/ml) inhibitörü içeren besiyeriden 1'er ml eklendi. Hücreler, 1 saat 28 °C'lik etüvde inkübe edildikten sonra, 2, 3 ve 4 no'lu gözlerdeki hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı. Bu gözlerle enfeksiyon yapmak için 2'şer ml enfeksiyon sıvısı hazırlandı. İnhibitör içeren gözler için inhibitör ilavesi yeniden sağlandı. Kültür kabı virüslerin hücreye tutunması için, 2 saat 2,5 rpm'de sallandı. Bu sürenin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve hücreler inhibitör içerip içermediğine uygun olarak yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine yine inhibitör içeriğine uygun olarak 2 ml taze besiyeri eklendi. Kapağı kapatılıp, 28 °C'lik etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda toplam RNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilen RNA'lar, DNA kontaminasyonuna karşı, yukarıdaki gibi DNaz I ile muamele edildikten sonra spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu RNA'lar, 012L genine özel primerler kullanılarak, genin transkripsiyon edildiği sınıfı belirlemek üzere daha önce açıklandığı şekilde RT-PCR işlemine tabi tutuldu.

2.5. Transkripsiyon Başlangıç Noktasının Tespit Edilmesi

2.5.1. cDNA'nın 5' Ucunun Çoğaltılması (5'-RACE)

CIV 012L geninin transkripsiyon başlangıç noktasını tespit edebilmek için 5'-RACE tekniği kullanıldı. Deney şartları 5'-RACE kitindeki (ROCHE, Kat No: 03 353 621 001) kullanma yöntemine göre oluşturuldu. Şekil 9'da 5'-RACE analizi şematik olarak anlatılmaktadır.

5'-RACE analizinin ilk aşamasında toplam RNA'dan, gen için özel primerler (SP1 5'-CCTATCATGCGCGGCCA-3') kullanılarak tek zincir cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu işlem için tüpe;

cDNA sentez tamponu (tüp 1)	: 4 µl
Deoksिनükleotid karışımı (tüp 3)	: 2 µl (10 mM)
SP1 primeri	: 1 µl (12 mM)
Toplam RNA	: 3 µl (2 µg)
AMV revers transkriptaz (tüp 2)	: 1 µl
H ₂ O	: 9 µl

karışımı bırakıldı. Karışımın 55 °C’de 60 dakika ve 65 °C’de de 10 dakika bekletilmesi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA, PCR ürünü temizleme kiti kullanılarak yukarıda belirtildiği şekilde temizlendi.

Temizlenen cDNA’nın 3’ ucuna, terminal transferaz enzimi kullanılarak “poli A” kuyruğu takıldı. Bunun için bir tüpe;

Temizlenen cDNA örneği	: 19 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 2,5 µl (10X)
2 mM dATP (tüp 4)	: 2,5 µl

karışımı bırakıldı ve karışım 94 °C’de 3 dakika bekletildikten sonra hemen buz üzerine alındı. Üzerine 1 µl terminal transferaz (tüp 6, 10 ünite/µl) ilave edilip karıştırıldı ve 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Enzimin inaktivasyonu için, karışım 70 °C’de 10 dakika bekletildi.

Bu şekilde “poli A” kuyruğu takılmış cDNA, önce SP2 (5'-GAGCTACTCCGTCGATAC-3') primeri sonra SP3 (5'-CTGTCTACACACCAATGA-3') primeri kullanılarak birbirini takip eden iki ayrı PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. Birinci PCR reaksiyonunda tüpe;

“Poli A” kuyruğu takılmış cDNA	: 5 µl
Oligo dT-ankor primeri (tüp 8)	: 1 µl
SP2 primeri	: 1 µl (12 µM)
Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 µl
Taq DNA Polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl (10x)
H ₂ O	: 36,5 µl

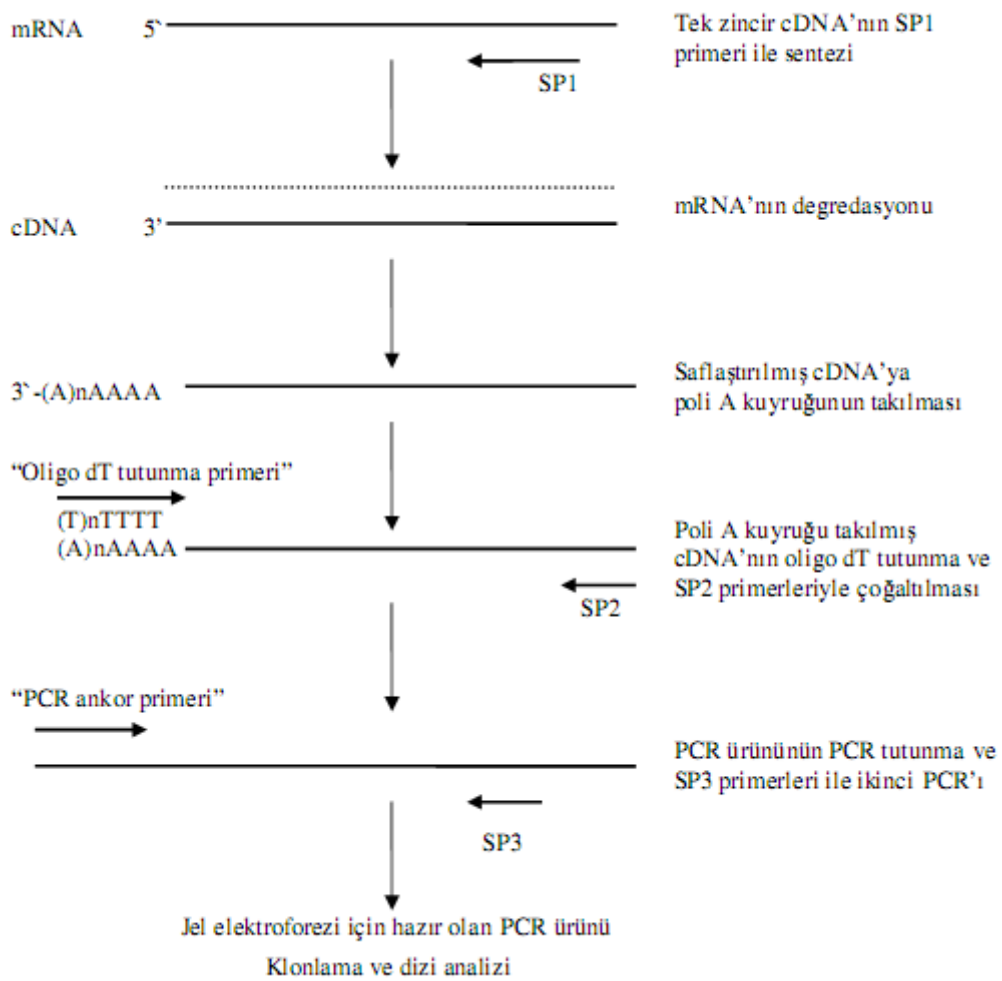
karışımı bırakıldı ve PCR yapıldı. PCR reaksiyonu 94 °C’de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 30 döngü halinde 94 °C’de 30 saniye, 50 °C’de 30 saniye ve 72 °C’de 1 dakika bekletilerek gerçekleştirildi.

İkinci PCR reaksiyonunda ise yine bir tüpe;

Birinci PCR ürünü	: 1 µl
PCR-ankor primeri (tüp 9)	: 1 µl
SP3 primeri	: 1 µl (12 µM)

Deoksinükleotid karışımı (tüp 3)	: 1 µl
Taq DNA Polimeraz	: 0,5 µl
Reaksiyon tamponu (tüp 5)	: 5 µl (10X)
H ₂ O	: 40,5 µl

karışımı bırakıldı ve üstteki PCR programına tabi tutuldu. Neticede oluşan ürün %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi. PCR sonucu oluşan DNA jelde görüntüldü.



Şekil 9. 5'-RACE analizinin şematik gösterimi

Elektroforez edilen PCR ürünlerinin oluşturdukları bantlar jelden temizlendi. Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEMT-Easy vektörüne 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pGEMT-Easy) klonlandı. Reaksiyon;

1 µl PGEMT-Easy vektörü

5 µl 2 X ligasyon tamponu

1 µl T4 DNA ligaz

3 µl DNA fragmenti biraraya getirilerek 10 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi.

Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kompetent hücrelere transformasyonları sağlandı.

2.5.2. Elektrokompotent *Escherichia coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması ve Elektrotransformasyon

Petride büyütülmüş *E. coli* DH5α hücrelerinden tek bir koloni alınıp, NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden, 1:100 oranında LB Broth besiyerine aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de, yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 OD olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de, 4.000 rpm hızında, 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez steril soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti, soğuk %10'luk gliserolde çözüldü ve 5.000 rpm'de, 4 °C'de, 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti pelletin miktarına bağlı olarak az miktarda %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompetent hücreler, 50 µl'lik hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölündü kullanılacak olanlar buz üzerine alındı gerisi ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Buza bırakılan kompetent hücrelerin üzerine CIV 012L geninin translasyona uğramayan DNA sıralarının klonlandığı plazmidlerden 1-3 µl ilave edildi. Karışım elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve kuvvetler elektroporator cihazına (BioRad) yerleştirildi. Kuvvetler, cihazda 200 ohm, 1,5-2K ve 25mF'de 3-4 sn bekletildi. Ardından kuvvetin içeriği 1ml LB broth besiyerine transfer edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler 6.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelti haline gelen hücreler, 200 µl LB Broth besiyerisinde süspansiyon edildi ve petri kaplarında bulunan, 1/1000 oranında ampisilin antibiyotiği içeren, 40 µl IPTG (izopropil beta-D-tiyogalaktosid) (100 mM) ve 40 µl X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktosid) (50 mg/ml) sürülmüş LB Agar besiyerisi üzerine cam bagetle yayıldı. Petriyerler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan

beyaz kolonilerden gece kültürleri hazırlandı. Klonlama işleminin başarılı olup olmadığını belirlemek amacıyla bu kültürlerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Ardından plazmidler restriksiyon enzimleri ile muamele edildi ve içlerinde klonlanan DNA fragmanını ihtiva edip etmedikleri araştırıldı.

2.5.3. Plazmid DNA İzolasyonu ve Pozitif Klonların Seçimi

Plazmid DNA'larının izolasyonu için, hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant, geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti, kalan süpernatant içinde vorteksenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0,1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; %0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben, üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. Hazırlanan karışım, 10 dakika buz içinde bekletildi ve bu sürenin sonunda, 14.000 rpm'de, 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %100'lük etanol ilave edilerek 14.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve 10 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH₂O'da çözüldü.

İzole edilen plazmid DNA'ların ekzonükleaz geninin translasyona uğramayan bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları *EcoR* I restriksiyon enzimi ile muamele edildi.

Bunun için, 10 µl DNA, 0,5 µl *EcoR* I (Promega), 1,5 µl enzime ait 10X tamponu ve 3 µl H₂O olacak şekilde 15 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve kesim reaksiyon tüpü, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından reaksiyon karışımı, %1'lik jelde elektroforez edildi. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren pozitif klonlardan 3 tane seçildi. Bu klonlardan plazmid DNA izolasyon kiti (Promega, Kat No: A1330) kullanarak saf plazmit DNA'lar izole edildi ve bu DNA'lar dizin analizi yapılmak üzere MacroGen Firmasına (Kore) gönderildi.

2.6. CIV 012L Geninin Promotor Bölgesinin Analizi

Promotor analizi için öncelikle genin 5' yukarı kısmında bulunan potansiyel promotor olabilecek bölgeler belirlendi. Bu bölgeler PCR ile viral DNA'dan çoğaltıldı.

Çoğaltılan bu potansiyel promotör bölgeleri ikili lusiferaz deneyi ile analiz edildi. Bu deney düzeninde düzeninde farklı iki lusiferaz proteini içeren iki farklı plazmid bulunmaktadır. Burada kullanılan “ikili” kelimesi iki farklı lusiferaz geninin ürünlerinin tek bir sistem tarafından aynı anda ekspresyonu ve ölçülmesi anlamına gelmektedir. İkili lusiferaz işaret sistemi şu şekilde özetlenebilir; sistemde iki farklı plazmit mevcuttur. Bunlardan bir tanesi Kuzey Amerikan ateş böceği *Photinus pyralis*'e ait ateşböceği lusiferaz geninin promotorsuz olarak klonlandığı pSP-Luc+ plazmiti (Promega), diğeri ise bir mercan türü olan *Renilla reniformis* organizması tarafından kodlanan renilla lusiferaz geninin ekspres edildiği pIC-IE1 plazmitidir. pIC-IE1 plazmiti Mariella van Hulten (Wageningen University, Laboratory of Virology) tarafından pRL-null (Promega) plazmitinden oluşturulmuştur. Dr. Van Hulten pRL-Null plazmitinde promotorsuz olarak klonlanmış olan renilla lusiferaz geninin önüne AcMNPV'ye ait en erken grubu bir gen olan IE1 geninin promotörünü yerleştirmiş ve elde ettiği plazmite pIC-IE1 adını vermiştir. Gene ait tayin edilen promotör fragmanları bu plazmidlerden bir tanesinde promotorsuz olarak bulunan lusiferaz proteininin önüne promotör olarak klonlanmıştır.

2.6.1. Viral Genomik DNA İzolasyonu

Bm hücreleri, Bölüm 2.2'de belirtildiği gibi saflaştırılan virüs ile enfekte edildiler. Enfeksiyon için 75 cm²'lik hücre kültürü kapları kullanıldı. Enfekte edilmiş hücreler 28 °C'lik etüvde 5 gün bekletildi. DNA izolasyonu Summers ve Smith (1987)'e göre gerçekleştirildi. Bunun için hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile iki kez yıkandı ve üzerlerine 0,5 ml parçalama tamponu (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA), 10 µl Proteinaz K solüsyonu ilave edilerek karıştırıldı. Ardından 20 °C'ye ayarlı su banyosunda 12-16 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda iki kez Fenol: Kloroform: İzooamilalkol ekstraksiyonu yapıldı. Takiben üzerine 1/3 hacim 10 M amonyum asetat ve 2 hacim %96'lık alkol ilave edilerek 15 dakika -20 °C'de bekletildi. 2000×g'de 30 dakika santrifüj edildi. Çökelti %70 lik etanol ile yıkandı ve kurutuldu. TE tamponu içinde çözüldükten sonra yakın zamanda kullanılacağı için +4 °C'de muhafaza edildi.

2.6.2. Muhtemel Promotor Bölgelerinin Tayini ve Klonlanmaları

CIV 012L geninin promotor dizilerinin içinde bulunabileceğini düşündüğümüz ve genin transkripsiyon başlangıç noktasına farklı uzaklıklarda 7 farklı promotor fragmenti tayin edildi.

Belirlenen ilk üç fragmentin 5' uçları, transkripsiyon başlangıç noktası +1 olarak kabul edildiğinde, sırasıyla -200, -130 ve -80 noktalarından başlamaktadır. Bu fragmentleri çoğaltmak için tasarlanan primerlerin 5' uçlarına *Kpn* I restriksiyon endonükleaz bölgesi eklendi. Fragmentlerin 3' uçları ise +43 noktasından başlatıldı ve uçlarına da *Bgl* II restriksiyon endonükleaz bölgesi eklendi. Belirlenen DNA fragmentleri, viral DNA'dan, özel primerler kullanılarak çoğaltıldı (Tablo 2).

<u>PCR İçeriği</u>		<u>PCR Reaksiyonu</u>
1 µl	Kalıp (viral DNA veya Exo PC1)	95 °C'de 2'
1 µl	Exo Luc F-200 (İleri Primer)	} 35 döngü
1 µl	Exo Luc F Rev (Geri Primer)	
1 µl	dNTP	
3 µl	MgCl ₂	
5 µl	10X Taq DNA polimeraz Tamponu	
0,5 µl	Taq DNA polimeraz	72 °C'de 7'
37,5 µl	ddH ₂ O	4 °C'de ∞

Çoğaltılan fragmentler *Kpn* I ve *Bgl* II enzimleri ile muamele edilerek aynı enzimler ile muamele edilmiş pSP-Luc+ vektöründe (Promega) promotörü bulunmayan lusiferaz geninin önüne klonlandı. Reaksiyon;

1 µl pSP-Luc+ vektörü

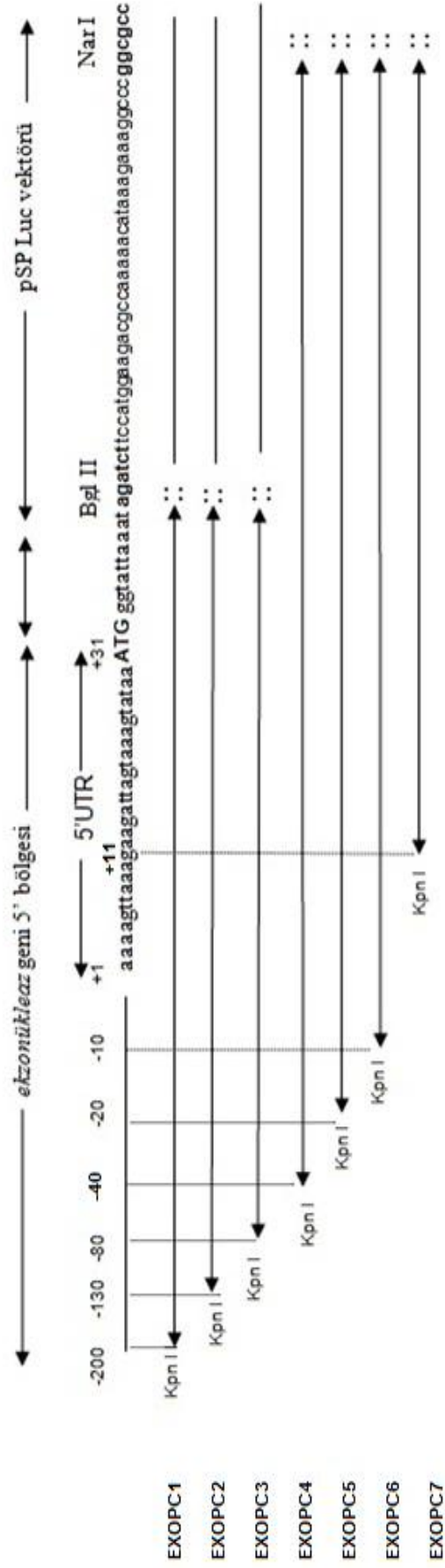
5 µl 2 X ligasyon tamponu

1 µl T4 DNA ligaz

3 µl DNA fragmenti biraraya getirilerek 10 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi.

Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Böylece ekzonükleaz için Exo PC1, Exo PC2 ve Exo PC3 rekombinant plazmitleri oluşturuldu. Bu plazmitlerde lusiferaz geninin

ekspresyonu, baş kısmına klonlanan ve promotor dizilerini ihtiva ettiği düşünölen DNA fragmentleri tarafından kontrol edildi (Şekil 10).



Şekil 10. CIV 012L geninin lusiferaz işaret geni önüne klonlanacak potansiyel promotor bölgelerinin gösterimi. Uzunlukları gittikçe azalmakta olan DNA Fragmentleri, pSP-Luc+ vektörüne klonlandı.

Kalan diğ er dört adet (-40, -20, -10 ve +11 konumlu 5' başlangıç noktalarına sahip fragmentler) promotör bölgesini ihtiva etmesi mümkün fragmentlerde ise fragmentin büyüklüğü gittikçe azaldığı için jelden temizlenmeleri ve klonlanmaları zor olacağından küçük olan fragmentler, viral DNA'dan değil de oluşturulan rekombinant plazmitlerden birincilerini kalıp olarak kullanarak yukarıdaki PCR programına göre çoğaltıldı. Buradaki amaç küçük olan fragmentlere pSP-Luc+ vektörü tarafından bir miktar uzunluk kazandırarak, bu fragmentler ile çalışmayı kolaylaştırmaktır. Sentezlenen bu fragmentlerin de 5' uçlarına PCR ile *Kpn* I, 3' uçlarına ise *Nar* I restriksiyon endonükleaz bölgeleri eklendi. pSP-Luc+ vektörü de aynı restriksiyon endonükleazlar ile muamele edildi. Böylece, aynı enzim bölgelerine sahip DNA fragmenti ve plazmit DNA yukarıdaki reaksiyonda olduğu gibi bir araya getirilerek birleştirildi ve neticede Exo PC4, Exo PC5, Exo PC6 ve Exo PC7 rekombinant plazmitleri elde edildi. Promotör plazmitlerinin oluşturulması için kullanılan primerler Tablo 2'de verilmiştir. Oluşturulan 7 adet rekombinant plazmit *Escherichia coli* DH5α hücrelerine transform edildi. Bölüm 2.5.3'te anlatıldığı gibi izole edilen plazmid DNA'ların klonlanan fragmentleri ihtiva edip etmediklerini tespit etmek için, bu plazmid DNA'ları *Kpn* I ve *Bgl* II restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Bunun için, 10 µl DNA, 0,5 µl *Kpn* I, 0,5 µl *Bgl* II, 1,5 µl 10X TA tamponu ve 2,5 µl H₂O olacak şekilde 15 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve reaksiyon tüpü, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından reaksiyon karışımı, %1'lik jelde elektroforez edildi. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren pozitif klonlardan 3 tane seçildi. Bu klonlardan plazmid DNA izolasyon kiti (Promega) kullanarak saf plazmit DNA'lar izole edildi ve bu DNA'lar dizin analizi yapılmak üzere Macrogen Firmasına (Kore) gönderildi. Mutasyon içermeyen birer adet klon transfeksiyon işleminde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

Tablo 2. Promotor plazmitlerini oluşturmak için kullanılan primerler^a

Primer adı	Sırası	Pozisyon
Exo Luc F-200	5'-GGGGTACCGAAGCTTTGTGTTTCAGAG-3'	-200/-183
Exo Luc F-130	5'-GGGGTACCAAATTGTTTTCAATTGCA-3'	-130/-113
Exo Luc F-80	5'-GGGGTACCTAATTTTAAATGTTTGATTG-3'	-80/-63
Exo Luc F-40	5'-GGGGTACCAATAAATTTGAACTATATATTGG-3'	-40/-23
Exo Luc F-20	5'-GGGGTACCTGGATCATATTTTAAAGA-3'	-40/-23
Exo Luc F-10	5'-GGGGTACCTTAAAGATTTAAAAGTTAAAG-3'	-10/+5
Exo Luc F+11	5'-GGGGTACCGAAGATTAGTAAAGTATAA-3'	+11/+24
Exo Luc F Rev	5'-GGGGTACCGAAGATTAGTAAAGTATAA-3'	+43/+24
Luc Nar I R	5'-GGAATGGCGCCGGGCCTTTCTTTATG-3'	85/62(Luc)

^aKoyu yazılan *Kpn* I ve altı çizili olan *Bgl* II enzim bölgeleri 012L genine ait primerlere, pSP-Luc+ vektörüne klonlamayı kolaylaştırmak için eklenmiştir. *Nar* I primeri de pSP-Luc+vektörünün 3' bölgesindeki *Nar* I bölgesi ile birleşmiştir.

2.6.3. Transfeksiyon

Transfeksiyon deneyi 35 mm'lik hücre kültür kaplarında gerçekleştirildi. Bm hücreleri bir gece önceden hücre kültür kaplarına her kapta $1,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde transfer edildi. Hücrelerin 2 saatlik tabana yapışma periyodunun ardından, üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine FBS ve katkı maddeleri ihtiva etmeyen besiyeri konuldu.

Ertesi gün hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve yerine daha önceden hazırlanmış olan rekombinant promotor plazmiti (2 µg), cellfectin (10 µl) (Invitrogen, Kat No: 10362-010) ve katkı maddeleri ihtiva etmeyen besiyeri (500 µl) karışımı bırakılarak plazmitin hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirildi. Bu sırada pipetlemeden veya ortam şartlarının olumsuzluğundan kaynaklanabilecek hataları ortadan kaldırmak amacı ile hücreler aynı anda her rekombinant promotor plazmidinin yanında birde kontrol plazmidi olan pIC-IE1 (2µg) ile transfekt edildiler.

18 saatlik bir transfeksiyon periyodundan sonra hücreler *Chilo* iridescent virüs ile enfekte edildi. Bu işlem her rekombinant plazmit için (7 adet) ayrı ayrı petrilere kontrol plazmidi ile birlikte gerçekleştirildi.

2.6.4. Lusiferaz Proteinlerinin İzolasyonu ve Luminometrede Ölçülmesi

CIV 012L genine ait rekombinant plazmitlerin aktarıldığı hücreler enfeksiyondan 6 saat sonra petrilerden alındı. Hücrelerden lusiferaz proteininin izolasyonu lusiferaz kitinin (Promega, Kat No: E1910) içerisinde bulunan kullanma yöntemine göre gerçekleştirildi. Buna göre belirtilen inkübasyon zamanının sonunda, hücreler cam deney tüplerine transfer edildi. Tüpler 300 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki hücrelerin üzerine 2 ml PBS ilave edilerek hücreler yıkandı ve tekrar santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çökelti 250 µl 1X parçalama tamponunda (kitte mevcut) çözüldü ve buz üzerine yerleştirildi. 10–15 sn vorteksledi ve hücrelerin tamamen parçalanmasını sağlamak için 2 kez sıvı azota daldırılıp çıkarıldı. 12.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra proteini ihtiva eden süpernatant kısmı temiz tüplere alındı.

Promotor plazmitleri ve kontrol plazmiti tarafından ekspreslenen lusiferaz proteinlerinin ölçümü luminometre (Berthold)'de gerçekleştirildi. Ölçme işlemleri luminometre cihazına ait özel tüplerde yapıldı. Bir tüpe 20 µl protein örneklerinden ve 100 µl kit içinde bulunan "Luciferase Assay Reagent" den bırakıldı. Karışım luminometre cihazındaki özel bölgeye yerleştirildi ve cihazın numunedeki "ateşböceği" ve "Renilla" lusiferaz protein değerlerini okuması sağlandı. İki değer birbirine oranlanarak ekspresyon değeri elde edildi.

2.7. CIV 012L Geninin Fonksiyonel Analizi

2.7.1. Çalışmada Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar esnasında kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları

Tampon adı	Tampon bileşenleri
10X Aktivite Tamponu	100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 500 mM NaCl, 20 mM DTT, % 10 gliserol, 1 mg/ml BSA
10X Birleştirme Tamponu	500 mM Tris-HCl (pH: 7.5) ve 1000 mM KCl
10X TBE Tamponu	108 gr Tris, 55 gr Borik asit ve 7,5 gr Na ₂ EDTA 1 litre ddH ₂ O'da çözülür
2X Reaksiyon Sonlandırma Boyası	% 95 formamide, % 0,05 bromophenolblue, % 0,05 xylene cyanol, 20 mM EDTA pH:8,0

2.7.2. CIV 012L Geninin PCR ile Çoğaltılması

CIV 012L geninin çoğaltılacağı PCR reaksiyonu, gene ait ileri ve geri primerler (ExoFw 5'-**GAATTCATGGGTATTAATATTTTTTTTAAATGG**-3'; ExoRv 5'-**CTCGAGACGAAGATAATTGTTTTAATGG**-3') kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1 µl	CIV genomik DNA'sı	95 °C'de 2'	
1 µl	ExoFw (ileri primer)		
1 µl	ExoRv (geri primer)	95 °C'de 30"	} 35 döngü
1 µl	dNTP	50 °C'de 1'	
2 µl	MgCl ₂	72 °C'de 1'	
10 µl	Tampon		
0,5 µl	Phusion DNA polimeraz	72 °C'de 5'	
33,5 µl	ddH ₂ O	4 °C'de ∞	

neticede oluşan ürün %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi ve çoğaltılan gene ait DNA fragmenti jelde görüntülendi.

PCR ile çoğaltılan CIV 012L genine ait DNA fragmenti, CloneJET PCR Klonlama Kiti (Fermentas, Kat No: K1231) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı (10 µl 2X reaksiyon tamponu, 2 µl PCR ürünü, 1 µl pJET1.2/blunt, 1 µl T4 DNA ligaz). Klonlama sonucunda

oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler Bölüm 2.5'te anlatıldığı şekilde izole edildi. Klon olduğunu teyit etmek için *EcoR* I ve *Xho* I restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı ve PCR ürününün jeldeki varlığı araştırıldı. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonlardan 2 tanesi, DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için Macrogen Firmasına (Kore) gönderildi. Elde edilen sonuçlar Genbank'taki (NCBI) verilerle karşılaştırıldı.

2.7.3. CIV 012L Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Dizin analizi sonucunda içerisinde CIV 012L geni olduğu kesinleşen pJET1.2/blunt vektörü kitle (Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega) izole edildi. pET-28a(+) ekspresyon vektörü ve içerisinde CIV 012L geni taşıyan pJET1.2/blunt vektörü, daha önceden ortak olarak tasarladığımız *EcoR* I ve *Xho* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Reaksiyon;

20 µl plazmit DNA (Rekombinant pJET1.2/blunt / pET-28a(+) vektörü)

3 µl 10X TA tampon

1 µl *EcoR* I

1 µl *Xho* I

5 µl H₂O

içecek şekilde hazırlandı ve 37 °C'de 3 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Kesim sonrası plazmitler %1'lik jelde yürütülerek, hem ekzonükleaz genine ait parça hem de lineer hale dönüşen pET-28a(+) ekspresyon vektörü "Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma kiti (Macherey-Nagel)" kullanılarak jelden temizlendi.

Her iki enzimle kesilmiş gen ürünü ve vektörün birleştirilmesi, toplam 10 µl hacimde yapıldı. Reaksiyon 1 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1µl T4 DNA ligaz (10 ünite/µl), 2 µl ekspresyon vektörü ve 5µl gen ürünü kullanılarak 16 °C'de 16 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünü CaCl₂ transformasyon metoduyla *E.coli* DH5α suşuna aktarıldı. Transformasyon için, 200 µl alıcı konak hücre içeren tüpe 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 42 °C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 2 dakika bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler 37 °C'de iki saat bekletildikten sonra hücreler 6000×g'de 3 dakika santrifüj edildi, oluşan çökelti daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml kanamisin içeren) yayılarak 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. pET-28a(+) ekspresyon vektör

sisteminde *lac* operon sistemi bulunmadığından X-gal ve IPTG kullanarak mavi-beyaz koloni oluşturma imkanı bulunmamaktadır. Bu sebepten ötürü petri üzerinde oluşan kolonilerin hangisinin geni taşıdığını belirlemek için kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Seçilen koloniler 3 ml (50 µg/ml kanamisin içeren) LB besiyeri üzerinde bir gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden plazmit izolasyon kiti ile plazmitler izole edildi. İzole edilen plazmitler *EcoR* I ve *Xho* I restriksiyon endonükleazları ile kesilerek klonlamanın olup olmadığı kontrol edildi ve pozitif olanlardan bir tanesi seçilerek ekspresyon için *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine aktarıldı.

2.7.4. CIV 012L Geninin *E. coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonunun Gözlenmesi

CIV 012L genini içeren plazmidin transforme edildiği *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinden rastgele belli sayıda koloni seçildi ve genin ekspresyonu için araştırıldı. Rastgele seçilen koloniler 16 saat inkübe edildikten sonra tekrardan her biri iki tüpe yeniden ekildi ve 3 saat inkübe edildikten sonra tüplerden bir tanesi 1 mM IPTG ile indüklenerek, diğeri ise indüklenmeden 3 saat daha büyütüldü. Seçilen kolonilerle beraber kontrol olarak *E. coli* BL21(DE3)pLysS’nin kendisi de indüklendi. Sonrasında hücreler santrifuj ile çöktürülerek her ml’si 2 mg lizozim içeren 50 mM Tris-HCl (pH: 7.5) ve 1 mM DTT’den oluşan tamponda çözülerek sonikatör ile patlatıldı. 9000 rpm’de 20 dakika santrifuj edilerek çökelti uzaklaştırıldı. Süpernatant %12’lik SDS-PAGE’de yürütülerek sonuçlar gözlemlendi. SDS-PAGE analizi Maniatis ve arkadaşlarına göre (Maniatis vd., 1989) yapıldı.

2.7.5. Proteinin Saflaştırılması

Proteinin saflaştırılması, Ni-NTA affinite kromatografisi kullanılarak yapıldı. Ekspresyonun gözlemlendiği *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinden bir tanesi seçilerek 5 ml LB içerisinde gece boyunca büyütüldü. Sonrasında 300 ml 50 µg/ml kanamisin içeren taze besiyerine OD₆₀₀’da 0,1 olacak yoğunlukta seyreltilerek yeniden ekildi. OD₆₀₀’da hücre yoğunluğu 0,6 olana kadar hücreler 37 °C’de büyütüldü ve son hacim 1 mM olacak şekilde IPTG ile hücreler indüklendi. İnkübasyona 24 °C’de 16 saat daha devam edildi ve

sonrasında protein izolasyonu ve ekspresyonun gözlenmesi aşağıdaki adımlar takip edilerek belirlendi.

2.7.5.1. Ni-NTA Affinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırma

İndüklemenin ardından protein saflaştırma işlemine geçildi. Proteini saflaştırmak için MagneHis™ Protein Purification System (Promega Kat No: V8500) kiti kullanıldı. Saflaştırma işlemi firma tarafından tavsiye edilen yönteme göre gerçekleştirildi: 16 saat 24 °C’de indüklenen bakteriyal kültür 5000×g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı atıldı, hücre kısmı 2 ml 1X Hücre parçalama tamponunda (kitte mevcut) çözüldü, bu hücre lizatına 1 µl DNaz I enzimi ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre lizatı 5 dakika sonikatöre maruz bırakıldı. Sonikasyondan sonra 9000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek hücresel atıkların çöktürülmesi sağlandı. Proteini içeren sıvı kısmı alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve Histidin kuyruğuna sahip olan CIV 012L proteininin bağlanması için 40 µl nikel partikülü ilave edildi. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Tüp mıknatıslı düzeneğe yerleştirildi, proteini bağlayan nikel partiküllerinin tüpün kenarına tutunması için 30 saniye beklendi. Nikele bağlanmayan proteinlerin bulunduğu supernatant kısmı atıldı ve tüp mıknatıslı düzeneden uzaklaştırıldı. Proteinin bağlı olduğu nikel partikülleri 3 kez MagneHis™ bağlanma/yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra protein bağlı nikel partikülleri üzerine MagneHis Elution tamponu ilave edildi. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tüp mıknatıslı düzeneğe yerleştirilerek nikellerin tutunması sağlandı, proteini içeren sıvı kısmı yeni bir tüpe aktarıldı. Daha sonra saflaştırılan protein % 12’lik SDS-PAGE’e yüklendi. Saflaştırılan proteinin miktarı nanodrop (ThermoScientific) ile spektrofotometrik olarak belirlendi.

2.7.5.2. Western Hibridizasyonu

CIV 012L proteininin *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinde ekspres olup olmadığını daha özgün bir şekilde saptamak için western hibridizasyonu yapıldı. Hibridizasyon 2 aşamadan oluşur. Birinci aşamada %12’lik SDS-PAGE’de yürütülen proteinler jel boyanmadan Mini Trans-Blot® Elektroforetik Transfer Cell (Bio-Rad) cihazı yardımıyla ıslak emdirim (Wet Blotting) yapılarak PVDF membrana (Millipore, Kat No:

IPVH00010) aktarıldı. Membrana aktarımdan sonra hedeflenen protein immünojenik etkileşimlerle saptanacağı için membrana aktarılmış proteinlerin bulunduğu yerler dışındaki boşluklar bir kapatma (blocking) ajanı ile kapatıldı. Bu kapatma işlemi için PBS ile hazırlanan %3'lük yağsız süt tozu (Sigma, Kat No: BCR685) kullanıldı. İkinci aşamada ise aktarım ve kapatma yapıldıktan sonra saptama işlemine hazır hale getirilmiş membran, önce birincil antikor olan Monoklonal Anti-poly Histidin antikor (Sigma Kat No: 5588) ile reaksiyona sokuldu, sonra bu antikor da alkalın fosfataz bağı ikinci antikor Anti-Mouse IgG (Sigma, Kat No: M7023) ile işleme sokuldu. Son olarak alkalın fosfataz'ın substratı olan NBT-BCIP (Roche, Kat No: 11 681 451 001) substrat çözeltisi ortama ilave edildi.

2.7.6. Enzimin Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

2.7.6.1. Ekzonükleaz Aktivitesinde Kullanılacak Sentetik Primer Substratlarının Belirlenmesi

Enzimin ekzonükleaz aktivitesinin analizi için substrat olarak belirli uzunlukta primerler sentezletirildi (Integrated DNA Technologies). Bu primerler 50 nükleotid uzunluğunda olup bir tanesi 5' ucundan diğeri de 3' ucundan biyotin ile işaretlidir. Bu primerlere kalıp olarak kullanılacak primerler işaretsiz olup uç kısımlarında 10 nükleotidlik eşleşmeyen bölgeler bulunmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Ekzonükleaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan DNA substratları

Primer Adı	Primer DNA dizisi
5' BİO primer	5'/Bio/ATGGAGAAAACAATGTTTGCATATTCGTGGCAT CAAACAGATCC TACTG-3'
3' BİO primer	5'-TCCAGGTTGCCTGTTTGTATGCCACGAATATGCA AACAT GTTTTCTCCAT /Bio/ -3'
ExodigestF kalıp	5'-ATGGAGAAAACAATGTTTGCATATTCGTGGCAT CAAACAGATCCTACTG-3'
ExodigestR kalıp	5'- <u>TCCAGGTTGCCTGTTTGTATGCCACGAATATGCA</u> AACAT GTTTTCTCCAT-3'

*Altı çizili nükleotidler eşleşme yapmaz.

Yukarıdaki DNA substratlarına ilave olarak enzimin ekzonükleaz aktivitesini belirlemek için ayrıca *Pst*I ile lineer hale getirilmiş pUC18 plazmit DNA'sı da substrat olarak kullanıldı.

2.7.6.2. Sentetik primer substratlardan Çift Zincir DNA Substratlarının Hazırlanması

1X birleştirme tamponu kullanılarak, kalıp tek zincir DNA ile primer tek iplik DNA, Tablo 5'de belirtilen kombinasyonlarda karıştırılarak çift zincir DNA substratları hazırlandı. Bunun için 50 nükleotid uzunluğunda olan 3'BİO primeri ile 3' ucunda 10 nükleotidlik eşleşmeyen bölge bulunan kalıp (ExodigestF) ve 50 nükleotid uzunluğunda olan 5'BİO primeri ile 5' ucunda 10 nükleotidlik eşleşmeyen bölge bulunan kalıp (ExodigestR) hibridize edildiler. Reaksiyon karışımı ısıtıcıda 95 °C'de 5 dakika bekletilerek var olan tüm spesifik olmayan eşleşmelerin erimesi sağlandı. Sonra yavaş yavaş soğutularak kalıp iplik ile primerin hibridize olması sağlandı.

Tablo 5. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan çift zincir DNA substratları

DNA eşleşmeleri	DNA iplikçiklerine ait eşleşmeler
5'BİO/ExodigestR	5'/Bio/ATGGAGAAAACAATGTTTGCATATTCGTGGCATCAAACAGATCCTACTG-3' 3'-TACCTCTTTTGTACAAAACGTATAAGCACCGTAGTTTGTCCGTTGGACCT-5'
3'BİO/ExodigestF	5'TCCAGGTTGCCTGTTTGTATGCCACGAATATGCAAACATGTTTTCTCCAT/Bio/-3' 3'-GTCATCCTAGACAAACTACGGTGCTTATACGTTTGTAAACAAAAGAGGTA-5'

2.7.6.3. 3'-OH Ucundan Biyotin İşaretli Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

Primere ait 3'-OH ucunda biyotin içeren çift zincir DNA, substrat olarak kullanılarak enzimin çift zincir üzerinde 5' ekzonükleaz aktivitesi araştırıldı. Reaksiyon toplam 10 µl hacimde şu bileşenlerden oluştu: 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂, 10 ng CIV 012L proteini ve 1 ng substrat DNA. Reaksiyonlar 37 °C'de 1, 5, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 5 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı. 10 µl reaksiyon örneği 7M üre-%20'lık PAGE'de yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jelde yürütülen biyotin işaretli DNA'lar Mini Trans-Blot® Elektroforetik Transfer Cell (Bio-Rad) cihazı yardımıyla ıslak emdirim (Wet Blotting) yapılarak pozitif yüklü naylon membrana (Hybond, Kat No: RPN303B) aktarıldı. Membrana aktarılan DNA'ları görünür hale getirmek için "Biotin Chromogenic Detection Kit"(Fermentas, Kat No: K0661)'i kullanıldı. DNA'ları ihtiva eden membran, 30 ml Blocking/Washing tamponu ile 5 dakika oda sıcaklığında yıkandı. Bu süre sonunda Blocking/Washing tamponu dökülerek membran 30 ml Blocking solüsyonu ile 30 dakika yıkandı. Bloklama basamağının ardından membran streptavidin-alkalin fosfataz konjugatını içeren 20 ml solüsyon ile 30 dakika yıkandı. Membran tekrar 60 ml Blocking/Washing tamponu ile 30 dakika daha yıkandı. Son olarak membran 20 ml Detection tamponu ile 10 dakika yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra ortama alkalin fosfatazın substratı olan ve parçalandığında mavi-mor renk oluşturan NBT/BCIP solüsyonu ilave edildi. Membranda oluşan mavi-mor renkli DNA bantlarına bakılarak 5' ekzonükleaz aktivitesinin olup olmadığına karar verildi.

2.7.6.4. Lineer Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

Pst I ile lineer hale getirilmiş pUC18 plazmit DNA'sı substrat olarak kullanılarak 5' ekzonükleaz aktivitesi araştırıldı. Reaksiyon toplam 10 µl hacimde şu bileşenlerden oluştu: 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂, 10 ng CIV 012L proteini ve 5 ng substrat DNA. Reaksiyonlar 37 °C'de 1, 5, 15, 30, 45 ve 60 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 5 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı. 10 µl reaksiyon örneği % 1'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.7.6.5. Lineer Tek Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

3' ucu biyotin işaretli primer kullanılarak enzimin tek zincir DNA üzerinde 5' ekzonükleaz aktivitesi araştırıldı. Reaksiyon toplam 10 µl hacimde şu bileşenlerden oluştu: 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂, 10 ng CIV 012L proteini ve 1 ng substrat DNA. Reaksiyonlar 37 °C'de 1, 5, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 5 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı. 10 µl reaksiyon örneği 7M üre-%20'lik PAGE'de yürütüldü. Jeldeki DNA'ların membrana aktarımı ve görünür hale getirilmesi yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı.

2.7.6.6. 5'-OH Ucundan Biyotin İşaretli Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 3' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

Primere ait 5'-OH ucunda biyotin içeren çift zincir DNA substrat olarak kullanılarak enzimin çift zincir üzerinde 3' ekzonükleaz aktivitesi araştırıldı. Reaksiyon toplam 10 µl hacimde şu bileşenlerden oluştu: 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂, 10 ng CIV 012L proteini ve 1 ng substrat DNA. Reaksiyonlar 37 °C'de 1, 5, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakika olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 5 µl 2X sonlandırma boyası eklenerek sonlandırıldı. 10 µl reaksiyon örneği 7M üre-%20'lik PAGE'de yürütüldü. Jeldeki DNA'ların membrana aktarımı ve görünür hale getirilmesi yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı.

2.7.7. Enzimin Endonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

2.7.7.1. Endonükleaz Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Endonükleaz aktivitesinin zamana bağlı değişimini belirleyebilmek için 1, 5, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakikalık sürelerde aktivite denemesi yapıldı. Reaksiyonlar toplam 10 µl hacim içinde CIV 012L proteini (10 ng), süper sarmal pUC18 (30 ng) plazmidi, 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂ içerecek şekilde hazırlandı ve 37 °C'de inkübe edilerek gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jelde 1 saat elektroforez edilerek aktivitenin zamana bağlı değişimi incelendi.

2.7.7.2. Optimum Bir ve İki Değerlikli Katyon Derişiminin Belirlenmesi

CIV 012L genine ait proteininin biyokimyasal özelliklerini belirlemeye yönelik olarak Mg⁺² ve Mn⁺² divalent, Na⁺ ve K⁺ monovalent olarak kullanıldı (Tablo 6). Reaksiyonlar 10 µl'lik hacimde şu bileşenlerden oluştu: CIV ekzonükleaz proteini (10 ng), süper sarmal pUC18 (30 ng) plazmidi, 1X aktivite tamponu, monovalent katyonlar için 5-300 mM konsantrasyonlarda KCl veya NaCl, divalent katyonlar için 1-50 mM arası MgCl₂ ya da MnCl₂. Reaksiyonlar 37 °C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde 1 saat elektroforez edildi.

Tablo 6. Optimum Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na ve K değerinin belirlenmesinde kullanılan divalent ve monovalent iyonlara ait derişimler

	$MgCl_2$	$MnCl_2$	KCl	NaCl
Derişim (mM)	1	1	5	5
	5	5	10	10
	10	10	50	50
	15	15	150	150
	20	20	300	300
	25	25		
	30	30		
	35	35		
	40	40		
	45	45		
	50	50		

2.7.7.3. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi

Yine pUC18 plazmit DNA'sı substrat olarak kullanılarak pH'nın CIV 012L proteini üzerine olan etkisi belirlendi. pH için Tris-HCl ve Glisin-NaOH tamponları kullanılarak Tablo 7'deki pH değerleri hazırlandı. Her bir tampon aralığı için aktivite tamponu ayrı ayrı hazırlandı ve bu tamponlar, CIV ekzonükleaz proteini (10 ng), süper sarmal pUC18 (30 ng) plazmidi ve 10 mM $MgCl_2$ içeren reaksiyona ilave edilerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde analiz edildi ve en uygun pH değeri belirlenmeye çalışıldı.

Tablo 7. Optimum pH değerinin belirlenmesinde kullanılan pH aralıkları

Tamponlar	pH aralıkları								
Tris-HCl	5,9	6,5	7,2	7,6	8,0	8,4	8,7	9,2	
Glisin-NaOH						8,4	8,7	9,2	10,0

2.7.7.4. Sıcaklığın Enzim Aktivitesine Etkisi

CIV 012L proteinine sıcaklığın etkisini belirlemek için hazırlanan 10 µl'lik reaksiyon şu bileşenlerden oluştu: CIV 012L proteini (10 ng), pUC18 (30 ng) plazmidi, 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂. Reaksiyonlar 24, 28, 37, 42, 50, 55, 60 °C'lerde 30 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek aktivite için en uygun sıcaklık belirlenmeye çalışıldı.

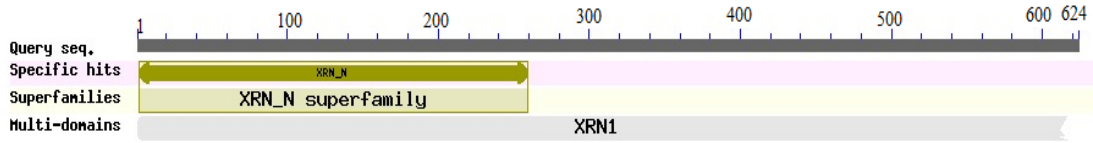
2.7.7.5. EDTA'nın Enzim Aktivitesine Etkisi

Metal bağlama özelliği olan EDTA'nın enzim aktivitesine etkisini belirleyebilmek için reaksiyonlara 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlarda ilave edildi. 10 µl'lik reaksiyon hacmi şu bileşenlerden oluştu: CIV 012L proteini (10 ng), pUC18 (30 ng) plazmidi, 1X aktivite tamponu, 10 mM MgCl₂ ve belirtilen konsantrasyonlarda EDTA. Reaksiyonlar 37 °C'de 30 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek EDTA'nın etkisi belirlenmeye çalışıldı.

3. BULGULAR

3.1. CIV 012L Geninin Biyoinformatik Analizi

Potansiyel bir ekzonükleaz geni olarak belirtilen CIV 012L geninin amino asit sırası ve sahip olduğu motifler bu tez çalışmasında ayrıntılı olarak incelendi. CIV 012L geninin amino asit sırası içinde, 5'-3' ekzonükleazlara ait XRN_N aktif bölgesi (XRN 5'-3' ekzonükleaz N ucu) arandı. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) sitesindeki Blast programı (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanıldı. Analiz sonucunda, CIV 012L geninin XRN_N bölgesinin, 2– 259'uncu amino asitler arasında bulunduğu belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. CIV 012L geninin amino asit sırasının belirlenen korunmuş bölgeleri

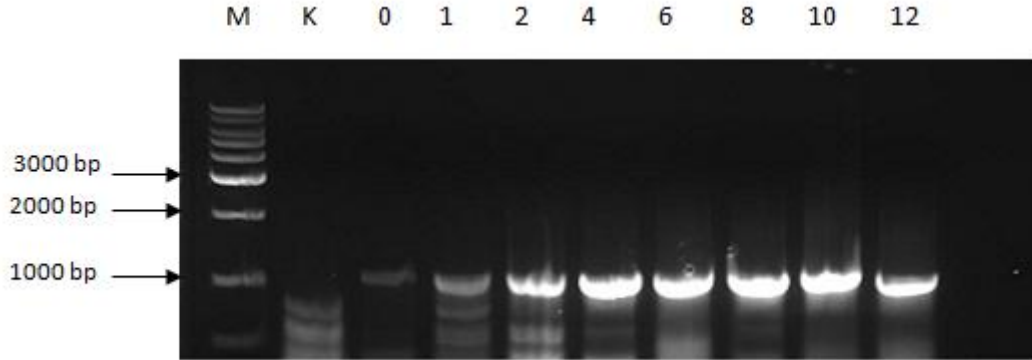
Ayrıca, CIV 012L geninin amino asit dizisi, Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) programı kullanılarak, farklı virüs gruplarında belirlenen ekzonükleaz genlerinin amino asit dizileriyle karşılaştırıldı (Ek Şekil 1). CIV 012L geni en yüksek benzerliği % 98 oranında Invertebrate iridescent virüs 3'ün kodladığı muhtemel bir ekzonükleaz olduğu belirtilen MIV059L açık okuma zinciri ile göstermiştir.

3.2. CIV 012L Geninin Transkriptomik Analizi

3.2.1. Transkripsiyon Kinetiğinin ve Sınıfının Belirlenmesi

Ekzonükleaz geninin SPC-BM-36 hücrelerindeki replikasyonunu transkripsiyonel olarak belirlemek, genin transkripsiyon saatini ve hangi gen ekspresyon sınıfına ait olduğunu tespit etmek amacıyla RT-PCR deneyi yapıldı.

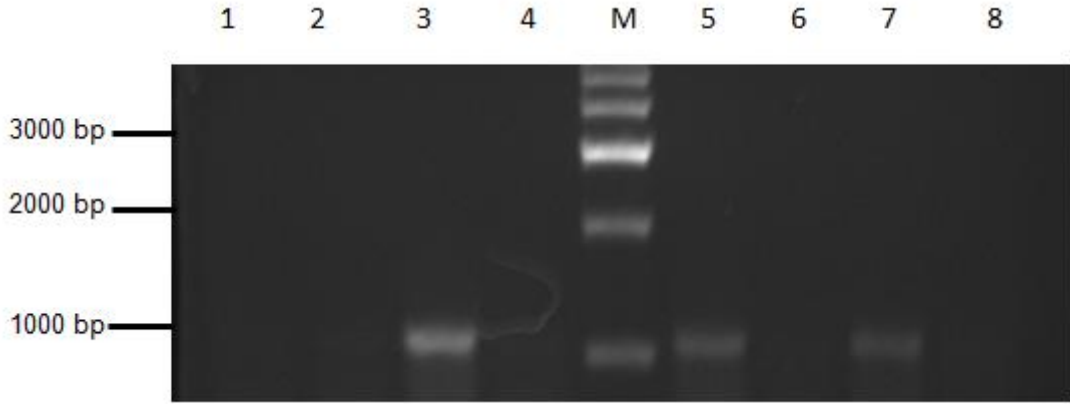
Transkripsiyon süresini belirlemek için virüs enfeksiyonundan sonra farklı zaman dilimlerinde RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen toplam RNA örnekleri ile gene ait özel primerler (012L-F ve 012L-R) kullanılarak RT-PCR deneyi gerçekleştirildi. Sonuçlar, 012L kodlu genin transkripsiyonunun, virüsün hücreleri enfeksiyonunu takip eden 0. ve 1. saatler arasında başladığını gösterdi. Ayrıca enfeksiyondan sonraki 4. saatte, transkripsiyonun yoğunlaştığı ve daha sonraki saatlerde de aynı yoğunlukta devam ettiği belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. CIV 012L geninin zamana bağlı transkripsiyonunun RT-PCR sonucu. saatler CIV ile enfekte edilmiş Bm hücrelerinden, hücre lizatlarının elde edilmiş zamanını göstermektedir. M; marker (1000 bp, Fermentas). K (Kontrol): Bm hücre lizatlarından elde edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Virüs genlerinin ifade edildiği gen ekspresyon sınıfını belirlemek için, DNA sentez inhibitörü ve protein sentez inhibitörünün kullanımı, yaygın bir yöntemdir. Bu işlem için, CIV'nin SPC-BM-36 hücre kültüründe enfeksiyonu sırasında DNA sentez inhibitörü Ara-C ve protein sentezi inhibitörü sikloheksimit kullanılarak yapılan deneyde, ekzonükleaz transkripti hem Ara-C ve sikloheksimit inhibitörlerinin varlığında hem de yokluğunda

tespit edilmiştir (Şekil 13). Bu sonuç ekzonükleaz geninin “en erken gruba” ait bir gen olduğunu göstermektedir.



Şekil 13. CIV 012L geninin transkripsiyon sınıfını gösteren RT-PCR sonucu. M; marker (1000 bp, Fermentas). 1- Hüresel RNA'dan yapılan RT-PCR, 2- Hüresel RNA'dan yapılan PCR, 3- Ara-C ile muamele edilmiş ve CIV ile enfekte olmuş hücrelerden izole edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR, 4- Üç numaralı örnekten yapılan kontrol PCR, 5- Cyc ile muamele edilmiş ve CIV ile enfekte olmuş hücrelerden izole edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR, 6- Beş numaralı örnekten yapılan kontrol PCR, 7- CIV ile enfekte olmuş hücrelerden izole edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR, 8- Yedi numaralı örnekten yapılan kontrol PCR.

3.2.2. CIV 012L Geninin Translasyona Uğramayan 5' Ucunun Belirlenmesi

CIV 012L geninin transkripsiyon başlangıç noktasını bulabilmek için 5'-RACE analizi gerçekleştirildi. Böylece genin mRNA'sındaki proteine dönüşmeyen 5' kısmının baz dizisi tespit edildi. Elde edilen klonların dizin analizi sonuçları bu genin transkripsiyon başlangıç noktasının, translasyon başlangıç noktası +1 olarak alındığında, -30. pozisyonundaki A bazı olduğunu gösterdi (Şekil 14).



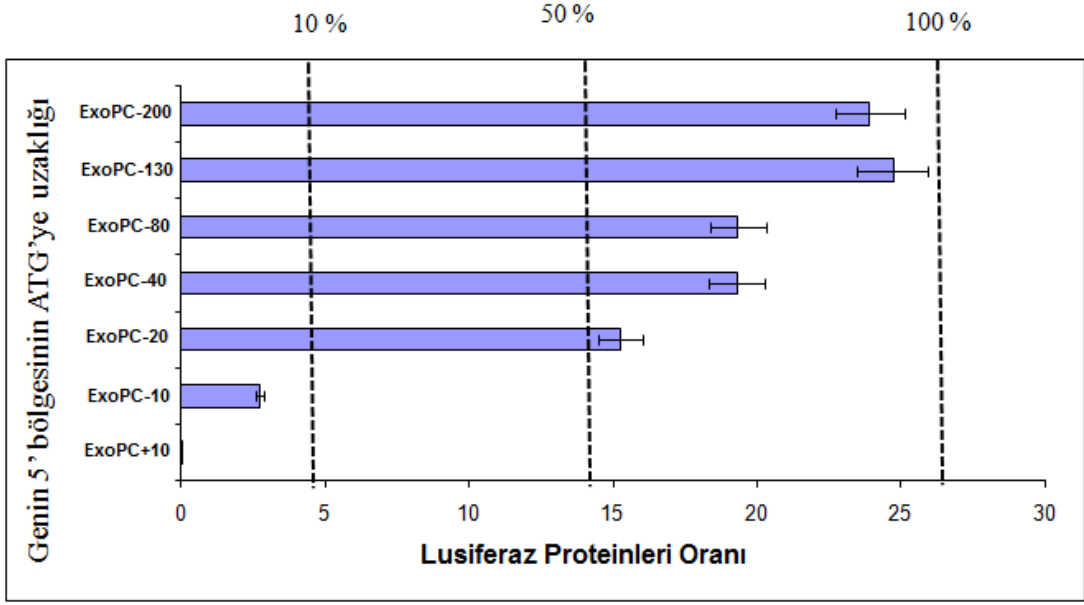
Şekil 14. CIV 012L geni transkriptinin 5' translasyona uğramayan bölgesi. Translasyon başlangıç noktası +1 olarak alındı. Koyu olarak belirtilmiş sıralar 5'-translasyona uğramayan sırayı (5'UTR) göstermektedir. 5'-RACE analizi için kullanılan primerler, SP1, SP2 ve SP3 olarak belirtilmiştir. Translasyon başlangıç noktası (ATG) italik ve altı çizilidir.

3.3. CIV 012L Geninin Promotor Bölgesinin Belirlenmesi

Genin transkripsiyonal aktivasyonundan sorumlu DNA sıralarını tayin edebilmek için ikili lusiferaz deneyi yapıldı.

5'-RACE analizi sonuçlarına göre -30. bazda transkripsiyon başlangıç noktası tespit edilen CIV 012L geni için 200 ile 11 nükleotid uzunlukları arasında değişen promotor fragmentlerine sahip 7 farklı rekombinant plazmid test edildi. Lusiferaz aktivitesi 200 ve 130 nükleotid uzunluklardaki DNA fragmentlerine sahip plazmidler arasında oldukça yüksek seviyelerde iken, 80 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmidde

%80 oranlarına düştü ve 40 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmidde de yaklaşık bu seviyede devam etti. Lusiferaz aktivitesi 20 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmidde %60 oranlarına düştü. 10 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentinin klonlandığı rekombinant plazmidde ise aktivitede belirgin bir düşüş tespit edildi. Bu sonuçlara göre ekzonükleaz geninin promotor bölgesinin önemli bir kısmının -20 ve -10 noktaları arasında olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 15).



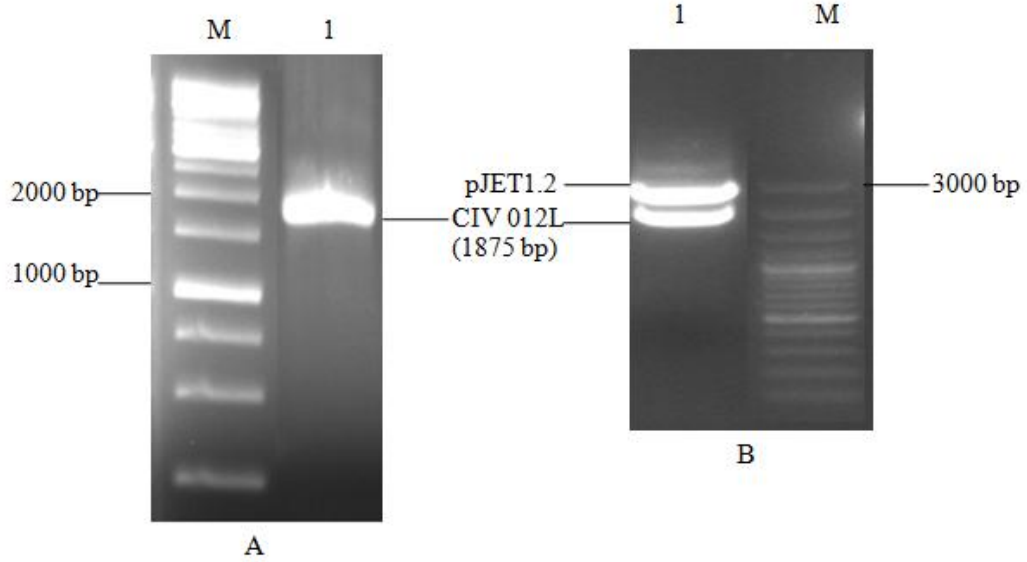
Şekil 15. CIV 012L geninin promotor analizi. *Bombyx mori* hücreleri CIV mevcudiyetinde ekzonükleaza ait promotor plazmidleri ile transfeksiyon yapıldı. Firefly lusiferaz aktivitesi renilla lusiferaz aktivitesi ile orantılı olarak hesap edildi.

3.4. CIV 012L Geninin Fonksiyonel Analizi

3.4.1. Genin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

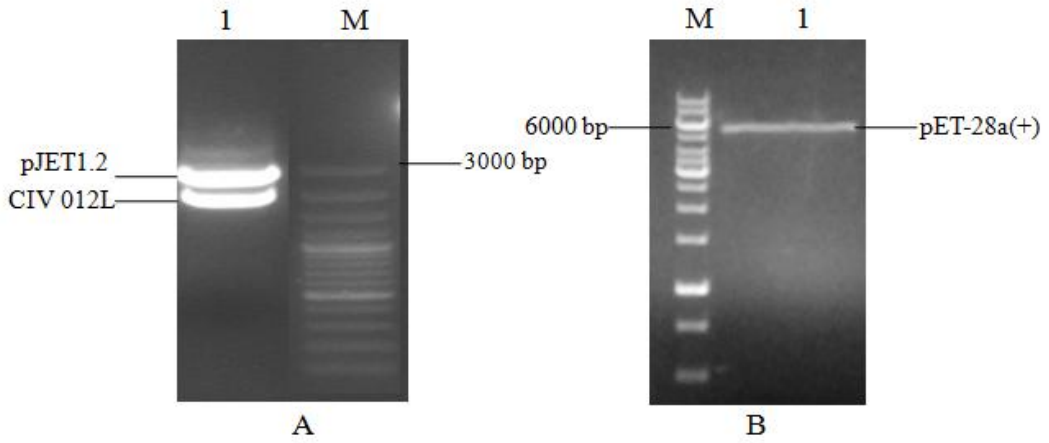
Gen ekspresyonu ve karakterizasyonu çalışmalarında öncelikle karakterize edilecek genin tüm nükleotid sırasının çoğaltılıp doğrulanması ve sonrasında uygun bir ekspresyon vektörüne klonlanması gelir. Bu amaçla, 012L geni viral genomik DNA'dan PCR ile çoğaltıldı. PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 16). PCR sonucu elde edilen

DNA parçası pJET1.2/blunt klonlama vektörüne klonlandı. Klonlanan genin doğruluğu dizin analizi ile teyit edildi.



Şekil 16. CIV 012L geninin pJET1.2/blunt vektörüne klonlanması. A: CIV 012L geninin PCR analizi. 1: CIV 012L geninin PCR ürünü, M: 1000 bp marker (Fermentas), B: CIV 012L genini içeren pJET1.2/blunt vektörünün *EcoR* I ve *Xho* I ile kesimi. 1: Kesim ürünü, M: 1000 bp Marker (Fermentas)

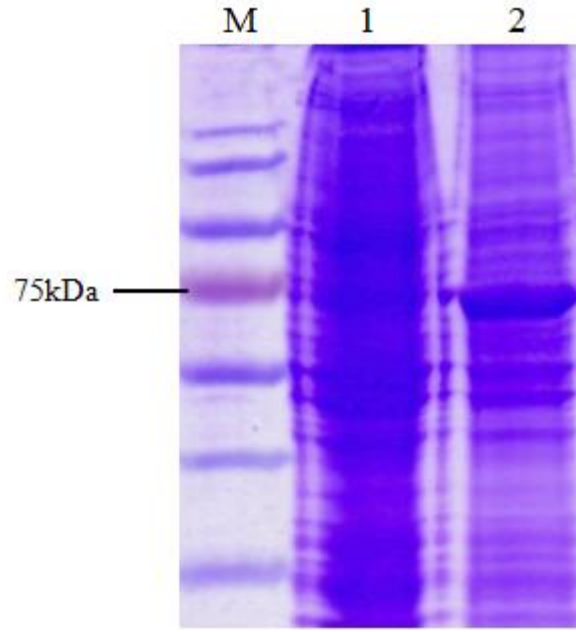
Sekans edilerek içerisinde 012L geni olduğu kesinleşen pJET1.2/blunt vektörü *EcoR* I ve *Xho* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi ve 012L genine ait DNA fragmenti elde edildi. Bu DNA fragmenti aynı enzimlerle kesilmiş pET-28a(+) vektörüne klonlandı (Şekil 17). CIV ekzonükleaz geninin klonlandığı pET-28a(+) vektörü, pET+exo olarak adlandırıldı ve ekspresyon için *E.coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine kalsiyum klorür metodu ile aktarıldı.



Şekil 17. CIV 012L geninin pET-28a(+) vektörüne klonlanması. A. (1) CIV 012L genini içeren pJET1.2/blunt vektörünün *EcoR* I ve *Xho* I ile kesimi. M: 1000 bp marker (Fermentas) B. (1) pET- 28a(+) vektörünün *EcoR* I ve *Xho* I ile kesimi. M: 1000 bp marker (Fermentas).

3.4.2. pET+exo Vektörünün *E. coli* BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transformasyonu ve Ekspresyonun Gözlenmesi

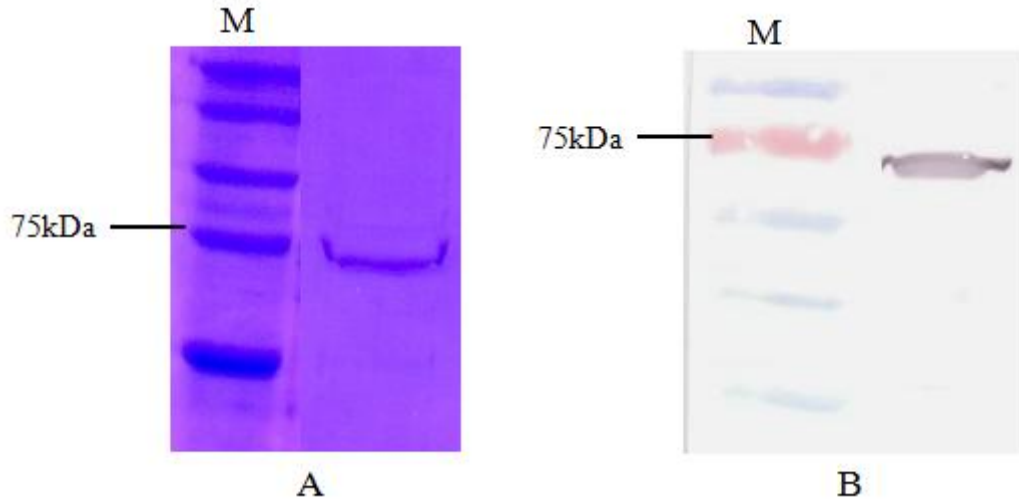
Ekspresyon, *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinde gerçekleştirildi. Gece kültüründen, OD₆₀₀'de 0,1 yoğunlukta olacak şekilde taze besiyerine ekilen hücreler 3 saat büyütüldükten sonra 1 mM IPTG ile indüklendiğinde CIV 012L proteininin *E. coli* BL 21'de ekspresyonu için yeterli olduğu gözlemlendi. İndükleme sonrası hücreler 16 saat daha büyütülerek protein izole edildi (Şekil 18).



Şekil 18. CIV 012L proteininin *E.coli* BL21 hücrelerinde ekspresyonunun SDS- PAGE analizi. M: Marker (Promega)1: *E.coli* BL21 hücre ekstraktı, 2: CIV 012L proteininin *E.coli* hücrelerinde ekspresyonu

3.4.3. CIV 012L Proteininin Saflaştırılması

Proteinin saflaştırılması Ni-NTA Affinite Kromatografisi ile gerçekleştirildi. Bunun için de MagneHisTM Protein Purification System (Promega) kiti kullanıldı. Kite yer alan protokole göre saflaştırılan protein %12'lik SDS-PAGE'e yüklendi ve moleküler ağırlığının teorik olarak hesaplanan moleküler ağırlığı (72,446) ile uyumlu olduğu belirlendi (Şekil 19). Ayrıca CIV 012L proteininin *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücrelerinde ekspres olup olmadığını daha özgün bir şekilde saptamak için western hibridizasyonu yapıldı. Bu deney sonucunda da proteinin oldukça yüksek oranda ekspreslendiği tespit edildi (Şekil 19). Saflaştırılan proteinin yoğunluğu nanodrop ile ölçülerek, 244 ng/μl olarak belirlendi.

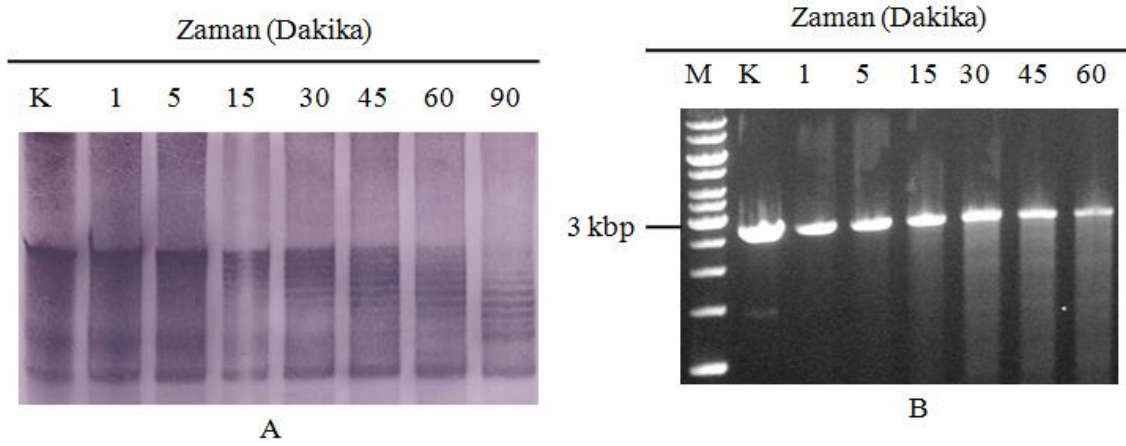


Şekil 19. Saflaştırılan CIV 012L proteininin analizi. (A) SDS-PAGE ve (B) Western Hibridizasyonu analizi M: Marker (Promega)

3.4.4. Enzimin Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

3.4.4.1. Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

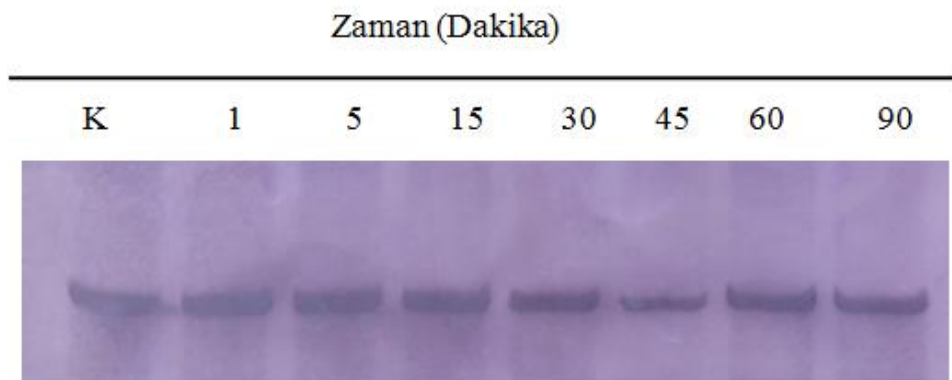
Hem primere ait 3'-OH ucunda biyotin içeren çift zincir DNA hemde *Pst* I enzimi ile lineer hale getirilmiş pUC18 plazmit DNA örnekleri 5' ekzonükleaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanıldı. Zamana bağlı olarak yapılan aktivite deneyinde, enzimin sarkık uca sahip olan biyotin işaretli DNA'dan nükleotidleri 5'-3' yönünde tek tek keserek uzaklaştırdığı gözlemlendi (Şekil 20-A). pUC18 plazmit DNA'sının kullanıldığı aktivite deneyinde ise lineer çift zincir DNA'nın konsantrasyonunun zamana bağlı olarak azaldığı fakat büyüklüğünün değişmediği gözlemlendi (Şekil 20-B). Bu durum enzimin, her bir uçtan nükleotidleri hidroliz ederek DNA'yı kestiğini göstermektedir.



Şekil 20. Çift zincir linear DNA kullanılarak 5' ekzonükleaz aktivitesinin analizi. (A) üre-PAGE ve (B) agaroz jel analizi. M: 1 kb DNA marker (Fermentas). K: Enzim içermeyen kontrol reaksiyonu

3.4.4.2. Tek Zincir DNA Substratı Kullanılarak 5' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

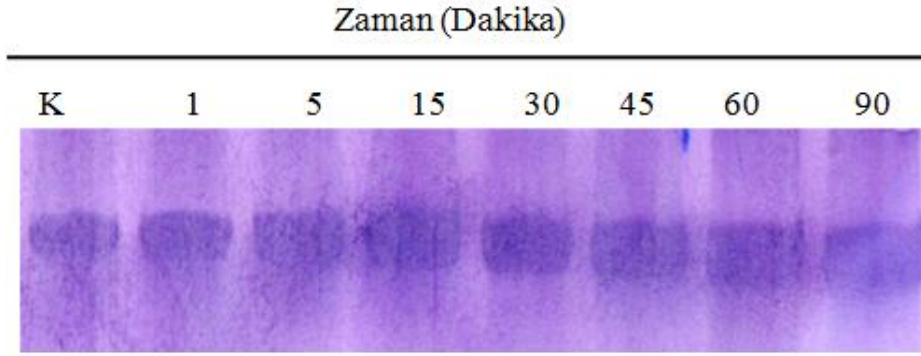
Primere ait 3'-OH ucunda biyotin içeren tek zincir DNA 5' ekzonükleaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanıldı. Zamana bağlı olarak yapılan deneyde enzimin tek zincir DNA substratında nükleotidleri keserek uzaklaştırmadığı dolayısıyla herhangi bir 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığı belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21. Tek zincir linear DNA kullanılarak 5' ekzonükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi. K: kontrol

3.4.4.3. Çift Zincir DNA Substratı Kullanılarak Enzimin 3' Ekzonükleaz Aktivitesinin Araştırılması

5'-OH ucunda biyotin içeren çift zincir DNA, 3' ekzonükleaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanıldı. Zamana bağlı olarak yapılan aktivite deneyinde, enzimin sarkık uca sahip olan biyotin işaretli DNA'dan nükleotidleri keserek uzaklaştıramadığı gözlemlendi. Bu sonuca dayanarak enzimin çift zincir DNA üzerinde herhangi bir 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığı ve 3'-OH uçta eşleşmemiş nükleotid olduğu durumda bu nükleotiti uzaklaştıramadığı belirlendi (Şekil 22).

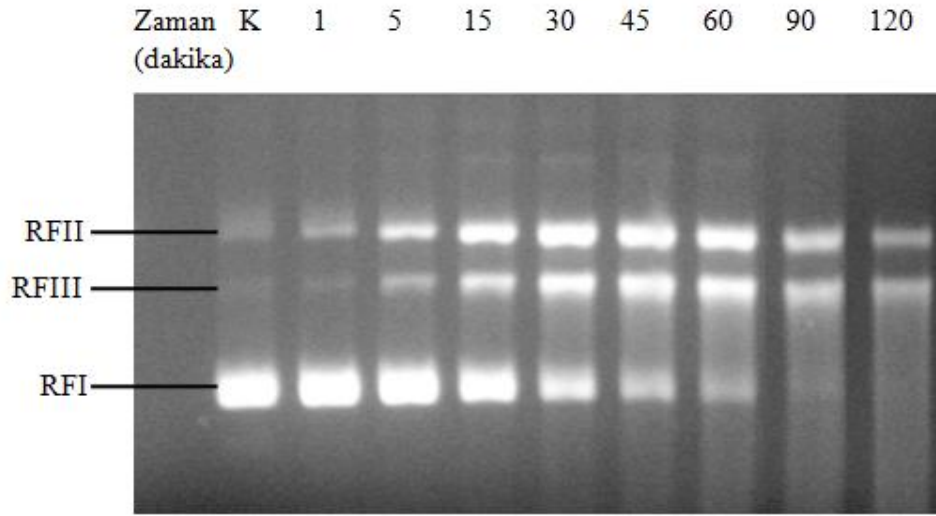


Şekil 22. Enzimin 3' ekzonükleaz aktivitesinin üre-PAGE analizi. K: Kontrol

3.4.5. CIV 012L Proteininin Endonükleaz Aktivitesinin Belirlenmesi

3.4.5.1. Endonükleaz Aktivitesinin Zamana Bağlı Değişimi

Saflaştırılan proteinin endonükleaz aktivitesini belirleyebilmek için zamana bağlı olarak aktivite denemesi yapıldı. Süper sarmal pUC18 plazmit DNA (Replikatif Form I, RFI)'sı substrat olarak kullanıldı. 012L proteini, süper sarmal plazmit DNA'sını endonükleolitik aktivitesi ile önce açık (kırık) dairesel DNA (RFII)'ya daha sonra da lineer DNA (RFIII)'ya dönüştürdüğü belirlendi (Şekil 23).

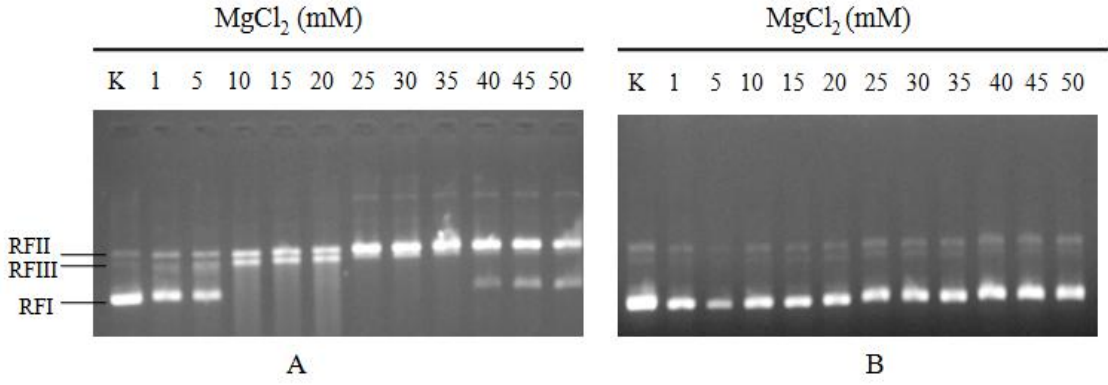


Şekil 23. Endonükleaz aktivitesinin zamana bağlı değişimi. K: Enzim içermeyen kontrol reaksiyonu

3.4.5.2. Optimum Bir ve İki Değerlikli Katyon Değişiminin Belirlenmesi

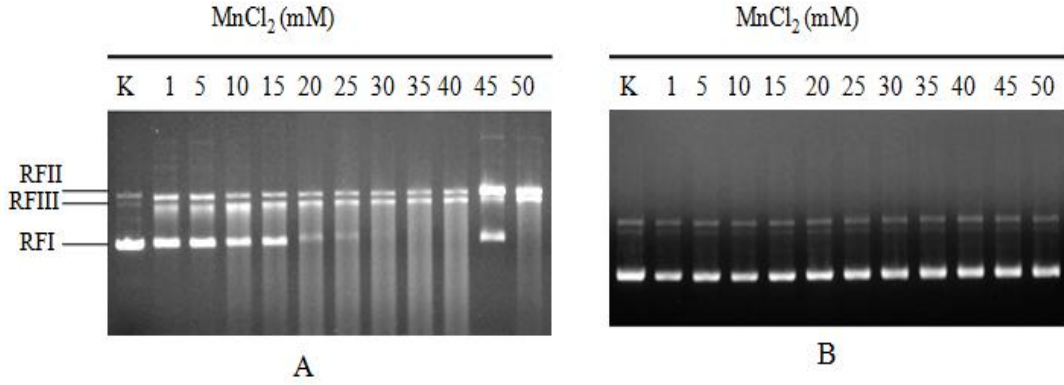
Genel olarak bilinen tüm DNA nükleazlar magnezyum ve manganez iyonlarından bir tanesi ile aktivite göstermektedir. Bunlara ilaveten NaCl veya KCl'ye de ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla Mg^{+2} ve Mn^{+2} iki değerli iyonları ve NaCl ve KCl tek değerli iyonlar kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi ve enzimin hangi iyon ile en yüksek aktivite verdiği araştırıldı.

1 mM'dan 50 mM'a kadar değişik derişimlerde Mg^{+2} iyonu kullanılarak deneyler yapıldı. Reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntülerinde en yüksek aktivitenin 10 mM Mg^{+2} iyon derişiminde RFI'in RFII'ye RFII'nin de RFIII'e dönüşümü ile elde edildiği gözlemlendi (Şekil 24)



Şekil 24. Mg^{+2} derişiminin enzim aktivitesine etkisi. A: CIV 012L proteini ve $MgCl_2$ (1-50 mM) varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlar. B: CIV 012L proteini içermeyen, $MgCl_2$ (1-50 mM) içeren kontrol reaksiyonları.

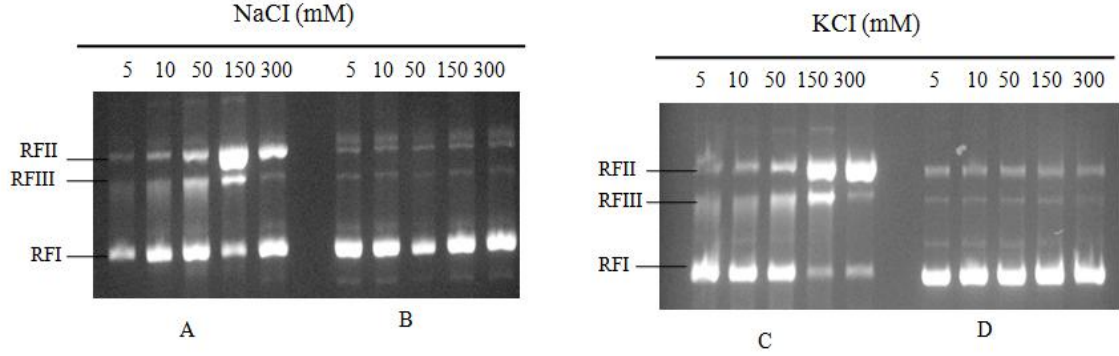
Aynı şekilde optimum Mn^{+2} iyon derişimi araştırıldığında optimum değerin 30 mM olduğu durumda RFI'in RFII'ye, RFII'nin de RFIII'e dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 25). Ancak Mn^{+2} iyonu ile daha düşük aktivite elde edildi ve bu da enzimin aktivite göstermek için ortamda Mg^{+2} iyonunun varlığına ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.



Şekil 25. Mn^{+2} derişiminin enzim aktivitesine etkisi. A: CIV 012L proteini ve $MnCl_2$ (1-50 mM) varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlar. B: CIV 012L proteini içermeyen, $MnCl_2$ (1-50 mM) içeren kontrol reaksiyonları

Nükleaz enzimlerinin NaCl ve KCl iyonlarına bağlı olarak aktivitesinde artış olabilmektedir. Bu amaçla bir değerlikli iyon olarak NaCl ve KCl kullanıldı ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum derişim araştırıldı (Şekil 26). Ancak enzimin her durumda Mg^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyacağı için reaksiyonlar Tablo 4'te belirtilen KCl ve NaCl iyon derişimlerine ilaveten 5 mM Mg^{+2} iyon derişiminde gerçekleştirildi. Her iki

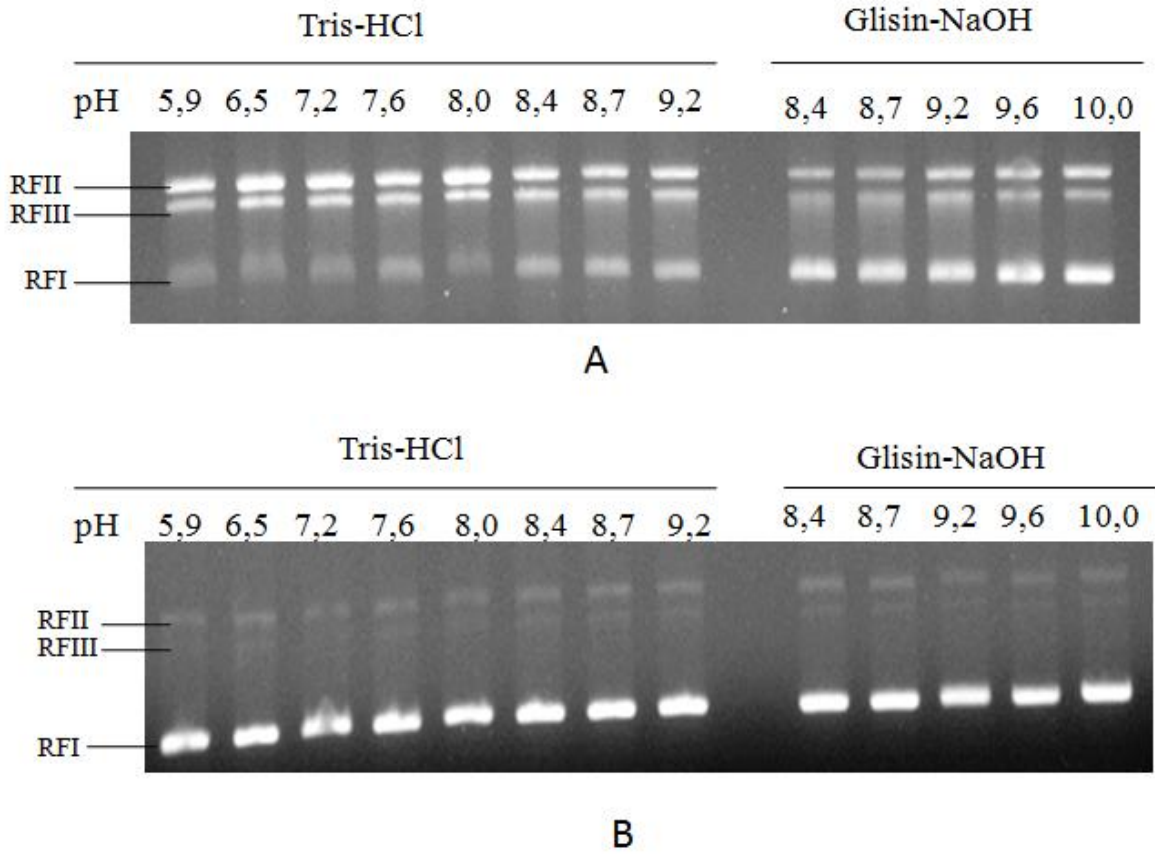
iyonun varlığında da enzimin 150 mM konsantrasyonlarda maksimum aktivite gösterdiği belirlendi.



Şekil 26. Tek değerli iyon derişiminin (NaCl ve KCl) enzim aktivitesine etkisi. (A-C): CIV 012L proteini, NaCl ve KCl (5-300 mM) varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlar. (B-D): CIV 012L proteini içermeyen, NaCl ve KCl (5-300 mM) içeren kontrol reaksiyonları.

3.4.5.3. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

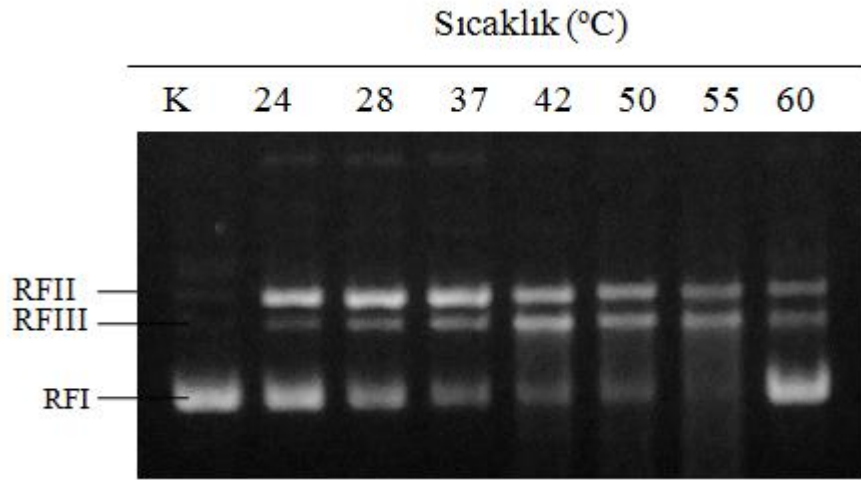
Optimum pH değerinin belirlenmesi için pH 5,9 ile 10,0 arasında değişen tampon aralıkları kullanılarak deneyler yapıldı (Şekil 27). CIV 012L proteininin Tris-HCl tamponunun kullanıldığı pH 5,9 ile 9,2 arasında geniş bir pH aralığında aktivite gösterdiği belirlendi. Maksimum aktivitenin ise RFI'in RFII ve RFIII'e dönüşümünün en fazla olduğu pH 8,0'da olduğu gözlemlendi. Glisin-NaOH tamponunun kullanıldığı durumda ise Tris-HCl tamponuna kıyasla çok yüksek aktivite gözlenmedi.



Şekil 27. pH'nin enzim aktivitesine etkisi. A: Tris-HCl ve Glisin-NAOH tamponları varlığında gerçekleştirilen aktivite reaksiyonları. B: Enzim içermeyen kontrol reaksiyonları.

3.4.5.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Belirlenmesi

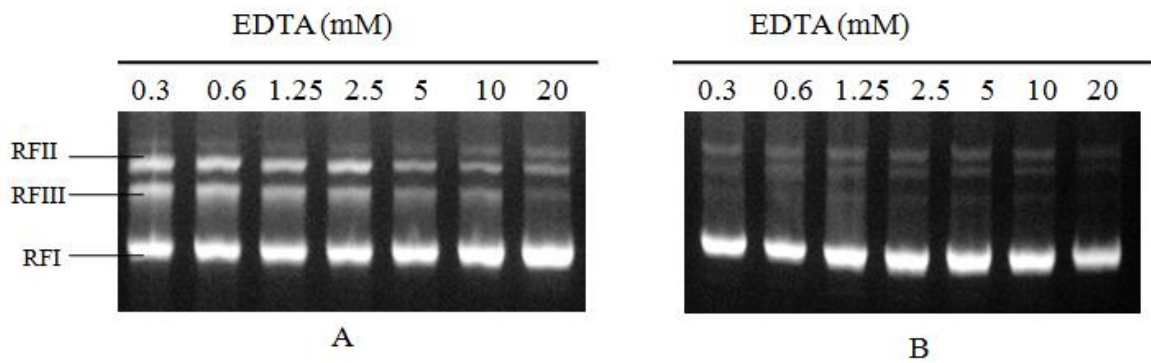
Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı belirlemek için 24-60 °C'lerde aktivite deneyi yapıldı. Enzimin aktivitesinin 24-55 °C arasında artış gösterdiği, 55 °C'de maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlendi. 60 °C'de ise aktivitede belirgin bir düşüş oldu (Şekil 28).



Şekil 28. Enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi. K: Enzim içermeyen kontrol reaksiyonu

3.4.5.5. EDTA'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Metal bağlama özelliği olan EDTA'nın, yüksek konsantrasyonlarda süper sarmal formun kırık ve lineer forma dönüşümünü engelleyerek enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlendi (Şekil 29). Bu durum CIV 012L proteininin aktivite için divalent katyon gerektiren metalloenzim olduğunu göstermektedir.



Şekil 29. EDTA'nın enzim aktivitesine etkisi. A: EDTA varlığında gerçekleştirilen aktivite reaksiyonları. B: Enzim içermeyen kontrol reaksiyonları.

4. TARTIŞMA

Chilo iridescent virüs (CIV), orijinal olarak pirinç kök delici kurdu, *Chilo suppressalis*'den izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu, 1966). Böcekler sınıfı içerisinde konak spektrumu incelenmiş ve altı ordoya (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera) ait 100'den fazla böcek türünün CIV'ye duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Mitsuhashi, 1967; Hama, 1968; Fukuda, 1971). CIV ziraatte zararlı birçok böceği enfekte ettiği için potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak düşünülmektedir (Smith, 1976; Kleespies vd., 1999; Hernandez vd., 2000). Maalesef, CIV'nin moleküler biyolojisi hakkında şu ana kadar yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu eksikliklerin ortadan kalkmasına katkıda bulunmak amacı ile DNA replikasyonu, tamir ve rekombinasyon gibi görevlere sahip bir ekzonükleaz olma potansiyelinde olan CIV 012L geninin transkripsiyonel ve fonksiyonel analizi üzerinde çalışmaların yapılması hedeflenmiştir.

CIV 012L geninin varlığı Jakob ve arkadaşları (2001) tarafından CIV genom analizi sırasında belirlenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen bilgilere göre CIV 012L proteininin *Saccharomyces pombe*'ye ait ekzonükleaz II proteiniyle yüksek benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Ekzonükleaz proteinleri amino uçlarında bulunan XRN_N 5'-3' ekzonükleaz N-terminal motifine sahip olmalarıyla tanımlanır. Bu motife sahip olan ekzonükleaz proteinleri 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. XRN_N 5'-3' ekzonükleaz N-terminal motifi, DNA replikasyonu, rekombinasyon ve tamir işlevlerinden sorumludur (Marchler-Bauer vd., 2011). Yapılan karşılaştırmalar sonucunda CIV 012L proteininin 5'-3' ekzonükleaz N-terminal motifinin invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3)'te bulunan N-terminal motifine yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca CIV 012L geninin *Wiseana iridescent* virüs, *Anopheles minimus* iridovirüs, Invertebrate iridovirus 25, Invertebrate iridovirus 22 ve Invertebrate iridovirus 30 genomunda bulunan XRN_N 5'-3' ekzonükleaz N-terminal işlevsel bölgeleriyle homolojiye sahip bölgeleri içerdiği görülmüştür (Ek Şekil 1).

Bu çalışmada öncelikle CIV 012L geninin transkripsiyonel analizi yapılmıştır. Genin transkripsiyonel analizi RT-PCR ile gerçekleştirildi ve gene özgü transkriptlerin enfeksiyon sonrası 0. ve 1. saatler arasında görülmeye başladığı belirlendi. Ayrıca protein sentezi inhibitörü siklohekzimit ve DNA sentezi inhibitörü Ara-C varlığında gerçekleştirilen enfeksiyonlarda da gene özgü transkriptler gözlemlendi. Bu sonuca göre genin

transkripsiyonel olarak aktif ve “en erken” gruba ait bir gen olduğu belirlendi. Bu sonuç D’Costa ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan CIV’nin restriksiyon fragmentlerinin transkripsiyonel analizi çalışması ile tutarlılık göstermektedir.

Transkripsiyonel olarak aktif bir gen olduğunun anlaşılmasından sonra genin transkripsiyon başlangıç noktası 5' RACE analizi ile belirlendi ve translasyon başlangıç noktası ATG’nin A bazı +1 olarak kabul edildiğinde -30. nükleotid olan A bazı olduğu belirlendi. Bu sonuç CIV 012L geninin 30 nükleotidlik kısa bir 5'-UTR’ye sahip olduğunu gösterdi. Kısa 5'-UTR, CIV’nin DNAPol (35 nükleotid) ve major kapsit protein genler (14 nükleotid)’i için de yaygın bir özelliktir (Nalçaçioğlu vd., 2003). Ayrıca bazı Frog virüs-3 (FV3) transkriptlerinde de 5'-UTR’nin genel olarak kısa olduğu bulunmuştur (Chinchar vd., 2011). Bu bilgi *Iridoviridae* familyasındaki transkriptlerin kısa 5'-UTR’ye sahip olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır.

CIV 012L geninin transkripsiyon başlangıç naktasının tespit edilmesinin ardından genin promotor bölgesi incelendi. Bunun için de promotor dizilerinin içinde bulunabileceğini düşündüğümüz ve viral genomun 5'-ucundan genin transkripsiyon başlangıç noktasına 200 baz uzaklıkta olan bir bölge seçildi. Lusiferaz promotor plazmid yapıları kullanılarak yapılan analizlerde CIV 012L promotor yapıları sadece CIV partiküllerinin varlığında aktif olabildi. CIV 037L ve MCP genleri, Frog virüs 3 (FV3) ICR-169 geni ve Bohle iridovirüs ICP-18 ve ICP-46 genlerinin promotor aktivitesinin incelenmesi sırasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Willis ve Granoff, 1985; Beckman vd., 1988; Nalçaçioğlu vd., 2003; Pallister vd., 2005). Ayrıntılı çalışmalar FV3 geninin aktivasyonu için viral DNA’nın yeterli olmadığını, virüs partikülünün gerekli olduğunu göstermiştir. Ancak erken genlerin aktivasyonunu sağlayan virüse ait yapının ne olduğu henüz bilinmemektedir.

Erken genlerin transkripsiyonu için virüs partikülündeki bir bileşene ihtiyaç duyulması iridovirüslerde olduğu gibi poxvirüslerde ve asfarvirüslerde de görülmektedir. Vaccinia virüslerde örneğin RAP94 polipeptidi erken transkripsiyon için gereklidir. RAP94 geç bir gendir ve virüs bağımlı erken bir transkripsiyon faktörü fonksiyonu görebilir (Ahn vd., 1994). Ayrıca yine vaccinia virüslerde, enfeksiyonun geç safhasında sentezlenip erken promotorlara ve viral RNA polimeraza bağlanan VETF (virüs erken transkripsiyon faktörü)’ye, erken genlerin transkripsiyonu için ihtiyaç vardır (Moss ve Shisler, 2001). CIV’de benzer bir fonksiyon, omurgalı iridovirüsü *Lymphocystis disease*

virüs (LCDV-1)'ün erken transkripsiyon faktörü (ORF 132L) ile homolog olan ORF 022L geni tarafından yapılabilir (Jakob vd., 2001).

Şimdiye kadar FV3'e ait ICR 169 ile ICR 489 ve Bohle iridovirus'e ait ICP 18 ile ICP 46 en erken genleri üzerinde promotor çalışmaları yapılmıştır (Willis, 1987; Pallister vd., 2005). ICR 489 ve ICP 46 genlerinin promotor bölgesinde klasik TATA, CAAT ve GC kutuları bulunmaktadır. ICR 169 geninin transkripsiyon başlangıç noktasının 29 bp ve ICP-18 geninin de transkripsiyon başlangıç noktasının 19 bp yukarısında TATA kutusuna benzer TATTTTA sırası tespit edilmiştir (Willis, 1987; Pallister vd., 2005). Bu çalışmada da promotor analizi için belirlenen 200 bp'lik sıranın TATA ve CAAT kutuları gibi promotor elementlerini içerdiği görülmüştür (Şekil 30). Delesyonlu yapılardan -130'dan başlayan promotor fragmenti CAAT benzeri kutuyu içermesine rağmen -80'den başlayan fragmentte bu kutu mevcut değildir. Lusiferaz aktivitesi 80 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmitte %80 oranında azalmıştır. Bu azalışta CAAT benzeri kutunun herhangi bir etkisinin olup olmadığını görmek için daha ileri analizlerin yapılması gerekir. -80'den başlayan promotor fragmentinde bulunan TATA kutusu benzeri sıra (TATAAA)'nın promotor aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi yoktur çünkü 40 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmitte lusiferaz aktivitesi, 80 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentine sahip plazmit ile aynı kalmıştır. -20 ve -10 nükleotid uzunluklardaki DNA fragmentlerine sahip plazmitler arasında lusiferaz aktivitesinde belirgin bir düşüş olmuştur. Bu iki yapı arasında kalan GGATCATATT dizisinin CIV 012L geninin promotor aktivitesinden sorumlu olduğu söylenebilir. Ancak en erken gen olarak tanımlanan (D'Costa vd., 2004) CIV'ye ait diğer ORF'lerde (468R, 006L ve 10R) benzer bir yapı bulunmamaktadır. Benzer şekilde FV3'e ait ICR 169 geni promotoru da (ATATCTCACAGGGGAATTGAAAC) diğer FV3 genleri arasında korunmuş değildir (Willis, 1987; Beckman vd., 1988; Pallister vd., 2005). CIV DNAPol'ünün kritik AAAAT motifi de (Nalçacıoğlu vd., 2007) 012L geninin transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarısında birkaç kez yer almaktadır (Şekil 30). Ancak bu motifin promotor aktivitesi üzerine kesin bir etkisinin olduğunu söylemek mümkün değildir.

```

-200
GAAGCTTTGTGTTTCAGAGAAACGTTCTTCAATAGTTCTAAGTGTACTTCAATATAAACTTCGT
-130
CATTAAAAATGTTTTCAATTGCATAAATGTAACCAATTTTCATATTATGTTATGTTAAATTTAAAT
-80
GTTTGATTGTTTGATAGTTCAAATTTTATAAATAAATTTGAACTTATATATTGATCATATTTAAAG
-40 -20 -10
+1 +30
ATTTAAAAGTTAAAGAAGATTAGTAAAGTATAAAATGGGTATTAATATTTTTTTAAATGGTT

```

Şekil 30. Promotor bölgesi analizinde kullanılan 200 bp'lik bölgenin gösterimi. Koyu yazılmış sıralar TATA ve CAAT kutusu benzeri sıraları göstermektedir. Altı çizili sıralar DNAPol geninin AAAAT motifine benzeyen sıraları göstermektedir.

Fonksiyonel analiz kapsamında ise 012L geni pET-28a(+)'ya klonlandı, elde edilen rekombinant vektör *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarıldı ve protein ekspresyonu için IPTG ile indüklendi. Ekspreslenen protein Ni-NTA affinite kromatografisi ile saflaştırılarak karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı. 3'-OH ucu biyotin işaretli çift zincir DNA substratı kullanıldığında, proteinin serbest 5' uçtan nükleotidleri teker teker uzaklaştırdığı buna karşın 5'-OH ucu işaretli çift zincir DNA substratı kullanıldığında ise proteinin eşleşmemiş durumdaki nükleotidleri uzaklaştıramadığı belirlendi. Sonuçlar CIV 012L proteininin çift zincir DNA üzerinde etkin bir şekilde 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi gösterdiğini, ancak tek zincir DNA substratı üzerinde herhangi bir aktivite göstermediğini ortaya koymuştur. AcMNPV alkalın nükleaz proteininin ise hem tek zincir hem de çift zincir DNA substratları üzerinde 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Mikhailov vd., 2004).

012L genine ait protein, zamana bağlı olarak yapılan aktivite denemelerinde süper sarmal plazmit DNA'sını önce kırık dairesel DNA'ya sonra da lineer DNA'ya dönüştürmüştür. Bu sonuç CIV 012L proteininin endonükleolitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Nükleaz enzimleri aktivite gösterebilmeleri için Mg^{+2} iyonuna ihtiyaç duyarlar (Rangarajan ve Shankar, 2001). Bu çalışmada CIV 012L proteininin endonükleaz aktivitesi araştırılırken de Mg^{+2} iyonuna ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Herpes simpleks virüs tip-1 (HSV-1) ve *Autographa californica* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)'e ait alkalın nükleaz proteinleri de Mg^{+2} iyonunun varlığında endonükleaz aktivitesi göstermektedir (Bronstein ve Weber, 1996; Li ve Rohrmann, 2000). Ancak Mn^{+2} varlığında bu enzimlerin endonükleaz aktivitelerinde düşüş olduğu belirlenmiştir

(Hoffmann, 1981; Mikhailov vd., 2004). Benzer şekilde CIV 012L proteininin de Mn^{+2} iyonu varlığında RFI'yi RFIII'e dönüştürme oranında bir düşüş gözlenmiştir.

CIV 012L proteini ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında bu proteinin bazı biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. 012L proteini, pH'ı 8,0 olan Tris-HCl tamponunda maksimum aktivite göstermektedir. Buna karşın daha önce yapılan çalışmalarda *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) V-TREX (3'-5' ekzonükleaz) proteininin pH 6,1-7,4 arasında, *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV) 3'-5' ekzonükleaz proteininin pH 9,5'te maksimum aktive gösterdiği bulunmuştur (Slack ve Shapiro, 2004; Yang vd., 2004). Çalışmamızda enzimin en önemli fiziksel özelliği olarak optimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta incelendi. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 24 °C'den 60 °C'ye kadar değişik sıcaklıklarda deneyler yapıldı ve en yüksek aktivite 55 °C'de elde edildi. Dolayısı ile rekombinant olarak elde edilen CIV 012L proteininin optimum aktivite sıcaklığının, bu proteinin elde edildiği CIV'nin yaşama sıcaklığından (optimum 25-30 °C civarı) farklı olduğu gözlemlendi. EDTA varlığında aktivitenin inhibe olması CIV 012L proteininin divalent katyona ihtiyaç duyan bir metalloenzim olduğunu göstermektedir. AgMNPV V-TREX proteini de Mg^{+2} 'ye ihtiyaç duyan metalloenzim özelliğine sahip bir proteindir (Slack ve Shapiro, 2004).

Saflaştırılan proteinin ekzonükleaz aktivitesi de araştırıldı. 3'-OH ucu biyotin işaretli çift zincir DNA substratı kullanıldığında, proteinin serbest 5' uçtan nükleotidleri teker teker uzaklaştırdığı buna karşın 5'-OH ucu işaretli çift zincir DNA substratı kullanıldığında ise proteinin eşleşmemiş durumdaki nükleotidleri uzaklaştıramadığı belirlendi. Sonuçlar CIV 012L proteininin çift zincir DNA üzerinde etkin bir şekilde 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi gösterdiğini, ancak tek zincir DNA substratı üzerinde herhangi bir aktivite göstermediğini ortaya koymuştur. AcMNPV alkalın nükleaz proteininin ise hem tek zincir hem de çift zincir DNA substratları üzerinde 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Mikhailov vd., 2004).

Sonuç olarak fonksiyonel bir 5'-3' ekzonükleaz olduğu belirlenen CIV 012L proteininin, DNA replikasyonu, tamir ve rekombinasyon olaylarında önemli rol oynayabileceğini söyleyebiliriz.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, CIV 012L geninin, transkripsiyon zamanı, transkripsiyon sınıfı, genin 5' ucundaki proteine dönüşmeyen bölgenin sırası ve promotorunun bulunabileceği muhtemel baz aralıkları belirlenmiştir. Ayrıca, genin fonksiyonel analizi gerçekleştirilerek işlevsel bir gen olduğu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçları maddeler halinde belirtilmiştir:

1. Literatürdeki mevcut ekzonükleazların protein sıraları ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda CIV 012L proteinin ekzonükleaz aktivitesi için gerekli olan 5'-3' ekzonükleaz N-terminal motifine sahip olduğu ve bu motifin 2.-259. amino asitler arasında bulunduğu belirlendi.
2. Transkripsiyon analizi sonucunda;
 - a) 012L geninin transkripsiyonunun, SPC-BM-36 hücre kültüründe enfeksiyonu takip eden 0. ve 1. saatler arasında başladığı, enfeksiyondan sonraki 4. saatte, transkripsiyonun yoğunlaştığı ve çalışılan daha sonraki saatlerde de aynı yoğunlukta devam ettiği belirlendi.
 - b) 012L kodlu genin, hem DNA ve protein sentezi inhibitörlerinin varlığında ve hem de yokluğunda tespit edildiğinden dolayı en erken gruba ait bir gen olduğu belirlendi.
 - c) 012L geninin transkripsiyon başlangıç noktasının, ATG'den 30 baz yukarıda olduğu tespit edildi.
3. İkili lusiferaz deneyleri ile gerçekleştirilen promotor analizleri sonucunda genin muhtemel promotor bölgesinin transkripsiyon başlangıç noktasının yukarısındaki -20. ile -10. nükleotidler arasında olduğu belirlendi.
4. Lineer çift zincir DNA'lar üzerinde CIV 012L proteininin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olduğu fakat herhangi bir 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmadığı belirlendi. Ayrıca lineer tek zincir DNA üzerinde de herhangi bir ekzonükleaz aktivitesi belirlenmemiştir.
5. CIV 012L proteininin süper sarmal plazmid DNA'sını dairesel yapıya, dairesel yapıyı da lineer yapıya dönüştüren güçlü bir endonükleaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

6. Enzimin optimum endonükleaz aktivitesi gösterdiği sıcaklığın 55 °C olduğu, 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda ise aktivitesini kaybettiği, optimum pH'sının 8.0 olduğu tespit edildi. Optimum metal iyonunun ise 10 mM konsantrasyonda Mg^{+2} iyonu olduğu belirlendi.

6. ÖNERİLER

Bir genin genomdan silinmesi, ilgi duyulan genlerin fonksiyonlarının çalışılmasında önemli bir yaklaşım olarak bilinmektedir. CIV 012L geninin de viral hayat döngüsü için ihtiva ettiği önem, bu genin genomdan homolog rekombinasyon veya benzeri bir teknik ile silinmesi ile araştırılabilir.

Genin transkripsiyonundan sorumlu promotor bölgesinin daha spesifik olarak tespit edilebilmesi için belirtilen potansiyel promotor bölgesi üzerinde çeşitli mutasyon çalışmaları yapılabilir. Böylelikle iridovirüslerde en erken gruba ait bir genin promotor yapısı üzerinde ayrıntılı bilgi verilmiş olur.

7. KAYNAKLAR

- Abelson, J., Trotta, C. R. ve Li, H., 1998. tRNA splicing, J. Biol. Chem., 273, 21, 12685-12688.
- Ahn, B. Y., Gershon, P. D. ve Moss, B., 1994. RNA polymerase-associated protein Rap94 confers promoter specificity for initiating transcription of vaccinia virus early stage genes, J. Biol. Chem., 269, 10, 7552-7557.
- Asgari, S. ve Johnson, K. N., 2010. *Insect Virology*, Caister Academic Press, Norwich, UK, 435 p.
- Bawden, A. L., Glassberg, K. J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W. ve Moyer, R. W., 2000. Complete Genomic Sequence of the Amsacta moorei Entomopoxvirus: Analysis and Comparison with Other Poxviruses, Virology, 274, 1, 120-139.
- Beckman, W., Tham, T. N., Aubertin, A. M. ve Willis, D. B., 1988. Structure and regulation of the immediate-early frog virus 3 gene that encodes ICR489, J. Virol., 62, 4, 1271-1277.
- Braunwald, J., Nonnenmacher, H. ve Tripiet-Darcy, F., 1985. Ultrastructural and biochemical study of frog virus 3 uptake by BHK-21 cells, J. Gen. Virol., 66, 2, 283-293.
- Bronstein, J. C. ve Weber, P. C., 1996. Purification and characterization of herpes simplex virus type 1 alkaline exonuclease expressed in Escherichia coli, J. Virol., 70, 3, 2008-2013.
- Chinchar, V. G., 2002. Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers, Arch. Virol., 147, 3, 447-470.
- Chinchar, V. G., Essbauer, S., He, J. G., Hyatt, A. ve Myazaki, T., 2005. *Iridoviridae. Virus Taxonomy: 8th Report of the international committee on the taxonomy of viruses*. Elsevier.
- 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, 10, 1959-1985.
- Chitnis, N. S., Paul, E. R., Lawrence, P. K., Henderson, C. W., Ganapathy, S., Taylor, P. V., Viridi, K. S., D'Costa, S. M., May, A. R. ve Bilimoria, S. L., 2011. A virion-associated protein kinase induces apoptosis, J. Virol., 85, 24, 13144-13152.
- Chu, C. Y. ve Rana, T. M., 2007. Small RNAs: regulators and guardians of the genome, J. Cell Physiol., 213, 2, 412-419.

- Constantino, M., Christian, P., Marina, C. F. ve Williams, T., 2001. A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6, J. Virol. Meth., 98, 2, 109-118.
- D'Costa, S. M., Yao, H. ve Bilimoria, S. L., 2001. Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells, Arch. Virol., 146, 11, 2165-2178.
- D'Costa, S. M., Yao, H. J. ve Bilimoria, S. L., 2004. Transcriptional mapping in Chilo iridescent virus infections, Arch. Virol., 149, 4, 723-742.
- D'Costa, S. M., Vigerust, D. J., Perales-Hull, M. R., Lodhi, S. A., Viravathana, P. ve Bilimoria, S. L., 2012. First complete and productive cell culture model for members of the genus Iridovirus, Arch. Virol., 157, 11, 2171-2178.
- Delius, H., Darai, G. ve Flugel, R. M., 1984. DNA analysis of insect iridescent virus 6: evidence for circular permutation and terminal redundancy, J. Virol., 49, 2, 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 iridescent virus), J. Virol., 80, 17, 8439-8449.
- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., Han, M. S., Cha, S. J., Park, M. S., Park, M. A., Kim, Y. C., Kim, J. W. ve Park, J. W., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus, Virology, 325, 2, 351-363.
- Eaton, H. E., Hyatt, A. D. ve Hengstberger, S., 1991. Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification, J. Fish Dis., 14, 157-169.
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C. ve Brunetti, C. R., 2007. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes, Virol. J., 4, 11.
- Fenner, F., 1976. The classification and nomenclature of viruses. Second report of the international committee on taxonomy of viruses., Intervirology, 7, 1-115.
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H., Rösen-Wolff, A. ve Darai, G., 1990. Molecular biology of insect iridescent virus, in: Molecular Biology of Iridoviruses, Kluwer, Boston, Dordrecht, London, 47-80.
- Fukaya, M. ve Nasu, S., 1966. A Chilo iridescent virus (CIV) from the Rice Stem Borer, Chilo suppressalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae), Appl. Entomol. Zool., 1, 69-72.
- Fukuda, T., 1971. Per os transmission of Chilo iridescent virus to mosquitoes, J. Invertebr. Pathol., 18, 1, 152-153.

- Goorha, R., Willis, D. B. ve Granoff, A., 1977. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VI. Frog virus 3 replication is dependent on the cell nucleus, J. Virol., 21, 2, 802-805.
- Goorha, R., Murti, G., Granoff, A. ve Tirey, R., 1978. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VIII. The nucleus is a site of frog virus 3 DNA and RNA synthesis, Virology, 84, 1, 32-50.
- Goorha, R., Willis, D. B. ve Granoff, A., 1979. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. Viral regulatory proteins in transcriptional and post-transcriptional controls, J. Virol., 32, 2, 442-448.
- Goorha, R. ve Murti, K. G., 1982. The genome of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant, Proc. Natl. Acad. Sci., U S A, 79, 2, 248-252.
- Grindley, N. D., Whiteson, K. L. ve Rice, P. A., 2006. Mechanisms of site-specific recombination, Annu. Rev. Biochem., 75, 567-605.
- Hama, H., 1968. On the cross inoculation of Chilo iridescent virus, Japan. J. Appl. Entomolo. Zool., 12, 34-39.
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. ve Chan, S. M., 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus, Virology, 291, 1, 126-139.
- He, J. G., Lu, L., Deng, M., He, H. H., Weng, S. P., Wang, X. H., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z. ve Chan, S. M., 2002. Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog, Virology, 292, 2, 185-197.
- Hernandez, O., Maldonado, G. ve Williams, T., 2000. An epizootic of patent iridescent virus disease in multiple species of blackflies in Chiapas, Mexico, Med. Vet. Entomol., 14, 4, 458-462.
- Hoffmann, P. J., 1981. Mechanism of degradation of duplex DNA by the DNase induced by herpes simplex virus, J. Virol., 38, 3, 1005-1014.
- Huang, Y., Huang, X., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z., Cui, H., Cao, J., Zhao, Y., Wang, X., Jiang, Y. ve Qin, Q., 2009. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae, BMC Genomics, 10, 224.
- Ikonomou, L., Schneider, Y. J. ve Agathos, S. N., 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins, Appl. Microbiol. Biotechnol., 62, 1, 1-20.
- İnce, İ. A., Westenberg, M., Vlak, J. M., Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R. ve van Oers, M. M., 2008. Open reading frame 193R of Chilo iridescent virus encodes a functional inhibitor of apoptosis (IAP), Virology, 376, 1, 124-131.

- İnce, İ. A., Boeren, S. A., van Oers, M. M., Vervoort, J. J. ve Vlak, J. M., 2010. Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405, 1, 253-258.
- İnce, 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, J. Gen. Virol., 94, 1, 187-192.
- Jakob, N. J., Muller, K., Bahr, U. ve Darai, G., 2001. Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus, Virology, 286, 1, 182-196.
- James, R., Kleanthous, C. ve Moore, G. R., 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes, Microbiology, 142, 7, 1569-1580.
- Jancovich, J. K., Mao, J., Chinchar, V. G., Wyatt, C., Case, S. T., Kumar, S., Valente, G., Subramanian, S., Davidson, E. W., Collins, J. P. ve Jacobs, B. L., 2003. Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America, Virology, 316, 1, 90-103.
- Jancovich, J. K., Bremont, M., Touchman, J. W. ve Jacobs, B. L., 2010. Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family Iridoviridae), J. Virol., 84, 6, 2636-2647.
- Jancovich, J. K., Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. ve Zhang, Q. Y., 2011. In Virus Taxonomy: 9 th Report of international committee on the taxonomy of viruses. London: Elsevier.
- Jarvis, D. L., 2003. Developing baculovirus–insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production, Virology, 310, 1, 1-7.
- Kao, H. I. ve Bambara, R. A., 2003. The protein components and mechanism of eukaryotic Okazaki fragment maturation, Crit. Rev. Biochem. . Biol., 38, 5, 433-452.
- Kelly, D. C., 1985. Insect iridescent viruses, Curr. Top. on Microbiol. Immunol., 116, 23-35.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. ve Carstens, E. B., 2011. Virus Taxonomy: 9th Report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier.
- Kleespies, R. G., Tidona, C. A. ve Darai, G., 1999. Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range, J. Invertebr. Pathol., 73, 1, 84-90.
- Li, L. ve Rohrmann, G. F., 2000. Characterization of a baculovirus alkaline nuclease, J. Virol., 74, 14, 6401-6407.

- Lü, L., Zhou, S. Y., Chen, C., Weng, S. P., Chan, S. M. ve He, J. G., 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, Virology, 339, 1, 81-100.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. ve Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. ve Bryant, S. H., 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins, Nucleic Acids Res., 39, Database issue, D225-229.
- Marina, C.F., Jimenez-Arredondo, J.I., Castillo, A. ve Williams, T., 1999. Sublethal Effects of Iridovirus Disease in a Mosquito, *Oecologia*, 119, 383-388.
- Marina, C. F., Feliciano, J. M., Valle, J. ve Williams, T., 2000. Effect of temperature, pH, ion concentration, and chloroform treatment on the stability of invertebrate iridescent virus 6, J. Invertebr. Pathol., 75, 1, 91-94.
- Marti, T. M. ve Fleck, O., 2004. DNA repair nucleases, Cell Mol. Life. Sci., 61, 3, 336-354.
- Martinez, G., Christian, P., Marina, C. ve Williams, T., 2003. Sensitivity of Invertebrate iridescent virus 6 to organic solvents, detergents, enzymes and temperature treatment, Virus Res., 91, 2, 249-254.
- Mclaughlin, R. E., Scott, H. A. ve Bell, M. R., 1972. Infection of the Boll weevil by Chilo iridescent virus, J. Invertebr. Pathol., 19, 285-290.
- Mikhailov, V. S., Okano, K. ve Rohrmann, G. F., 2004. Specificity of the endonuclease activity of the baculovirus alkaline nuclease for single-stranded DNA, J. Biol. Chem., 279, 15, 14734-14745.
- Mitsuhashi, J., 1967. Infection of leafhopper and its tissues cultivated in vitro with Chilo iridescent virus, J. Invertebr. Pathol., 9, 3, 432-434.
- Moss, B. ve Shisler, J. L., 2001. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes, Semin. Immunol., 13, 1, 59-66.
- Nalçacıoğlu, R., Marks, H., Vlak, J. M., Demirbağ, Z. ve van Oers, M. M., 2003. Promoter analysis of the Chilo iridescent virus DNA polymerase and major capsid protein genes, Virology, 317, 2, 321-329.

- Nalçacıoğlu, R., İnce, İ. A., Vlak, J. M., Demirbağ, Z. ve van Oers, M. M., 2007. The Chilo iridescent virus DNA polymerase promoter contains an essential AAAAT motif, J. Gen. Virol., 88, 9, 2488-2494.
- Nowotny, M., 2009. Retroviral integrase superfamily: the structural perspective, EMBO Rep., 10, 2, 144-151.
- Ozgen, A., Muratoglu, H., Demirbag, Z., Vlak, J. M., van Oers, M. M. ve Nalcacioglu, R., 2014. Construction and characterization of a recombinant invertebrate iridovirus, Virus Res., 189c, 286-292.
- Pallister, J., Goldie, S., Coupar, B. ve Hyatt, A., 2005. Promoter activity in the 5' flanking regions of the Bohle iridovirus ICP 18, ICP 46 and major capsid protein genes, Arch. Virol., 150, 9, 1911-1919.
- Patel, A. A. ve Steitz, J. A., 2003. Splicing double: insights from the second spliceosome, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 4, 12, 960-970.
- Paul, E. R., Chitnis, N. S., Henderson, C. W., Kaul, R. J., D'Costa, S. M. ve Bilimoria, S. L., 2007. Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract, Arch. Virol., 152, 7, 1353-1364.
- Rangarajan, E. S. ve Shankar, V., 2001. Sugar non-specific endonucleases, FEMS Microbiol. Rev., 25, 5, 583-613.
- Reha-Krantz, L. J., 2010. DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability, Biochim. Biophys. Acta., 1804, 5, 1049-1063.
- Reyes, A., Christian, P., Valle, J. ve Williams, T., 2004. Persistence of Invertebrate iridescent virus 6 in soil, Biocontrol, 49, 433-440.
- Schnitzler, P., Sonntag, K. C., Muller, M., Janssen, W., Bugert, J. J., Koonin, E. V. ve Darai, G., 1994. Insect iridescent virus type 6 encodes a polypeptide related to the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II, J. Gen. Virol., 75, 7, 1557-1567.
- Schoeffler, A. J. ve Berger, J. M., 2008. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology, Q. Rev. Biophys., 41, 1, 41-101.
- Shen, B., Singh, P., Liu, R., Qiu, J., Zheng, L., Finger, L. D. ve Alas, S., 2005. Multiple but dissectible functions of FEN-1 nucleases in nucleic acid processing, genome stability and diseases, Bioessays, 27, 7, 717-729.
- Slack, J. M. ve Shapiro, M., 2004. Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus v-trex gene encodes a functional 3' to 5' exonuclease, J. Gen. Virol., 85, Pt 10, 2863-2871.

- Smith, K. M., 1976. Virus–Insect Relationships, Longman, London, J. Invertebr. Pathol., 102–104.
- Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F. ve Hew, C. L., 2004. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis, J. Virol., 78, 22, 12576-12590.
- Sorek, R., Kunin, V. ve Hugenholtz, P., 2008. A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea, Nat. Rev. Microbiol., 6, 3, 181-186.
- Summers M.D. ve Smith G.E., 1987. A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
- Stanbridge, L. J., Dussupt, V. ve Maitland, N. J., 2003. Baculoviruses as vectors for gene therapy against human prostate cancer, J.Biomed. Biotechnol., 2, 79-91.
- Tan, W. G., Barkman, T. J., Gregory Chinchar, V. ve Essani, K., 2004. Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus Ranavirus (family Iridoviridae), Virology, 323, 1, 70-84.
- Tidona, C. A. ve Darai, G., 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus, Virology, 230, 2, 207-216.
- Tsai, C. T., Ting, J. W., Wu, M. H., Wu, M. F., Guo, I. C. ve Chang, C. Y., 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses, J. Virol., 79, 4, 2010-2023.
- URL-1, <http://www.trevorwilliams.info/Iridovirus.htm>. 16.05.2014.
- URL–2, www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/Iridoviruses.html. 16.05.2014.
- URL–3, http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/581.html. 16.05.2014.
- Williams, T., 1996. The iridoviruses, Adv. Virus. Res., 46, 345-412.
- Williams, T., 1998. Invertebrate Iridescent Viruses, In: The Insect Viruses, Miller, L. and Ball, A. (Eds.), Plenum Press NY, 31-68.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V. G., 2005. A decade of advances in iridovirus research, Adv. Virus. Res., 65, 173-248.
- Willis, D. B. ve Granoff, A., 1980. Frog virus 3 DNA is heavily methylated at CpG sequences, Virology, 107, 1, 250-257.

- Willis, D. B., Goorha, R. ve Granoff, A., 1984. DNA methyltransferase induced by frog virus 3, J. Virol., 49, 1, 86-91.
- Willis, D. B. ve Granoff, A., 1985. trans activation of an immediate-early frog virus 3 promoter by a virion protein, J. Virol., 56, 2, 495-501
- Willis, D. B., 1987. DNA sequences required for trans-activation of an immediate-early frog virus 3 gene, Virology, 161, 1, 1-7.
- Yan, X., Yu, Z., Zhang, P., Battisti, A. J., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Bajaj, C., Bergoin, M., Rossmann, M. G. ve Baker, T. S., 2009. The capsid proteins of a large, icosahedral dsDNA virus, J. Mol. Biol., 385, 4, 1287-1299.
- Yang, D. H., de Jong, J. G., Makhmoudova, A., Arif, B. M. ve Krell, P. J., 2004. Choristoneura fumiferana nucleopolyhedrovirus encodes a functional 3'-5' exonuclease, J. Gen. Virol., 85, 12, 3569-3573.
- Zhang, Q. Y., Xiao, F., Xie, J., Li, Z. Q. ve Gui, J. F., 2004. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China, J. Virol., 78, 13, 6982-6994.

8. EKLER

amiexo MGIKYFFKWKDSFPRTIEKCGGKN-----LSAVPTKLLLLDLNGI IHT
IIV25exo MGIKYFFKWKDSFPKTVTKPFGREDQNLRDALANCKGDNIDGLDNPFLLLLLDLNGI IHT
059L MGIKYFFRWYKDSFPNTVTKYSTKN-----HKKSQDTDEPFLLLLDLNGI IHT
012L MGIKYFFKWLKTNHSESIKCIDRHD-----NSQCIDVLLIDMNGI IHN
*****:* *: : . :***:*****.

amiexo SCQKIYRYGAFESKTLKKSPVFSGEKDLMFADVVNSINMFVELIDPKEIVLCIDGVA
IIV25exo SCQKIYKYGSFEPKSLKKSPINSGEKDLLVFEDVLSINSLVVKIDPKEIVLCIDGVA
059L SCQKIYKYGSFEPKNLLKKSPVYKGEKDLVYEDVLASIDSLVALVEPRELVLCIDGVA
012L SAQEVYGYGSFSP-----KENACDKKVYSLVCRQIDRMVIQFKPKELILCIDGVA
.:* **:* .. * *: * .*: :* ..*:***:*****

amiexo PISKQIQQRFLSRKTSGG-----FDPNCISPGTFFLYKLGCYLKTS
IIV25exo PISKQIQQRFLSKKTNGG-----FDSNCISPGTEFLYKLGLYLKN
059L PVSQIQQRFFITHKTDGG-----FDSNCISPGTEFLQGLYKTH
012L PRSQIQQRFLAAHDRKPGTEFNFDCKNGNTSKFDSNSISPGTEFMHNLGRYIDIH
* *****: : **.*.***** *: :** *:

amiexo IEKKLENDWLN-----VSKIHFM DANVPGEGEHKL
IIV25exo IEKKLEKDWLN-----VTTIYFMDSLVPGEGEHKL
059L LESKLEKEWLN-----VSTIYFMDSLVPGEGEHKL
012L IKKKQKPAFTGRETTDAPQNNWRNKDQSWRQKVDDTAEWSNLTVVFANDKVS GEGEHKL
:.* : : . : : * : * .*****:

amiexo DFLRANETRILETNFTVI IGGNDADLIMLSLLVSTLFLTKNRIYILREDLSSKKLDYLLI
IIV25exo DFLRSNQSKIINENMGI I VVGNDADLIMLTLTLLISTIFLKENLIYILREDLTSKKLDYLLI
059L DFLRTHQTRIVDTKFNI VVVGNDADLIMLSLLVSVLFIKENPLSILREDLTSKKLDYLLI
012L DYIR---KYGNSYTYCIYGSADLIMLSMSALT'TAIKN-IYVLRDEYKSP--NYLLI
: : : : * .*****: . : * : :**:* . * :***:

amiexo NVNLLKQNLDFAKTKPGFVIHKYPSSEGGIRFKRVICDFVVLCLFLVGNDFLPQIPLFNI
IIV25exo NITQLKKNILNFAMEKP-----RFKHYDFDYVVCDFVILCFMVGNDFLPSIPLFNI
059L DINLLKDTIYQNASRDK-----PRFTPYDFEFVICDFVVMCFMIGNDFLPSVPLFNI
012L NIPNFVKNLIKDVKSNT-----DKLDEKRFINDFIFMCFMVGNDFLPHIPSIEI
: : : ..: : : **:*:***:***** * : :*

amiexo YDGGDLMMKYYFSCSGYITFK-----NFQTFQINFIKLKDFFEHILNVISYQ
IIV25exo YDGGDLMMKYYFTTPGYITTTPLSNTSNST---NSSNLKINFKNLMKYINHLLVVISYQ
059L YDGGDLMLKYYFTTAGYITCRSVSKFYGRNKGKMEKIKINFKHLQPYLHYIATAVNPQ
012L MTNGIESMLAFYTKNKNYITDNNGLG-----EIFNYESLLPILKDLEGLEQSLCNEK
. * : : : * . .*** : . : : * . :

Şekil 1'in devamı,

```

amiexo      AIQHYKTRNYGYPNNLLNVTLCHELPP-SEISSHYRVVYSLQHKITKIEVKKYLQEIEWV
IIV25exo    AIQHYKTREYGFNILLDIASKKEITL-EGITSHYLKSYSIHHKINKKLVQLYFKEIEWV
059L        AIEHYRNRNYGYPNVLLDVVLKKEAMLTEDVTTHYLKAYSPHHKITKSLVHSYLEEIKWI
012L        VNNSEYFRDDLLESSSFLVTNEFGQQKCVNINEYREKYMKKHFESSEASLMYLEGMQWV
           . : * : . : :. :. : : . :. : . * : : : * :

amiexo      FNYYAYGSSTVDWNMYPSQFAPSPIDFVEVLTDISTNGE-----
IIV25exo    FNYYTYGGFTVDWKMYPSQFAPTPIDLLNLYLKTSKHQFA-----
059L        FNYYAYGAVCIDWNMYPSQFAPTALDLSFATLTFTSQSG-----
012L        LSYYTLKVPDWEWSYKYDYAPNLTSIEAMSFKQIGGTSKKEKNQYKLFVNSVNSTEVA
           :. ** :      : * . *      : : :

amiexo      -----HGIKHTTKNGPTDFFFQLLCILPPHSSDLLPAPLND
IIV25exo    -----QSCVNSQSHQIDPFYQLLCILPPHSSDLLPKPLNK
059L        -----LKER---KKCLTDPFFQLLCILPPHSSDLLPDPLNK
012L        TSSSGFQKSFMSVFQNSLQNTKDWDRDKTKTSSDAIPPFHQLLFILPPDSSDLLPYPLCE
           ..          ** . ***   *** . ***** ** .

amiexo      VLREDLRCFHPDEIVIDYEGKLNNEWEGIPILPALDYEKVYGHYKKKVKES-KEESKNA
IIV25exo    VLENLSHFHPKEINIELSGKLNNEWEGIPILPPLNHNEIFNIYTENIKLCS-KDDLKRNK
059L        LLVQKLVGDGHPPIEKMDYDGLKNEWEAIPILPPLDYNKILKMYNDHIHQCS-KEDLKRNT
012L        ALTNELKIYAPKELIIDRAGKRQEWEGIVLLPKLDQKVVTECYLKYKPYVTEKKDLIRDI
           * : . *      * * : : : ** : *** . * : ** * : : : * .      : * . : :

amiexo      VSNQLMISAV-----
IIV25exo    SSNQLMISVIP-----
059L        ASKQLKISAVTEF--
012L        KGRTFKYQNGEVSFL
           .. : .

```

Ek Şekil 1. CIV 012L (ekzonükleaz) proteinin diğer virüslerdeki ekzonükleaz proteinleri ile ClustalW analizi

ÖZGEÇMİŞ

15 Şubat 1982 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlkokulu Rize Bucak Köyü İlköğretim Okulunda, orta öğrenimini Rize Pazar Ortaokulu ve Ardeşen Lisesi'nde tamamladı. 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği programını kazandı. 2005 yılında bu programdan birincilik derecesi ile mezun oldu, aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. 11.12.2007 tarihinden beri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

BAŞLICA YAYINLARI

Dizman, Y.A., Demirbag, Z., Ince, I.A., Nalcacioglu, R., 2012. Transcriptomic analysis of Chilo iridescent virus immediate early promoter, Virus. Res., 167(2):353-7.

Nalcacioglu, R., **Dizman, Y.A.**, Vlaskin, J.M., Demirbag, Z., van Oers, M.M., 2010. Amsacta moorei entomopoxvirus encodes a functional DNA photolyase (AMV025), J. Invertebr. Pathol., 105(3):363-5.