

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

118810

**SIĞIR VEBASI VİRÜSÜ MATRİKS GENİNİN
KLONLANMASI VE ÖKARYOTİK
HÜCRELERDE AÇIKLANMASI**

DOKTORA TEZİ

118810

Ahmet Kürşat AZKUR

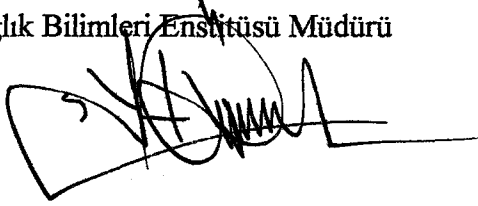
ELAZIĞ-2002

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Halis OCAK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

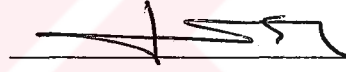


Prof. Dr. Yusuf BOZAT

..... Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf BOZAT



Prof. Dr. Mehmet İsmail BOZAT
Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

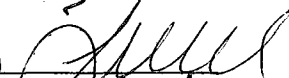
Prof. Dr. Yusuf BOZAT



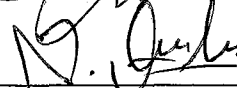
Prof. Dr. Adile MURAT



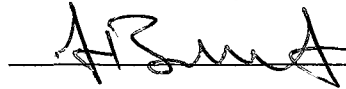
Doç. Dr. Sibel YAVUZ



Yrd. Doç. Dr. Akbulut ÖZVARENCELİ



Yrd. Doç. Dr. Halim BOZAT



İTHAF

Bu çalışmayı, milletimize bağımsız Türk Devletini armağan eden, Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e, silah arkadaşlarına, aziz şehitlerimize, gazilerimize ve bugünlere gelmemi sağlayan hocalarıma ve aileme ithaf ederim.

TEŞEKKÜR

Bana ilmi disiplini öğreten hocam Prof. Dr. Yusuf BOLAT'a, sonsuz bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ, Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ ve Yrd. Doç. Dr. Hakan BULUT'a, çalışmamda yardımlarını hiç esirgemeyen Araş. Gör. Şükrü TONBAK ve Dr. Salih KUK'a, her zaman yanımda olan Araş. Gör. İrem GÜLAÇTI, Uzm. Dr. Yasemin BULUT ve biyolog Neslihan KELEŞTİMUR, biyolog Serhat ÖZDEMİR'e ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine (FÜBAP) sağladığı maddi destekten dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ	3
3.1. Sığır vebası hastalığı	4
3.2. Sığır vebası virüsünün genel özellikleri	6
3.3. Genom yapısı	7
3.4. Hemaglütinin proteini	10
3.5. Matriks proteini	11
3.6. Nükleoprotein	15
3.7. Füzyon proteini	16
3.8. Fosfoprotein	18
3.9. Large proteini	20
4.GEREÇ VE YÖNTEM	22
4.1. pTOPO XL plazmidi	22
4.2. pCI-neo memeli açıklama vektörü	22
4.3. Hücre ve virüs	23
4.4. Toplam RNA izolasyonu	23
4.5. Primerlerin oluşturulması	24
4.6. Tersine transkripsiyon (TT) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	25
4.7. Matriks geninin agaroz jelden saflaştırılması	26
4.8. Kompetan <i>Escherichia coli</i> . hücrelerinin hazırlanması	27

4.9. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmidinin oluşturulması	28
4.10. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmidinin transformasyonu	28
4.11. Rekombinant pTOPO XL Matriks seçiminde PZR tarama (PZR-T)	28
4.12. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmidinin elde edilmesi.	29
4.13. Rekombinant pTOPO XL Matriks seçiminde kesim enzimleriyle doğrulanması	30
4.14. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmidinin oluşturulması	
4.15. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmidlerinin seçimi	31
4.16. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmid DNA'sının VERO hücrelerine transfeksiyonu	32
4.17. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması	33
4.18. Sodium dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)	33
4.19. Vestern Immunoblot Deneyi	34
5.BULGULAR	37
5.1. Matriks geninin çoğaltılması	37
5.2. Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu matriks geninin Topo XL vektöründe klonlanması	40
5.3. Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu matriks geninin pCI-neo açıklama vektöründe klonlanması ve Vero hücrelerinde açıklanması	44
6.TARTIşMA	46
7.KAYNAKLAR	51
8.ÖZGEÇMİş	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: A- Tek tabaka halindeki infekte edilmemiş Vero hücreleri, B- Sığır vebası RBOK aşısı suşu ile infekte edilmiş olan Vero hücreleri.	36
Şekil 2: % 1,5'lik agaroz jelde matriks geninin gösterilmesi.	37
Şekil 3: Sığır vebası matriks geninin PZR ile çoğaltılmasının şematize olarak gösterilmesi.	38
Şekil 4: % 1,5'lik agaroz jelde PZR taramanın gösterilmesi.	39
Şekil 5: % 1,5'lik agaroz jelde rekombinant pTOPO XL Matriks'in enzim kesimi ile doğrulanması.	41
Şekil 6: Matriks geninin pTOPO-XL klonlama plazmidine yerleştirilmesinin şematize olarak gösterimi.	42
Şekil 7: % 1,5'lik agaroz jelde rekombinant pCI-neo Matrix'in enzim kesimiyle doğrulanması.	43
Şekil 8: Rekombinant SV matriks proteininin Vestern blotlama ile gösterilmesi.	44
Şekil 9: pCI-neo memeli açıklama plazmidine matriks geninin yerleştirilmesi ve 38 kDa'lık M proteinin açıklanmasının şematize edilmesi.	45

KISALTMALAR LİSTESİ

μ l: Mikrolitre

A: Adenozin

B95a: Lenfoblastoid hücreler

Bç: Baz çifti

CPE: Sitopatik etki

DAB: Dietilamino Benzinine

DGÖ: Dünya Gıda Örgütü

dH₂O: Distile su

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTT: Dithiothreitol

E.coli: *Escherichia coli*

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

F: Füzyon

G: Glikoprotein

H: Hemaglutinin

HN: Hemaglutinin nörominidaz

Kb: Kilobaz

KDa: Kilo dalton

L: Large

LB: Luria-Bertani

M: Matriks

NP: Nükleoprotein

P: Fosfoprotein

PARC: Pan African Rinderpest Campaign

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuzlu su

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RNP: Ribonükleoprotein partikeli

RSV: Respiratorik sinsitiyal virüs

SDS-PAGE: Sodium Dodesil Sülfat Poliakrilamid Elektroforez Jel

SMV: Sitomegalo virüs

SV: Sığır vebası

TEMED:N, N, N, N,- tetrametilenamin

T: Timidin

USK: Uluslararası Salgın Komitesi

Vero: Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi

V: Volt

WAREC: West Asia Rinderpest Eradication Campaign

1. ÖZET

Bu çalışmanın amacı sığır vebası (SV) virüsü RBOK aşısı suşu matriks (M) geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanmasıdır. Bu amaçla, SV RBOK aşısı suşu ile infekte Vero hücrelerinden toplam RNA elde edildi. Matriks DNA ampikonları tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile oluşturuldu. Matriks genine özgü primerler kullanılarak 1038 bazlık M geni kodlama bölgesi çoğaltıldı. Daha sonra, matriks geni pTOPO XL klonlama vektöründe klonlandı. Matriks geninin varlığı PZR-tarama (PZR-T) ve enzim kesim deneyleriyle gösterildi. Elde edilen plazmid *EcoRI* ve *SalI* enzimleriyle kesilerek M geni pCI-neo açıklama vektörüne yerleştirildi. pCI-neo Matrix vektöründe M geninin varlığını teyit etmek amacıyla PZR-T ve enzim kesim deneyleri yapıldı. Oluşturulan rekombinant plazmid, pCI-neo Matrix vektörü olarak adlandırıldı. Sonrasında, rekombinant pCI-neo Matrix plazmid Vero hücrelerine geçici olarak transfekte edildi. Matriks proteinin varlığı Western immunoblotlama ile gösterilerek Vero hücrelerinin anti-M antikoruyla reaksiyona giren 38 kDa'luk bir proteini açıkladığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Sığır vebası, matriks geni, klonlama, protein açıklanması.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to cloning and in eucaryotic cells to expression of matrix (M) gene of RBOK vaccine strain of rinderpest virus (RPV). For this purpose, total RNA was extracted from Vero cells infected with RBOK vaccine strain of RPV. Matrix DNA amplicons were obtained with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). 1038 bases matrix coding gene region was amplified by using spesific primers to the matrix gene. Then, the M gene was cloned into TOPO XL cloning vector. The presence of M gene was confirmed by PCR screening and enzyme digestion assays. The recombinant plasmid was cut with *EcoRI* and *SalI* enzymes to obtain the M gene. Then, the M gene was placed into pCI-neo mammalian expression vector. So, the resulting recombinant plasmid was named as pCI-neo Matrix. Afterwards, the pCI-neo Matrix vector was transiently tranfected into Vero cells. The presence of the Matrix proteins was showed by Western Immunoblotting assay demonstrating that Vero cells express a 38 kDa protein reacting with anti-M antibody.

Key words: Rinderpest, matrix gene, cloning, protein expression.

3.GİRİŞ

Sığır vebası (SV) virüsü Doğu Afrika, Ortadoğu ve Güney Asya başta olmak üzere dünyanın birçok yerinde, evcil ve vahşi geviş getirenlerde ekonomik yönden büyük kayıplara sebep olmaktadır (23, 86). Hastalık ilk kez 4. yüzyılda tanımlanmış ve 1711 yılında İtalya'da resmi kayıtlara geçmiştir. Bu hastalıkla mücadele için 1762 yılında, Fransa'nın Lyon kentinde veteriner fakültesi kurulmuştur (96). Türkiye'de hastalık en sonuncusu 1991 yılında olmak üzere, üç büyük salgına neden olmuştur. Son görülen salgın, Doğu Anadolu bölgesinden başlayarak birkaç hafta içerisinde tüm ülkeye yayılmıştır (47, 86, 96). Bununla birlikte hastalık 1998 yılında Rusya'da da bildirilmiştir (84). Dünya Gıda Örgütü (DGÖ) tarafından 2010 yılına kadar hastalığın eradike edilmesi için çalışmalar planlanmıştır (100). Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Yeni Zelanda ve Avustralya'da görülmemesine rağmen hastalık bu ülkeleri de tehdit etmektedir. Herhangi bir salgının ise bugüne kadar yapılan tüm çabaları boşa çıkaracağı aşıkardır (44).

Rekombinant DNA teknolojisinin 1970'li yıllarda tanımlanması bir devrim olarak nitelendirilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi gen üzerinde yapılmak istenilen müdahaleleri son derece kolaylaştırmış ve bir çok genin yapısal, fonksiyonel özelliğinin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Aynı zamanda istenilen miktarda ve farklı özelliklere sahip proteinlerin üretilmesine de olanak vermiştir. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pox, herpes ve adeno virüslerin vektör olarak kullanıldığı viral aşılar insan immun yetmezliği, herpes virüs enfeksiyonları ve SV hastalığında bir umut olarak görülmektedir. Pozitif sarmallı RNA virüslerinden elde edilen genomik RNA enfeksiyöz olarak

kullanılabilmesine karşın negatif sarmallı virüslerden elde edilen genomik RNA'lar infektif değildir. Bu zorluk kurtarma sistemlerinin tanımlanması ile aşılmıştır. Böylece negatif sarmallı RNA virüslerin genomu hakkında bilinmeyen bir çok soruyu cevaplayacak yeni bir metot olarak görülmektedir (10, 24, 28, 35).

İngiltere Pirbright Hayvan Sağlığı Enstitüsünde 15 dakika gibi kısa sürede sonuç veren tanı kitleri ve aşı hayvanların, infekte hayvanlardan ayırt edilmesini sağlayan marker aşılar geliştirilmiştir. Fransa'da ise pelet formunda ağızdan aşılama için çabaların olduğu bildirilmiştir (26, 44, 100).

Günümüze kadar SV virüsü matriks (M) geni hakkında az sayıda çalışma yapılmıştır. Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu ile aşılanan hayvanlarda M proteinine karşı gelişen $CD4^+$ T hücre cevabının, virüsün nükleoprotein (NP), füzyon (F), hemaglutinin (H) proteinlerine karşı gelişen $CD4^+$ T hücre ile aynı seviyede olduğu bildirilmiştir (67). Kızamık ve köpek gençlik hastalıklarında tanımlanan persiste infeksiyonlar M geninin önemini ortaya koymuştur (49). Sığır vebası virüsünün farelerin sinir sistemlerine yerleşebildiği deneysel çalışmalarla ispatlanmıştır (39). Bu gibi sebeplerden dolayı SV virüsü M geninin infekte hayvanların bağışıklık sisteminde, patojenitesinde ve virüs biyolojisinin de oynadığı rolün daha iyi anlaşılması için çalışmalar devam etmektedir (11, 45, 67).

3.1. Sığır vebası hastalığı

Türkiye'de SV virüsü halk arasında çor, malkıran, sığırların salgını olarak bilinen ölümcül hastalığa sebep olmaktadır. Hastalık akut veya subakut seyreden $42^{\circ}C$ 'ye varan yüksek ateş, diş etleri, dil ve yanakta şiddetli doku kayıpları, gözyaşı akıntısı, kanlı ishal ve lökopeni ile karakterizedir (23, 37, 45, 67, 81, 86).

Hastalığın morbiditesi % 100'e varmakla birlikte, yüksek virülense sahip virüslerle infekte olan duyarlı hayvanlarda mortalite % 100'dür. Başlıca sığır, bufalo ve yaklarda hastalık oluşmasına rağmen koyun, keçi ve vahşi çift tırnaklıların da hastalıktan etkilenebileceği bildirilmiştir (45, 101).

Dünya Gıda Örgütü ve Uluslararası Salgın Komitesini (USK)'de içerisinde alan ilgili kuruluşlar Dünya Sığır Vebası Organizasyonunu başlatmıştır (Global Rinderpest Organization). Bu organizasyon öncelikle SV hastalığının ortaya çıktığı bölgelere göre sınıflandırma yapmıştır. Böylece üç büyük bölgesel kampanya başlatılmıştır. Bunlar Afrika sığır vebası kampanyası (Pan African Rinderpest Campaign: PARC) Batı Asya eradikasyon kampanyası (West Asia Rinderpest Eradication Campaign: WAREC) ve Güney Asya eradikasyon kampanyalarıdır (86). Programda hastalıkla mücadele için belli başlı prensipler ortaya konmuştur. Bunlardan Plowright RBOK aşı suşundan üretilen hücre kültürü aşıları kullanılması savaşında öne çıkmıştır. Aşı 1911 yılında izole edilen orjinal SV virüsü virulent Kabete O suşunun birçok kez pasajlanması sonucu elde edilmiş olup, oldukça etkili ve güvenlidir (29). Kullanılan RBOK aşıları immun sistemi baskılamamaktadır. Fakat az miktarda bir lökosit düşüşüne sebep olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Aşının başarısı soğuk zincirin tam olarak sağlanmasına bağlıdır. Sıcak iklime sahip olan bölgelerde aşının uygulanmasındaki zorluklar bilinmektedir. Aşılamanın uygun görüldüğü ülkelerde sığır varlığının tamamı aşılanmalı, aşı ve aşı olmayan hayvanların birbirinden ayırt edilebilmesi için işaret konulması kararlaştırılmıştır. Aşılama sonrası ise hayvanların bağışıklık durumları enzim bağı immunosorbent deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) gibi testlerle kontrol altında tutulması

önerilmektedir (86). Sığır vebası hastalığının tanısında ilk olarak hasta hayvanlardan elde edilen marazi maddelerle virüs izolasyonları yapılmıştır. Virüs izolasyonları göz, burun ve erozyonlu bölgelerden alınan dokularla yada svaplarla yapılmaktadır. Teşhis amacıyla agar jel difüzyon ve lateks agglütinasyon testleri yıllarca kullanılan tekniklerdir. Dünyanın birçok ülkesinde rekabetçi ELISA, strip testi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yürürlükte kullanılan tanı yöntemleridir (26, 38, 63).

3.2. Sığır vebası virüsünün genel özellikleri

Mononegavirales süper ailesinin, *Paramyxoviridae* ailesi paramyxovirinae ve pneumovirinae alt aileleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu süper aile ise başlıca Respirovirüs, Morbillivirüs, Rubulavirüs, Pneumovirüs, Filovirüs diye beş cinse ayrılır. Sığır vebası hastalığına yol açan etken Morbillivirüsler içerisinde yer almaktadır (37, 57). Bu beş grup içerisinde morbillivirüs ve respirovirüslerin daha yakın ilişkili olduğu gen ve protein analizi çalışmaları ile gösterilmiştir. SV virüsünün, kızamık, küçük ruminat vebası, köpeklerin ve ayı balıklarının gençlik hastalığı virüsleri ile antijenik yakınlığı vardır (37, 102).

Sığır vebası virüsü küresel bir morfolojiye sahip olup yaklaşık 100-200 nm çapındadır. Virüs zarlı bir yapıda olup üzerinde 10-15 nm uzunluğunda ışınal çıkıntılar mevcuttur. Antijenik olarak tek serotiptir, fakat farklı virülense sahip farklı izolatları mevcuttur. Virüs çevre şartlarına oldukça duyarlıdır ve tropikal şartlar altında birkaç saat içerisinde çabukça inaktive olmaktadır (37,102).

3.3. Genom yapısı

Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu 15882 nükleotid uzunluğunda negatif anlamlı RNA virüsüdür. Diğer morbillivirüslerde olduğu gibi üst üste gelmeyen (non-overlapping) 6 gen bölgesi vardır. Bu genler 3' N-Fosfoprotein (P)-M-F-H-Large (L) 5' şeklinde dizilmiştir. Her bir gen kısa polimeraz bağlanma bölgesi, kapsidlenme sinyalleri, başlangıç ve bitiş kodonları içermektedir (12). Ayrıca her genin mRNA'sına viral polimerazlar tarafından eklenen poli A rezidüleri mevcuttur. Genler arasında kodlama olmayan bölgelerde sınır oluşturan CTT üçlü nükleotidleri bulunmaktadır. Genom ilk 55 bazlık öncü dizilim (Leader Sequence) ile başlar (12, 57, 71). Ellibeşinci ve 108'inci nükleotidler arasında NP geninin kodlama yapmayan mRNA dizilimini içerir ve 1747'nci nükleotidde NP geni sonlanır (8, 78). Bu geni 1807. ve 3323'üncü nükleotidler arasında kodlanan fosfoprotein (P) geni takip eder. Fosfoprotein geni içerisinde V ve C genleri mevcuttur. C proteinini kodlayan kısım 1750. ve 2283'üncü nükleotidler, V proteinini kodlayan kısım ise 1728. ve 2626'nci nükleotidler arasındadır (13).

Matriks geni 3405'inci nükleotidde başlayıp, 3438. ve 4445'inci nükleotidler arasında M proteini kodlama bölgesini bulundurur (11). Füzyon geni 4868'inci nükleotidde başlamakta, 5458. ve 7098'inci nükleotidler arasında ise protein kodlama bölgesini içermektedir. Füzyon geni kodlama yapılmayan bölgesinde 630 nükleotid vardır (97). Böylelikle F geni en uzun kodlama yapılmayan bölgeyi içermektedir ve yaklaşık olarak bu genin % 27'si kodlanmamaktadır. Matriks geninde ise 556 nükleotid protein kodlama bölgesi dışında olup genin yaklaşık % 38'ini oluşturmaktadır. Kızamık, insan parainfluenza 3 virüsü ve respiratör sentiyal virüslerinin (RSV) kodlama

yapılmayan bölgelerinde önemli cis elementlerinin olduğu bilinmektedir (78). Hemagglutinin geni 7259. ve 9088'inci nükleotidler arasındadır. Genomun en büyük kısmını temsil eden 6652 nükleotidlik bir bölgeyi kapsayan L geni, H genini takip etmektedir. Genin 9222. ve 15773'üncü nükleotidleri arasında kodlama yapan dizilim mevcut olup 15643. ve 15882'nci nükleotidler arasında (trailer sequence) dizilimini bulunmaktadır (8, 71, 98).

Bütün viral genomlarda bulunan cis-acting düzenleme dizilimleri viral yaşam döngüsünün sürekliliği için önemlidir. Kızamık virüsü gibi diğer birçok paramiksovirus de cis rol oynayan düzenleme dizilimlerinin genom replikasyonu, paketlenme, mRNA sentezi, translasyon, editleme ve aşamalarında sahip oldukları rol bilinmektedir. Morbillivirüslerin genomunun 3' ucundaki kodlama yapılmayan yaklaşık 107 nükleotid iki farklı RNA sentezini başlatan promotor dizilimini içermektedir. Bu bölge öncü okuma kontrol bölgesi (leader transcriptional control region) diye tanımlanmıştır (71). Bölgelerden bir tanesi replikasyon için genomun bir ucundan diğer ucuna kadar pozitif iplik üretir. Diğer ise uzama (elongation), sonlandırma (termination) ve yeniden başlama (reinitation) transkripsiyon bölgesidir. mRNA sentezi boyunca transkripsiyonun sonlandırılması ve yeniden başlatılması her bir gen arası bölgedeki korunmuş dizilim sinyalleri tarafından yönetilir. Aynı zamanda bu korunmuş dizilimler poliadenilasyon sinyallerinden de sorumludur. Pozitif sarmallı genomun 3' ucunda sonlandırma bölgesi bulunur. Bu bölge primer RNA polimeraz tanıma bölgesi, G (N)_s, B kutusu içermektedir. Fosfoprotein geninin sistronlarındaki cis elementi bazı P transkriptlerine G rezidüsü ilave edilmesine izin verir ve translasyonel frameshift mekanizması ile V proteinin sentezini gerçekleştirir (57, 71, 78).

Paramiksovirüsler özellikle kendileri gibi segmentsiz rhabdovirüslere benzer genom organizasyona ve açıklanma mekanizmalarına sahiptir (57). Negatif sarmallı virüslerin replikasyon yolları ise bir paramiksovirüs olan newcastle virüsü ile infekte hücrelerdeki RNA sentezi çalışmalarıyla bulunmuştur. Her bir paramiksovirüs geni infeksiyon boyunca farklı mRNA'lardan sentezlenmektedir. İnfeksiyon, H proteininin hücredeki siyalik asit reseptörlerine tutunması ve F proteini yardımı ile hücre zarını değiştirerek içeri girmesi ile başlar. Sığır vebası virüsü başlıca primer sığır hücre kültürü, Afrika Yeşil Maymun Böbrek hücresi (Vero), lenfoblastoid hücreler (B95a), sığır fibroblast hücrelerinde üretilmiştir (58). Genetik materyal hücre sitoplazmasında serbest hale geçer. Her gen transkripsiyondan sonra ilgili proteinleri sentezlenmektedir. Bu arada negatif sarmallı genomdan virüs ilişkili RNA'ya bağlı RNA polimeraz tarafından tam uzunlukta RNA sentezlenir ve negatif sarmallı RNA için kalıp olarak kullanılmaktadır. Genin 3' ve 5' ucu arasında ki bölgesi uzun urasil rezidülerini içermektedir. Bu rezidüler genomik, antigenomik ve mRNA transkriptlerinin sentezini büyük ölçüde değiştirmektedirler. RNA polimeraz ilişkili L proteini ve onun kofaktörleri, P, viral RNA nükleoproteinleri RNA protein kompleksi yada ribonükleoprotein partikeli (RNP)'yi oluşturur ve polimeraz aktivitesini sağlarlar. Polimeraz aktivitesi genin sonuna doğru azalır. Başka bir deyişle, NP transkriptleri alt uçtaki L gen transkriptlerinden daha fazla sentezlenmektedir. Yeterli protein sentezi olduktan sonra replikasyon başlar. Matriks ve diğer glikolize olmamış proteinler değişmiş konakçı zarına doğru taşınırlar. Konakçı membranına H ve F proteinleri girerek, membranın kompozisyonunu değiştirirler.

Bu bölgenin altında M, RNP birleşir ve tomurcuklanma yardımıyla yeni virüsler serbest hale geçer (37, 41, 42, 57).

3.4. Hemaglütinin proteini

Sığır vebası virüsünde viral zar başlıca üç proteinden oluşmaktadır. Bu viral proteinlerden iki tanesi glikoproteindir. Bütün paramiksoviruslerde bu glikoproteinler hücre yüzeyine tutunmak için aracılık ederler. Sığır vebası virüsü açık okuma bölgesinden 1827 nükleotidlik mRNA şifresi okunarak, 609 amino asitten meydana gelen glikolize H proteini sentezletilir. Glikolize formdaki H proteini 77000 daltonluk moleküler ağırlığa sahiptir (45, 57, 104).

Paramyxoviridae ailesine mensup virüslerde H proteini adlandırılırken hemaglütinasyon ve nörominidaz etkileri göz önünde bulundurulmuştur. Bu iki özelliği birden taşıyorsa protein hemaglütinin nörominidaz (HN), sadece hemaglütinasyon özelliği taşıyorsa (H), her iki özelliği de taşıyor ise glikoprotein (G) olarak adlandırılmıştır (12, 57). Sığır vebası virüsünün hemaglütinasyon özelliği yoktur. Buna karşın, SV virüsüne karşı oluşan antikorlar, kızamık virüsü tarafından maymun eritrositlerinin hemaglütinasyonunu engellemektedir (56). Sığır vebası ve küçük ruminant vebası virüsleri H proteininin sığır çene altı bezlerinden salgılanan musin tip1'ler üzerinde nörominidaz etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Nörominidaz etkisi paramiksoviruslerde olduğu gibi kalsiyumdan bağımsız ve geniş pH dilimi içerisinde etki göstermektedir (62).

Virüsent Kabete O ve RBOK aşısı suşu analizlerinde görülen değişiklikler N-bağılı glikolizasyon bölgesi ve tahmini hemaglütinin ilmek (loop) bölgeleri

üzerindedir. Kabete O suşu H proteininde 35. ve 58'inci amino asitler arasında hidrofobik bir bölge mevcuttur. Sığır vebası H proteininde 168, 187, 200, 215, 395'inci amino asitleri glikolizasyondan sorumludur. Kızamık virüsü H proteininde sadece 395'inci amino asit üzerinde glikolizasyon bölgesi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, kızamık virüsü H proteininin 238. glikolizasyon bölgesi sığır vebası H proteininde yoktur. Kızamık ve SV virüslerinin, H proteini transmembran bölgesinde aynı sistein rezidülerini içerisinde barındırır (62, 104). Rekabetçi bağlanma deneyleri ile SV virüsü H proteini üzerinde en az yedi farklı antijenik bölge gösterilmiştir. Bu bölgelerden 6 tanesinin nötralizan antikor oluşturma aktivitesi vardır. Sığır vebası H proteini nötralizan antikorları uyarma yeteneğinden dolayı bağışıklık oluşturma da temel bir antijen olarak kabul edilmektedir (104).

3.5. Matriks proteini

Sığır vebası virüsü M geni 1457 nükleotid uzunluğunda olup iki tane açık okuma bölgesi içermektedir. İlk açık okuma bölgesi 335 amino asit kodlayıp 38289 dalton moleküler ağırlığa sahip protein sentezler. İkinci açık okuma bölgesi genin 991'inci nükleotidinden genomun son kısmına kadar devam eder (11, 33, 83). Bu bölge kızamık virüsü diziliminde bulunmasına rağmen, köpek gençlik hastalığı virüsü diziliminde yoktur (17). Matriks geninin ATG başlama kodonunun -3'üncü pozisyonunda pürin (A:Adenin) ve +4'üncü pozisyonunda primidin (G:Guananin) bulunmaktadır. ATG kodonu verimli protein sentezi için birçok ökaryotik mRNA'da bulunan korunmuş bir dizilimi içerir (60).

Matriks proteinleri morbillivirüslerin viral unsurları içerisinde en çok korunmuş olan proteinlerdendir. Sığır vebası virüsü M proteini % 78,2 kızamık virüsü, % 77,6 köpek gençlik hastalığı virüsünün, % 56 ayı balığı gençlik virüsü (phocid distemper) M proteinlerine benzemektedir. Sığır vebası virüsünün farklı izolatlarında yapılan in vivo ve in vitro translasyon çalışmalarında Kuveyt (Kuwait strain) suşunun RBOK aşısı suşundan daha büyük olduğu ortaya konmuştur (11, 12, 33, 64, 89).

Glikolize olmayan M proteininin lipid zar ve nükleokapsid arasında bulunması virüse dayanıklılık kazandırmaktadır. Zarlı virüslerin kurgusu ve tomurcuklanmasında M proteinleri önemli rol oynar. Paramiksovirüslerde M proteininin viral RNA sentezi ve aşamalarını düzenlediği, hem hücresel aktin ve zarla hem de nükleokapsid ile etkileştiği gösterilmiştir (45, 106). Vesiküler stomatitis virüsü (VSV) M proteini ve influenza virüsü tip A M1 proteini üzerine yapılan çalışmalarda ilgili proteinin viral RNA polimeraz aktivitesini engellediği bildirilmiştir. Fakat M proteini yalın halde bulunan RNA'ya bağlanmadığı RNA-nükleoprotein kompleksine bağlandığı ifade edilmiştir (72).

Matriks proteininin tomurcuklanmadaki rolü ya da hücrenin üst yüzeyine (apical) taşınmasında başlıca iki teori vardır. (i); Sendai virüslerinde olduğu gibi M proteininin viral glikoproteinlerle (ii) VSV'de olduğu gibi viral glikoproteinlerden bağımsız olarak taşındığıdır (1, 82). Tomurcuklanmanın verimli olabilmesi için hücrelerin üst yüzeye düzenli aşamalarla taşınması gerekir. Matriks proteinin oluşturulması ve taşınması viral integral zar proteinlerinden farklıdır. Bunun başlıca sebebi M proteininin sitoplazmada golgi vezikülleriyle birleşmeyen ribozomlardan sentezlenmesidir (82). Proteinin yüzeye taşınmasında nükleokapsid

ve diğ er viral proteinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Matriks proteini virüsün kurgusu sırasında, konak hücrenin zarı içerisinde bulunan H ve F proteinlerinin sitoplazmik kuyruklarıyla etkileşim halindedir. Matriks proteininin bu bölgeye glikoproteinlerin kuyruklarına tutunarak geldiği farz edilmektedir (85). Diğ er bir görüş ise taşınmanın bilinçli sinyallerle değil de rastgele olduğudur. Bu görüş göre ise M proteininin hücre iskelet sistemi ile kurmuş olduğu ilişki ön plana çıkmıştır (82). Hücre   st yüzeyi ile yan (basolateral) yüzeyi arasında iskelet yapının farklılığı bilinmektedir (66). Kızamık virüsü ile infekte hücrelerde ki aktin yıkımlandığı zaman, tomurcuklanmanın engellendiği görülmüştür (93). Aktin proteini epitel hücrelerin üst mikrovillileri içerisinde yoğun olarak bulunması ve Sendai virüs M proteininde de bu ilişkinin tanımlanması bu fikre ayrı bir önem kazandırmıştır. Hücre iskelet sisteminde bulunan moesin ve ezrin proteinlerinin M proteininin taşınmasına eşlik ettiği düşünülmektedir (82). Matriks proteininin taşınmasında diğ er ilgi çekici model raftlar içerisinde ta ınmadır. Raft golgide oluşturulan, hücre zarı üzerindeki kolesterol ve glikosifingolipidlerce zengin bölgelerdir. Golgide oluşturulan bu yapılar daha sonra zara göçerler. Kızamık virüsünün epitel, lenfosit, ve HeLa hücrelerinde raftlarla ilişkisi gösterilmiştir. Veziküler stomatitis virüs G geninin kızamık virüsü H ve F genlerinin yerine yerleştirilmesi ile kızamık virüsünde M proteininin kurgulanma esnasında organizatör bir rol oynadığı bildirilmiştir. Matriks proteini ve F proteininin sitoplazmik kuyruğu ile birleşerek membran raftına, RNP ile birlikte sürüklenir (25, 82, 99). Power ve arkadaşları M proteinlerini başlıca 5 grup altında toplamışlar. Kızamık, köpek gençlik hastalığı ve SV virüslerinin M proteinlerini 2. grup içerisinde sınıflandırmışlardır (80).

Sığır vebası ve ayı balığı virüsü M proteinlerinin +7, köpek gençlik hastalığı virüsünün +8,5, kızamık virüsünün +10,5 net yüke sahip olduğu bilinmektedir. Matriks proteininde başlıca iki korunmuş bölge vardır. Proteinin N-ucu alfa heliks (α -heliks), beta-yaprak (β -sheet) yapmaksızın birçok büyük kıvrım oluşturan birçok sayıda prolin ve glisin amino asitlerini içermektedir. Korunmuş prolin ve glisin amino asit bölgeleri proteinin ikincil ve üçüncül yapılarını önemli derecede etkiler ve M proteini içerisinde önemli elementler olarak kabul edilirler. Karboksil ucunda ise virüsün olgunlaşmasında iyonik etkileşimde rol oynadığı farz edilen bazik rezidüler vardır. Başlıca bu bazik rezidüler nükleokapsidle elektrostatik olarak etkileşmektedir. Aynı bölgede membran ile etkileştiği düşünülen yüksüz amino asit bölgeleri mevcuttur. Bütün negatif sarmallı virüslerde matriks proteini lipidlere etkili bir biçimde hidrofobik olarak bağlanır. Veziküler stomatitis virüslerin elektrostatik olarak da etkileşebilmesi bir istisnadır. Matriks proteininin, ayı balığı gençlik virüsünde % 11,9, SV virüsünde % 14,3, köpek gençlik hastalığı virüsünde % 13,1, kızamık virüsünde %14'ü bazik rezidülerden oluşmaktadır. Morbillivirüslerde 16 prolin rezidüsünün 14'ü, 24 glisin rezidüsünün ise 20'si korunmuştur. Bütün morbillivirüslerde M proteininin en çok korunmuş dizilimi 99'uncu amino asitten 114'üncü amino asite kadar olan bölgedir. Bu bölgede korunmuş bazik amino asitlerin kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan bilgisayar analizlerinde matriks proteininin yüksek arjinin (Arg, R), lizin (Lys, K), histidin (His, H), içerdiği ortaya konmuştur. Bu sebeple, M proteininin tripsin benzeri enzimlere son derece duyarlı olduğu ve tripsin enzim ile 43 ayrı parçaya ayrıldığı bildirilmiştir (11, 40, 64, 89).

3.6. Nükleoprotein

Nükleokapsid başlıca iki yapısal bölgeye ayrılmaktadır. Birinci kısım RNA ile etkileşebilen molekülün üçte ikilik kısmını oluşturan amino (N) ucu, diğ r kısmı ise n kleokapsidleri oluşturacak yüzeyde bulunan karboksil ucudur. İkinci kısımda n kleokapsidin bağılandığı ve menteşe görevi yapan bölge, proteazlara duyarlıdır ve komplekse esneklik kazandırmaktadır (57). Elektron mikroskop görüntüleri bu esnek yapıların NP-NP ya da NP-RNA etkileşiminde ki hidrofobik kuvvetler yardımıyla olduğunu göstermiştir. Paramiksovir slerin RNA sentezinde, kalıp olarak  ıplak RNA kullanılamaz. Altı nükleotidin ilişkili olduğu tahmin edilen her bir NP, virüsün nükleokapsid korunu oluşturur. Paramiksovir sler de bu ilişkinin bir sonucu olarak yalnız 6 nükleotidden oluşan bölge replikasyonu düzenler ve bu altı kuralı diye adlandırılır. Negatif sarmallı virüslerde NP-RNA ilişkisi RNA sentezi için gereklidir. Sendai virüslerde transkripsiyon aktivitesi için nükleokapsid 300 P ve 50 L proteinleri ile birlikte viral polimeraz aktivitesini meydana getirirler. Fosfoprotein homotrimeri ve L proteini ise hem katalitik hem de bağımsız olarak bulunur. Bu yapı neticesinde NP-RNA ve 3P-L kompleksi mRNA sentezi için gereklidir. N kleokapsidle birlikte bulunan RNA, RNase sindirimine karşı dayanıklıdır (59).

Negatif sarmallı virüslerde RNA'nın kapsitlenmiş olması hücreden yoksun sistemlerde kalıp görevi yapmasına izin verir. Nükleoprotein negatif sarmallı virüslerin RNA'larıyla etkileşmesi replikasyon ve transkripsiyon aktiviteleri için zorunluluktur. Aynı zamanda paramiksovir slerdeki NP, diğ r yardımcı nükleokapsid proteinleri olan P ve L proteinleri ile de etkileşmektedir (70).

Sığır vebası virüsü NP'si 1683 nükleotidden oluşan tek açık okuma bölgesine sahip genden kodlanmaktadır. Bu protein 525 amino asitten oluşan fosforilize yaklaşık 65000 dalton moleküler ağırlığa sahiptir (45, 55).

Morbillivirüs infeksiyonlarında nötralizan antikorların üretilmesinde yüzey glikoproteinlerinin korumada önemli role sahip oldukları bilinmektedir. Diğer yandan sitotoksik lenfositleri ve yardımcı T hücrelerini içeren hücresel bağışıklığın virüsün temizlenmesinde gerekli olduğu bilinir. Sığır vebası NP geni içeren rekombinant vaccinia virüslerle aşıları hayvanlarda, sığır vebası NP'ye özgü lenfosit çoğalması ve sitotoksik lenfosit cevabı görülmüştür. Yardımcı T hücreleri, B hücre aktivasyonu ve sitotoksik T hücre cevabı için gereklidir. Sığır vebası NP'ye karşı oluşan yardımcı T hücre cevabı veren bölge 45-510. amino asitleri arasında tanımlanmıştır. Nükleoprotein beş antijenik bölgesinden en az dört tanesi morbillivirüsler arasında tamamen korunmuştur (16). Nükleoprotein virüsün iç proteini olmasına karşın tamda büyük ilgi uyandıran olumlu cevaplar vermiştir (54).

3.7. Füzyon proteini

Füzyon proteini hücreden hücreye yayılmada, virüsün konak hücre ile kaynaşmasında ve virüsün infektivitesinde temel rol oynamaktadır. Zarlı virüslerin hücreye girebilmesi için bir ya da daha fazla reseptöre tutunması ve hücre zarı ile virüsün kaynaşması gerekmektedir. İnfluenza, alfavirüs, rhabdovirüs, flavivirüs gibi zarlı virüsler reseptör aracılı endositoz ile hücre içerisine girerler. Endozomlar içerisinde asidik bir pH'ya maruz kaldıktan sonra F proteini de bir kısım konformasyonel değişikliklere uğrar ve endozomlarla viral

zar kaynaşır. Paramiksovirüs, coronavirüs, retrovirüslerde ise nötr pH bu olaya aracılık etmektedir (61, 98). Nükleokapsidler, paramiksovirüslerin konakçı hücreye tutunmasından sonra sitoplazma içerisinde dağılır. Bu adım F glikoproteininin aracılığı ile gerçekleşir. Füzyon proteininde iki önemli hidrofobik bölge daha mevcuttur. Bunlar endoplazmik retikulum içerisinde olgunlaşmaya başlayan polipeptid sinyal bölgesi ve hücre zarına füzyon proteinin karboksil ucu tutunma bölgeleridir. Füzyon proteini aktif olmayan bir protein olarak sentezlenir ve F_0 olarak adlandırılır. F_0 konakçı hücrenin proteolitik enzimleri ile nötr pH'da birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlı olan F_1 ve F_2 proteinlerine ayrılır. F_1 proteini üzerinde tutunma bölgesi bulunmaktadır. F_1 proteinin amino asit dizilimi, simian virüs 5, sendai, newcastle, parainfluenza ve kızamık virüslerinde korunmuştur. F_0 proteini 546 amino asitten oluşan, 62000 dalton moleküler ağırlığa sahip olan bir proteindir. F_0 proteazlarla kesildikten sonra, ortaya çıkan F_1 proteini 49500 dalton ve F_2 proteini ise 21500 dalton moleküler ağırlığa sahiptir. F_0 ve F_2 proteinleri glikolize halde bulunmaktadır. Sığır vebası füzyon proteini Arg-Arg-His-Lsy-Arg (104-108'inci amino asitleri arası) kesilme bölgesi olarak tahmin edilmektedir. F proteinin 1-19, 109-133, 418-513'üncü amino asitleri hidrofobik bölgeler olarak tespit edilmiştir (27, 45, 57, 98).

Füzyon proteininin virüs patolojisinde oynadığı rol proteinin sentezlenme miktarı ile ilgilidir. Ökaryotik mRNA'lar da protein açıklanması 5' ucuna en yakın başlangıç kodonundan başlar. Sığır vebası virüs F geninin 5' ucunda üç tane başlangıç kodonu vardır. Üçüncü başlangıç kodonu 587'inci nükleotidde başlayıp F_0 mRNA'sını sentezlemektedir. Bu başlangıç kodonun seçiminde korunmuş kozak dizilimi önemli rol oynamaktadır. Füzyon geninin 5' ucu protein

açıklanmayan bölgesi (untranslated region: UTR) SV virüsünde % 65, kızamık virüsünde % 67, köpek gençlik hastalığı virüsünde % 57 GC'den zengin bölgelerin mRNA'sını içermektedir. GC'den zengin bölgeler mRNA'nın bu olay sırasında oluşan ikincil yapılar ise protein açıklanması üzerinde önemli rol oynarlar. Kızamık virüsünde protein açıklanmayan bölgelerin tavşan retikulosit sistemlerinde protein açıklanmasını engellediği bildirilmiştir. Köpek gençlik hastalığı ve SV virüslerinde bu bölgeler genden çıkarıldığında F proteinin üretiminin arttığı görülmüştür (36, 98).

3.8. Fosfoprotein

Sığır vebası virüsü Kabete O suşunda P geni, 49'uncu nükleotidden başlayıp 1570'inci nükleotidde sonlanarak, 507 amino asit büyüklüğünde, 92500 dalton moleküler ağırlığa sahip olan P proteinini kodlamaktadır (45). Fosfoproteinlerin paramiksovirüslerde polimeraz aktivitesi bilinmesine karşın, morbillivirüslerde bu özellik tanımlanmamıştır. Sığır vebası virüsünde P geni V, C diye adlandırılan iki tane yapısal olmayan protein daha sentezlemektedir (57, 88). Negatif sarmallı virüslerde P proteininin bir çok fonksiyonu tanımlanmıştır. Örneğin NP-P kompleksi NP proteininin kurgusunu engellemektedir. Benzer şekilde VSV'de kurgulanmamış NP, P'ye bağlanmayı tercih ettiği için, RNA'ya bağlanması özgül olmayan biçimde engellenir. Fosfoprotein L proteini ile etkileşimi kızamık, veziküler stomatitis ve sendai virüslerde L proteininin proteolitik aktivitesini engeller. Sığır vebası P'nin kendisi ile etkileşiminde 316. ve 508'inci amino asitlerinin karboksil uçları önemli rol oynar. Fosfoprotein bu etkileşmesinde 316. ve 347'nci amino asitler arasındaki bölge birinci derecede

sorumlu olup coiled coil bölge olarak tanımlanmıştır. Mevcut bölgede sistein rezidüleri bulunmamaktadır. Protein kendisi ile çok güçlü bir biçimde etkileşmektedir. Bu yüzden P-P etkileşimine disülfid bağları katkıda bulunmaz. Aynı zamanda P'nin amino ucundaki 59'uncu amino asite kadar ve karboksil ucunda ki 316. ve 347'nci amino asitleri arası P, NP etkileşiminin uyarılmasında gerekli oldukları belirlenmiştir (88).

Sendai virüs ve insan parainfluenza virüs tip 1 P geni, kendisinden hariç üst üste gelen biçimde, karboksil ucundan dört protein daha kodlar. Bunlar C, C' ve Y1, Y2 proteinleridir (22, 32). Morbillivirüsler bir C proteini açıklarken rubulavirüsler, kabakulak ve simian virüs 5 gibi virüsler ise C proteini açıklamaz. Kızamık ve sendai virüslerde C proteinin NP ve P ile ilişkide olduğu görülmüştür. C proteini yapısal olamayan bir protein olarak bilinmesine karşın, saflaştırılmış sendai virüs partikellerinde C proteini tesbit edilmiştir. Sendai virüsde C proteinin genom promotorunda L proteini ile etkileşerek transkripsiyonu azalttığı görülmüştür. Sendai virüs C yada C' genleri eksik kurtarılmış virüslerde büyüme yabani tip gibi olmasına karşın viral mRNA az derecede açıklanmıştır. Her iki genide içermeyen kurtarılmış virüslerde büyüme tamamen durmuştur. Bu deneylerde virüsün farelerdeki patojenitesinin ortadan kalktığı da görülmüştür (14, 17, 18, 19, 51, 103). Sığır vebası virüsünde P ilk açık okuma bölgesinden sentezlenir. Bununla birlikte okuma bölgesinin +1 kaymasıyla 20 nükleotid ileride ki ikinci açık okuma bölgesine yönelmesi sonucunda 21500 dalton moleküler ağırlığa sahip olan C proteinin sentezlenir. P ve C okuma bölgesi ribozomal seçimle açıklanır. Sığır vebası virüsünde ikinci okuma bölgesinde yapılan mutasyonlarla, kurtarılmış sistemlerde C proteini eksik virüsler elde edilmiştir. Bu

virüslerin yabancı tip virüslere göre doku kültürlerinde daha az üreme kapasitesine sahip oldukları gözlenmiştir. C proteini açıklamayan virüslerde, H ve P'nin transkripsiyonunun baskılandığı görülmüştür (14, 95).

Sığır vebası virüsü P mRNA'sı bisistronik olarak görev yapar. V proteini, editleme bölgesi diye adlandırılan özel bir bölgeye G rezidüsü eklenmesi ile oluşur. V proteinin açıklanması için UUAAAAAGGGCACAGA dizilimindeki üç G yanına bir G daha eklenmesi gerekir. V geni içermeyen kurtarılmış virüslerde Vero, B95a hücrelerinde viral titrasyon çok fazla etkilenmemiştir. Bununla birlikte SV genom replikasyonu daha hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu da V proteininin NP'ye bağlanarak, P ile NP arasındaki etkileşimini engellediğini göstermektedir (14). Sığır vebası V proteini aynı zamanda L proteini ile de etkileşmektedir (95). V proteini her zaman P proteinin amino uç kısmının yarısını paylaşır. V proteininin sistein rezidüleri SV, köpek gençlik hastalığı ve kızamık virüslerinde korunmuştur ve çinko-parmak benzeri motifleri oluşturur (73). DNA zarar proteinleriyle V proteinin ilişkisi biyolojik mekanizmalar için gerekli görülmüştür. V proteini de yapısal bir protein olmamasına karşın pürifiye kabakulak ve simian virüs 5 viral partiküllerinde bulunmuştur. Fakat kızamık ve sendai virüs partiküllerinde V proteinine rastlanmamıştır. İnsan parainfluenza virüs 2 ve simian virüs 5 de V proteinin çekirdek lokalizasyon sinyalleri içerdiği de görülmüştür (32, 43, 65, 79).

3.9. Large proteini

Large proteini ribopolinükleotid polimerizasyonunun başlaması, uzaması, sonlandırılması, mRNA'ya metil grubu, başlık kazanma (cap) ve A rezidülerinin

eklenmesi gibi fonksiyonel görevlere sahiptir. Large proteini başlıca 6 bölgeye ayrılmıştır. Bu bölgelerden ikinci bölge RNA bağlanma bölgesi, üçüncü bölge kalıp tanıma ve fosfodiester bağlama, altıncı bölge ise pürin nükleotidleri bağlama bölgesidir (91). Morbillivirüslerde RNA polimerazın sayılan bu aktiviteleri yerine getirebilmesi için P ve nükleokapsid ile ilişkiye girmesi gereklidir. Polimeraz aktivitesinde viral polimeraz genomun 3' ucuna tutunarak 5' ucuna kadar gider. Böylece transkripsiyon için gerekli RNA ortaya çıkmaktadır (9).

Kızamık virüsü L geni atasal RNA polimerazın farklı elementlerini içerir. RNA viral polimerazda nükleik asit tanıma bölgesi glisin-aspartik asit-aspartik asit (GDD) merkezli hidrofobik bir bölge olarak tanımlanmıştır. Kızamık virüsünde ise dördüncü bir D ilavesi ile GDDD ve başka bir nükleokapsit tanıma bölgesi lösin-aspartik asit-aspartik asit (LDD) tanımlanmıştır. Kızamık virüsünde L geninin polimeraz aktivitesi pozitif iplikli virüslerdeki viral polimeraz aktivitesi ve tersine transkriptaz aktivitesinden farklılık göstermektedir (21). Sığır vebası virüsü L proteini 212 kDa moleküler ağırlığa sahip glikolize yada fosforilize halde bulunmayan bir proteindir (45). Sığır vebası virüsü L proteini negatif sarmallı virüslerde tanımlanmış olan başlıca motifleri içermektedir. Bu protein pürin nükleotid bağlanma ve polimeraz aktif bölgesi olarak tasarlanan bölgeleri içermektedir (9).

4.GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. pTOPO XL plazmidi

pTOPO XL vektörü, PZR sonrası elde edilen ürünlerin direkt olarak klonlanmasında kullanılan 3519 baz çifti uzunluğunda bir vektördür. Plazmid, prokaryotik hücrelere transformasyonundan sonra rekombinant plazmidlerin seçiminde kullanılan kanamisin ve zeosin antibiyotik direnç genlerinin yanı sıra pUC orjin ve lac promotor operatör bölgelerini de bulundurur. Lac α gen bölgesi içerisine yabancı genler yerleştirilmektedir. Plazmidin 3' uçları asılı pozisyonunda timidin (T) rezidüleri içermektedir. Böylece Taq polimerazla 3' ucuna adenozin (A) rezidüsü eklenen PZR ürünleri direkt olarak klonlanmaktadır. Bununla birlikte plazmidde T7 promotor bölgesi ve ccdB letal gen başlangıç bölgeleride mevcuttur (3).

4.2. pCI-neo memeli açıklama vektörü

Memeli hücrelerinde, DNA'ları geçici ve sürekli olarak açıklayabilen 5472 baz çifti uzunluğunda bir vektördür (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.). Bu plazmidin oluşturulmasında pGEM-3Z(+) (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) vektörü iskelet görevi görmüştür. Memeli hücrelerinde, plazmid içerisine yerleştirilen yabancı genleri açıklayan sitomegalo virüs (SMV) çok erken promotor ve enhansır bulunmaktadır. Vektörde neomisin fosfotransferaz geninin üst bölümünde SV40 enhansır ve promotoruda mevcuttur. Rekombinant plazmidin sürekli transfeksiyonundan sonra, hücre çekirdeğinden episomal olarak açıklanabilmektedir.

Vektör, transfekte edilerek oluşturulan rekombinant memeli hücrelerinin seçilmesini sağlayan neomisin fosfotransferaz genini içermektedir. Sitomegalo virüs promotor ve enhansır bölgesinin altında kimerik bir intron bulunur. Aynı zamanda SV40 geç poliadenilasyon bölgeside bulunmaktadır. Böylelikle RNA stabilitesini ve protein açıklanmasını arttırmak için, RNA transkriptlerinin 3' ucuna yaklaşık 200-250 adenin rezidüsü ilave etmektedir.

Genel olarak pCI-neo, memeli hücrelerinde açıklama vektörü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca pCI-neo vektöründe prokaryotik hücrelere transforme edildiğinde seçici marker olarak kullanılan ampisiline dirençlilik geninide içermektedir. Vektörde faj fl orjin bölgesi, negatif ve pozitif anlamlı RNA üretilmesine yarayan T7 ve T3 RNA polimeraz promotor bölgeleri de bulunmaktadır (7).

4.3. Hücre ve virüs

Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero), % 10 fetal sıgır serumu (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.), 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'da üretildi. Çalışmada virüs olarak Etlik Araştırma Enstitüsünden temin edilen hücre kültürüne adapte SV RBOK aşı suşu kullanıldı (58, 68).

4.4. Toplam RNA izolasyonu

Yirmibeş cm²'lik hücre kültür kabının yaklaşık % 60-70'i Vero hücreleri ile kaplandıktan sonra, Vero hücreleri SV aşı suşu ile adsorbsiyona bağlı metoda göre infekte edildi (68). Kontrol ve infekte Vero hücreleri mikroskop altında

gözlendi. İnfeksiyonun 5. gününde hücrelerin yaklaşık % 80'inde sitopatik etki (CPE) olduğu dönemde toplam RNA izolasyonu yapıldı. Kısaca; hücre üretme kabındaki vasat döküldü ve 1 ml steril şartlar altında TRI-Reagent (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) eklendi. Hücreler 5-6 kez pipete edilip 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne karışım aktarıldı. Hücreler 12000 rpm +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp oda ısısında 7 dakika bekletilip üzerine 0,2 ml kloroform ilave edildi. Tüp elle birkaç kez sallandıktan sonra tekrar 10 dakika oda ısısında bekletilip 12000 rpm +4°C'de 10 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüj sonunda en altta protein, ortada DNA ve üstte RNA içeren üç faz oluştu. RNA içeren üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine eşit miktarda isopropanol ilave edilerek hafifçe sallandı. Oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra, tüp 12000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpünde RNA peleti görüldü ve üst sıvı peleti kaldırmadan dikkatlice döküldü ve % 75'lik etil alkolden 800 µl eklenip 12000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Sonrasında RNA peleti kurutulmaya bırakılarak içerisine 3 µl RNasin (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) bulunan 180 µl steril dH₂O ile sulandırılıp -80°C'ye kaldırıldı (2).

4.5. Primerlerin oluşturulması

Primerler oluşturulurken gen bankası X76186 sığır vebası RBOK aşısı suşu M geninin protein kodlama bölgesi göz önünde tutuldu. www.srs.ac.uk internet adresinden X76186 geninin kesim enzim haritası elde edildi. PCI-neo memeli açıklama vektörünün polilinker bölgesindeki kesim enzimleri ile M geninde

bulunmayan kesim enzimleri karşılaştırılarak uygun kesim enzimleri seçildi. Memeli hücrelerinde genin açıklanmasında verimliliğini artırmak için genin 5' ucuna ait ATG başlangıç kodonunun önüne kozak (ACC) dizilimi ilave edildi. Primer 1 *EcoRI* kesim enzim bölgesi ve kozak dizilimini P1: 5'-ggg aat tcc cac cat ggc aga aat t -3' içerecek biçimde oluşturuldu. Primer 2 P2:5'-gga agc ttc cgt cga ccc tta cag gac ctt-3' diziliminde *SalI* ve *HindIII* kesim enzim bölgelerini içerecek biçimde tasarlandı (55, 87).

4.6. Tersine Transkripsiyon (TT) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tersine transkripsiyon için, SV virüsü ile infekte edilmiş Vero hücrelerinden elde edilen toplam RNA kalıp olarak kullanıldı. Mikrosantrifüj tüpünün içerisine 10 µl RNA ve 5 µl gene özgü tersine primer ilave edilip 55°C'de 10 dakika bekletildi. Oda ısısına alınan RNA-primer karışımının üzerine 5 µl RT buffer (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 2.5 µl 2 mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl RNasin (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl MLV-RT (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl steril dH₂O eklenip, karışım 37°C'de 1 saat tutuldu. Bu işlem sonucunda elde edilen kopya DNA (cDNA)'lar PZR'de kalıp olarak kullanıldı. Her bir örnekte 2 µl cDNA, 2 µl 10 pmol P1-P2 primer, 4 µl 1,25 Mm dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 5 µl 25 mM MgCl₂ (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 5 µl 10X PCR buffer (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 1 µl 2 U Taq DNA polimeraz (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) ve 31 µl dH₂O kullanıldığı 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 95°C'da 2 dakika ön ısıtmayı takiben, 95°C'da 1 dakika,

dakika, 72°C'da 3 dakika, 35 döngü ve 72°C'da 8 dakika son uzatma ile sonlandırılan PZR programı uygulandı. Matriks PZR ürününü görüntülemek için % 1,5'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, 50 ml Tris-Asetat/EDTA elektroforez tamponu (TAE; 0,04 M Tris Asetat, 0,0001 M EDTA) içerisinde 0,75 gram (g) agaroz (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) kaynatıldı. Agarozun ısısı yaklaşık 50°C'ye düştükten sonra eriyiğe 0,5 µg/ml oranında etidyum bromid ilave edilerek donduruldu. Örnekler 6X yükleme tamponu (% 0,35 bromfenol mavisi, ve % 30 gliserol) ile jele yüklendi. Elektroforez işlemi 150 volt (V) akımda 40 dakika yapıldı. Agaroz jelde ultraviyole (UV) ışık kaynağından bakılarak PZR ürünü belirlendi (5, 53, 87).

4.7. Matriks geninin agaroz jelden saflaştırılması

Matriks geni PZR ile çoğaltılarak etidyum bromidle boyanmış % 0,5'lik TAE agaroz jelde görüntülendi. Agaroz jelden matriks geninin saflaştırma işlemi (Wizard, PCR Preps DNA purification system, Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) yardımıyla yapıldı. Matriks genini içeren agaroz jel bölgesi steril bisturi yardımı ile kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Tüpe 1 ml resin ilave edilip, 65°C'deki su banyosunda yaklaşık 5 dakika agaroz jel tamamen eriyene kadar tutuldu. Eriyik, oda ısısına alınıp ucunda kitte bulunan özel kolon takılı 5 ml'lik plastik enjektöre aktarıldı ve piston ile itilerek kolondan geçirildi. Böylece resin-DNA karışımı kolonda kaldı. Aynı kolon, pistonu çıkarılan enjektöre tekrar takılıp üzerine 2 ml % 80 isoprapanol aktarıldı ve DNA'nın yıkanması sağlandı. Kolondan isopropanolu tamamen uzaklaştırmak için kolon mikrosantrifüj tüpüne takılarak 7000 rpm +4°C'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon buradan başka bir

mikrosantrifüj tüpüne takılıp üzerine 80 µl steril dH₂O ilave edildi. Oda ısında 5 dakika bekletildikten sonra 13500 rpm +4°C'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen DNA pelleti -20°C'de muhafaza edildi (4).

4.8. Kompetan *Escherichia coli* (*E. coli*) hücrelerinin hazırlanması

Bu çalışmada kompetan *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α ve JM109 şılları kullanıldı. Kompetan hücrelerin hazırlanmasında rubidyum klorid (RbCl) metodundan yararlanıldı (48, 87). Bu amaçla Lurie-Bertani (LB) katı besi yerine (1 lt dH₂O'da 10 g Bakto-tryptone, 5 g Bakto-yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar eritildi ve pleytlere döküldü.) tek koloni ekimi yapıldı ve 37°C'de 1 gece bekletildi. Katı besi yerinde üreyen kolonilerden bir tanesi steril bir öze yardımıyla 5 ml'lik LB sıvı besi yerine (1 lt dH₂O'da 10 g Bakto-tryptone, 5 g Bakto-yeast extract, 10 g NaCl eritilip ve pH 7,4 ayarlamak için 5 M NaOH'dan 300 µl ilave edildi. Besi yeri otoklavda steril edildi.) ekildi. İki saat 37°C'de üredikten sonra, kompetan *E. coli* ekili LB besi yeri aynı ısıda bulunan 100 ml'lik LB sıvı yerine aktarıldı ve yaklaşık 4 saat üremesi sağlandı. Bu karışım 15 ml santrifüj tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Sonrasında üst kısım dökülerek dipte kalan pelet hücre 35 ml RF1 çözeltisi (100 mM rubidyum klorid, 50 mM mangan klorit, 30 mM potasyum asetat, 30 mM kalsiyum klorid ve % 15 gliserol) içerisinde pipete edildi. Buzlu su içerisinde 20 dakika bekletilen hücrelere tekrar 3000 rpm +4°C'de 15 dakika santrifüj uygulandı. Üst sıvı dökülerek pelet hücrelerin üzerine 5 ml RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, % 75 CaCl₂.2H₂O ve % 15 gliserol) içerisinde pipete edildi. Buzlu su içerisinde 10 dakika bekletilen hücreler 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj

tüplerinde 100 µl olacak miktarda dağıtıldıktan sonra 80°C’de bulunan % 100’lük etil alkol içerisinde ani olarak donması sağlandı. Alkol içerisinde 15 dakika sonra alınan kompetan hücreler transformasyonda kullanılıncaya kadar –80°C’de muhafaza edildi (48, 87).

4.9. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmidinin oluşturulması

Saflaştırılmış matriks geninin 4 µl’si ile 1 µl PCR®-XL-TOPO® vektörü (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, ABD.) 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne konularak pipete edildi. Karışım oda ısısında, ligasyon gerçekleşmesi amacıyla, 5 dakika tutuldu. Sonrasında, reaksiyon 1 µl 6X TOPO® stop solüsyonu (0.3 M NaCl, 0,06 mM MgCl₂) ilave edilerek durduruldu (3).

4.10. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmidinin transformasyonu

Kompetan JM109 hücrelerinin 100 µl’sine 6 µl rekombinant pTOPO XL ilave edildi ve yarım saat buzlu su içerisinde bekletildi. Buradan alınan hücreler 42°C’de ki su banyosunda 2 dakika tutuldu ve ardından tekrar buzlu su içerisinde 80 saniye bekletildi. Daha önceden 37°C’e getirilen 400 µl LB sıvı besi yeri transforme edilen bu hücrelerin üzerine eklendi. Sallayıcı üzerinde 37°C’de 1,5 saat bekletildikten sonra transforme hücreler 50 µg/ml kanamisin içeren katı besi yerine (LB katı besi yeri içerisinde 50 µg/ml olacak oranda kanamisin katılarak hazırlandı) ekildi ve 37°C’de 1 gece tutuldu (87).

4.11. Rekombinant pTOPO XL Matriks seçiminde PZR tarama (PZR-T)

Kanamisinli katı besi yerinde üreyen kolonilerin matriks genini taşıyıp taşımadığını anlamak amacıyla PZR-T yapıldı. Kısaca 2 µl 25 mM'lık MgCl₂ (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 2 µl 10X PCR buffer (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 3 µl 1,25 mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.), 4 µl 10 pmol/µl matriks genine özgü primerler ve 4 µl dH₂O içeren 15 µl'lik karışım 500 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Karışıma, besi yerindeki koloni kürdan vasıtasıyla ilave edilip 95°C'de 10 dakika tutuldu. Katı besi yerinde görülen her koloninin bir kısmı kürdan yardımıyla ilk önce başka kanamisinli pleyte, sonrada koloninin diğer kalan kısmı ise hazırlanan karışıma temas ettirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu cihazında 95°C'de 10 dakika tutulan örnekler, 3000 rpm de kısa süreli santrifüj edildi. Üzerine içerisinde 0,3 U Taq polimeraz (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) bulunan 5 µl dH₂O eklenip mineral yağ damlatıldı. 95°C'de 5 dakika ön ısıtma, 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika 25 döngülük PZR-T yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında görüntülendi ve pozitif koloniler işaretlendi (50, 76, 87).

4.12. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmidinin elde edilmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu tarama ile pozitif bulunan kolonilerden plazmid DNA'sını elde etmek için alkali lizis metodu kullanıldı (87). Steril cam tüplere içerisinde 50 µg/ml kanamisin bulunan 10 ml LB sıvı besi yeri konuldu ve koloniler öze ile ekildi. Sallayıcı üzerinde 37°C'de bir gece bekletilip üremesi

sağlanan bakteriler 3000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra hücrelerin üzerine 1 ml STE çözeltisi (0,1 M NaCl, 10 mM Tris.Cl pH 8, 0,01 mM EDTA pH 8) eklendi ve hücreler homojen olana kadar pipete edildi. Karışım cam tüplerden 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine soğutulmuş 100 µl Sol I (50 mM glukoz, 25 mM Tris.Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) ilavesi ile pellet iyice homojen hale getirildi. Buzlu su üzerinde 10 dakika bekletilen karışımın üzerine taze olarak hazırlanmış 200 µl Sol II (0.2 N NaOH, % 1 sodium dodesil sülfat) eklendi ve 5 dakika buzlu su içerisinde bekletildi. Karışıma 150 µl Sol III (3 M potasyum asetat, % 10 gliserol asetik asit) ilave edilip, 10 dakika buzlu su içerisinde bekletildikten sonra 12000 rpm de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Başka bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılan üst sıvı miktarı kadar fenol-kloroform (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) ilave edildi ve 30 saniye vortekslendikten sonra santrifüj tekrarlandı. Mikrosantrifüj tüplerine aktarılan üst sıvıya % 10'u kadar DNase free panreatik RNase (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D. 10 µg/ml stok konsantrasyonu) ilave edilip 37°C'de ki su banyosunda 2 saat bekletildi. Fenol-kloroform işlemi tekrarlandı. Plazmid DNA'sını çöktürmek için mikrosantrifüj tüpüne alınan üst sıvının % 10'u kadar 3 M Na-asetat pH 5,2, üst sıvının 2,5 katı soğuk % 100'lük etil alkol ilave edilip -20°C'de 1 gece bekletildi. Buradan alınan mikrosantrifüj tüpleri 12000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı dökülerek üzerine 800 µl soğuk % 75'lik metil alkol konulduktan sonra santrifüj tekrarlandı. Elde edilen plazmid DNA'sı oda ısında kurutuldu ve 40 µl steril dH₂O ile sulandırılıp -20°C'de muhafaza edildi (87).

4.13. Rekombinant pTOPO XL Matriks vektörünün kesim enzimleriyle doğrulanması.

Bu amaçla bir tüpe plazmid DNA'sı elde edilerek saklanan rekombinant pTOPO XL matriks DNA solüsyonundan 20 µl, 14 µl YX⁻ Tango kesim enzim solüsyonu (MBI Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lithuania) 10 IU/µl konsantrasyonundaki *EcoRI* ve *Sall* (MBI Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lithuania) enzimlerinin her birinden 3 µl ve 30 µl dH₂O ilave edildi. Kesim deneyi karışımın 6 saat 37°C'de ki su banyosunda bekletilmesi ile gerçekleştirildi. Kesim deneyleri % 1,5'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık kaynağında görüntülendi (87).

4.14. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmidinin oluşturulması

Rekombinant pTOPO XL Matrix ve pCI-neo plazmid DNA'ları *EcoRI* ve *Sall* kesim enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Rekombinant pTOPO XL Matriks plazmid DNA'sından çıkarılan matriks geni ve pCI-neo plazmidi agaroz jelden daha önceden belirtilen yöntemle saflaştırıldı. Aynı yapışkan uçlara sahip olan 0,5 µl içerisinde yaklaşık 100 ng pCI-Neo (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) ve 1 µl içerisinde yaklaşık 200 ng matriks 500 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldular. Üzerlerine 1 µl bakteriyofaj T4 DNA ligaz 5 U/µl enzimi (MBI Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lithuania), 1,5 µl 10X bakteriyofaj T4 DNA ligaz tamponu (MBI Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lithuania) ve 11 µl dH₂O eklendi. Ligasyon için 16°C'de 17 saat ve +4°C'de bir gün bekletildi (87).

4.15. Rekombinant pCI-Neo Matrix plazmidlerinin seçimi

Escherichia coli DH5α hücrelerine ligasyon ürünlerinin transformasyonu daha önceden belirtilen metoda uygun olarak yapıldı. Transforme hücrelerin seçimi 60 µg/ml ampisilinli katı besi yerinde gerçekleştirildi. Katı besi yerinde görülen kolonilerin matriks genini içerip içermediğini anlamak için PZR-T standart protokole göre uygulandı. Bu deneyde pozitif kolonilerin plazmid DNA'ları alkali lizis metoduyla elde edildi. Daha önceden belirtildiği üzere rekombinant pCI-neo matrix plazmid DNA'ları *EcoRI-SalI* kesim enzimleri ile kesildi (87).

4.16. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmid DNA'sının Vero hücrelerine transfeksiyonu

Vero hücrelerine, pCI-neo ve rekombinant pCI-neo Matrix plazmid DNA'ları Transfast™ Transfection (Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.) kiti kullanılarak geçici transfekte edildi. Sığır vebası virüsü ile infekte Vero hücreleri pozitif kontrol, Vero hücrelerinin kendisi ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Transfeksiyondan 1 gün önce tranfast transfeksiyon solüsyonu oda ısısında 1 mM konsantrasyonunda sulandırıldı ve -20°C'de saklandı. Transfeksiyon öncesi tranfast transfeksiyon solüsyonu oda ısısında bekletilerek çözülmesi sağlandı. Onsekiz µl transfast ve 6 µg plazmid DNA'sı içeren 30 µl solüsyon 1,5 ml'lik mikrosanrifüj tüpüne konuldu ve vortekslendikten sonra oda ısısında 15 dakika bekletildi. Bu arada % 80'i Vero hücreleriyle kaplı 25 cm² lik hücre üretme kabındaki vasat boşaltılarak hücreler steril fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS çözeltisi 8 gr NaCl, 0,2 gr KH₂PO₄, 2,3 gr Na₂HPO₄ 12H₂O, 0,1 gr MgSO₄7H₂O,

0,132 gr CaCl_2 1 litre suda çözöldü ve otoklav edildi.) ile iki kez yıkandı, DNA-transfast karışımı 1 ml vasat içerisinde hücre üretme kabına ilave edildi ve 37°C 'ye tekrar kaldırıldı. Yaklaşık 1 saat sonra 3,5 ml vasat ve 0,5 ml f $\text{ö}t\text{ä}l$ sığır serumu ilave edilen hücre üretme kabı 37°C 'deki etüvde 3 gün boyunca inkübe edildi (6).

4.17. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması

pCI-neo, rekombinant pCI-neo Matrix plazmidlerinin transfekte edildiğı Vero hücreleri ile pozitif ve negatif kontrollerin bulunduğı hücre üretme kaplarındaki vasat dököldü. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücre-PBS karışımı plastik bir kazıyıcı yardımı ile kazındı. Hücre-PBS karışımı 1,5 ml'lik mikrosanrifüj tüplerine alınarak 13000 rpm $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet 1X sodium dodesil sülfat yükleme tamponu ile sulandırıldı (87).

4.18. Sodium-dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)

Transfekte Vero hücrelerinin protein analizini yapmak amacıyla SDS-PAGE gerçekleştirildi. Elektroforez kasetinin (20X20X0,5) alt ve yan tarafları sıvı sızdırmayacak biçimde bantlandı. Kasetin içerisine 50 ml % 10'luk ayırıştırma jeli (resolving gel: 19,8 ml dH_2O , 16,7 ml % 30 poliakrilamid, 12,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 500 μl % 10 SDS, 500 μl amonyom persülfat, 30 μl N,N,N,N-tetrametiletilenamin (TEMED) solösyonu) dököldü. Jelin üzerine, hava ile teması keserek yüzey gerilimini azaltıp polimerizasyonu kolaylaştırmak amacıyla, 2 ml

bütanol (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) döküldü. Jel bu şekilde 30 dakika polimerizasyona bırakıldı. Daha sonra üzerindeki bütanol dökülerek, jel birkaç kez dH₂O ile yıkandı. Bu sırada 20 ml % 5'lik yığınlayıcı jel (stacking gel: 12,6 ml dH₂O, 3,4 ml % 30 akrilamid karışımı, 2,5 ml 1 M Tris pH 6,8, 200 µl % 10 amonyum persülfat, % 10'lik 0,2 ml SDS, 20 µl TEMED içeren solüsyon) hazırlandı. Kasete tarak takılarak yığınlayıcı jel döküldü. Polimerizasyon için jel 30 dakika bekletildi. Polimerizasyon sonrası tarak çıkarıldı. Oluşan kuyucuklar dH₂O ile yıkandı ve jel artıkları temizlendi. Elektroforez kaseti soğutmalı elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın ön ve arka bölümleri 1X Tris glisin solüsyonu (5X stoktan, 950 ml dH₂O içerisinde 94 gr glisin ve 1,51 gr Tris base çözülerek, 50 ml % 1 SDS ilavesi ile hazırlanır) konuldu. Tankın ön bölmesi ve kasetin alt tarafında oluşan hava kabarcıklarının akımı engellememesi için plastik enjektörle uzaklaştırıldı. 150 V doğru akımda 10 dakika ön elektroforez yapıldı. Örnekler ve moleküler ağırlık markeri içerisine % 00,1 oranında dithiothreitol (DTT) eklenmiş 2X yükleme tamponu (100 mM Tris.Cl pH 6,8, 200 mM dithiothreitol, % 4 SDS, % 0,2 bromophenol blue, % 20'lik gliserol) ile 3/1 oranında sulandırıldı. Örnekler 3 dakika, ağırlık markeri ise 20 saniye kaynayan suda bekletildi. Kuyucuklara örnekler 40 µl, moleküler ağırlık markeri 5 µl olmak üzere yüklendi. Elektroforez işlemi 150 V akımda 8 saatte tamamlandı (87).

4.19. Vestern Immunoblot Deneyi

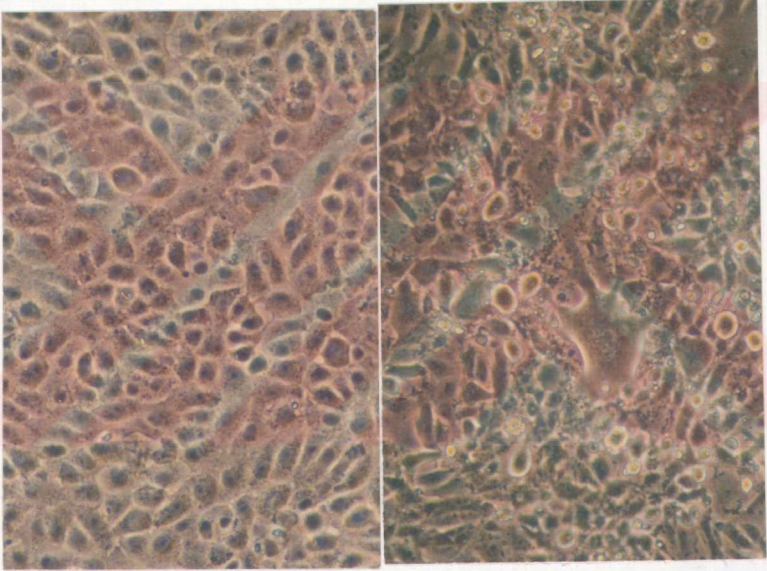
SDS-PAGE sonrası elektroforez kaseti içerisindeki yığınlama jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Ayırıştırıcı jel ile aynı ebatlarda nitroselüloz membran ve 6 adet (Whatman 3 mm) kurutma kağıdı kesildi. Kurutma kağıtları Anot I (0,3 M

Tris pH 10,4, % 20 metil alkol), anot II (0,0025 M Tris pH 10,4, % 20 metil alkol), katod tamponu (0,025 M Tris pH 9,4, % 20 metil alkol) içeren kaplara 2'şer adet konuldu. Nitrosetüloz membran (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) ise dH₂O içeren bir kaba konuldu. Kağıtlar ve membran 10 dakika bekletildi. Bu arada jel anot tamponu ile ıslatıldı. Transfer işlemi semi-dry sisteminde (1 MM semi-dry blotter, WED Camp, Seattle, WA, A.B.D.) 10 miliamperde 2 saat uygulandı. Transfer işlemi sonrasında bloklama amacıyla sulandırma solüsyonu (% 0,2 Tween 20 içeren 1X PBS) içerisinde % 5'lik yağsız süt tozu hazırlandı. Nitrosetüloz membran % 5'lik yağsız süt tozu içerisine konuldu ve +4°C'de sallayıcı üzerinde 1 gece bekletildi. Süt tozu içerisinden alınan membran yıkama solüsyonu (% 0,1 Tween20 içeren 1X PBS) ile birkaç kez yıkandı. Primer serum 1/50 oranında sulandırılma solüsyonu ile sulandırıldı. Bu oranda sulandırılmış serumu içeren kaba membran konuldu. Membran sallayıcı üzerinde 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra yıkama solüsyonu ile 5 dakika olmak üzere 5 kez yıkandı. Membranı içeren kaba sulandırma solüsyonu ile 1/1000 oranında sulandırılan anti-bovine immunoglobulin G peroksidaz (Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.) eklendi. Sallayıcı üzerinde 37°C'de 1 saat bekletildi. Yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandı. Membran ışık geçirmeyen bir kapta kromojen DAB solüsyonu (0,5 mg/ml diaminobenzidin tablet, 15 ml 0,05 M Tris pH 7,6 içerisinde eritildi ve süzöldü. Son olarak % 3'lük H₂O₂ den 25 µl eklendi.) içerisinde birkaç dakika bekletildi. Görüntü oluştuktan sonra membran su ile yıkayıp kurutma kağıdı içerisinde kurutuldu (87).

5.BULGULAR

5.1. Matriks geninin çoğaltılması

Matriks geninin elde edilebilmesi için Vero hücreleri sığır vebası RBOK aşısı suşu ile infekte edildi. Tersine mikroskop yardımıyla hem kontrol hem de infekte Vero hücreleri gözlenerek infeksiyonun 5'inci gününde Vero hücrelerinin yaklaşık % 80 oranında CPE oluşurken, kontrol grubunda CPE gözlenmedi (Şekil 1).



A.

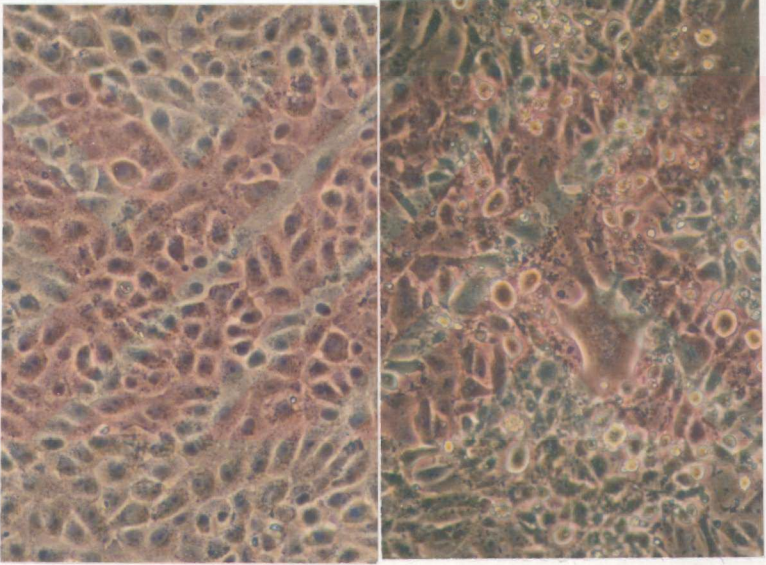
B.

Şekil 1 : A- Tek tabaka halinde infekte edilmemiş Vero hücrelerinin görüntüsü, B- Sığır vebası RBOK aşısı suşu ile infekte edilmiş olan Vero hücrelerinin 5. gününde ki CPE görüntüsü (100X).

5.BULGULAR

5.1. Matriks geninin çoğaltılması

Matriks geninin elde edilebilmesi için Vero hücreleri sığır vebası RBOK aşı suşu ile infekte edildi. Tersine mikroskop yardımıyla hem kontrol hem de infekte Vero hücreleri gözlenerek infeksiyonun 5'inci gününde Vero hücrelerinin yaklaşık % 80 oranında CPE oluşurken, kontrol grubunda CPE gözlenmedi (Şekil 1).

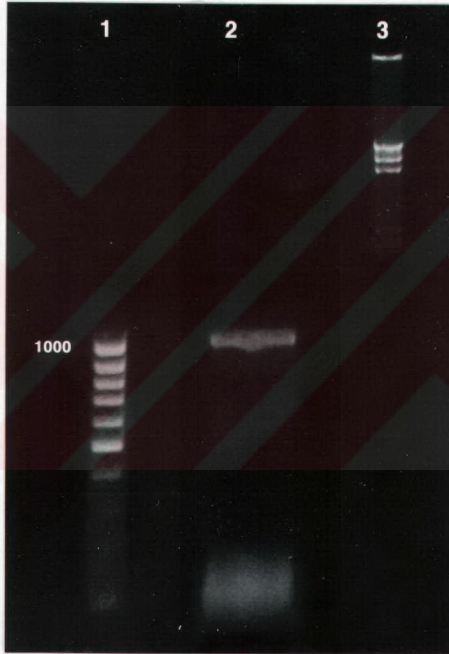


A.

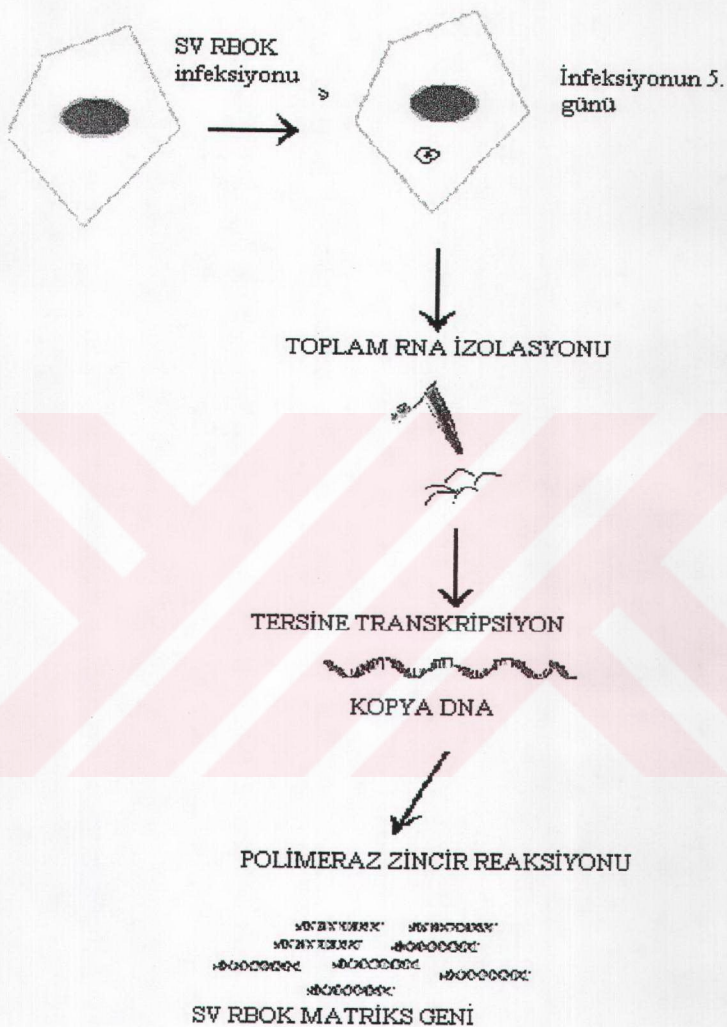
B.

Şekil 1 : A- Tek tabaka halinde infekte edilmemiş Vero hücrelerinin görüntüsü, B- Sığır vebası RBOK aşı suşu ile infekte edilmiş olan Vero hücrelerinin 5. gününde ki CPE görüntüsü (100X).

Bu aşamada infekte Vero hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı ve tersine transkripsiyon gerçekleştirildi. Elde edilen kopya DNA'lar ve matriks genine özgü primerler kullanılarak yapılan PZR neticesinde yaklaşık 1038 bazlık matriks geni % 1,5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile görüntülendi (Şekil 2 Hat 2). Yukarıda anlatılan işlemler Şekil 3'de kısaca özetlendi.



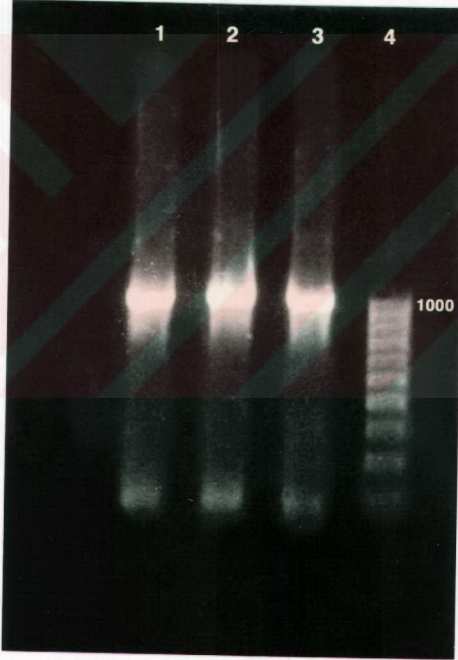
Şekil 2 : % 1,5'lik agaroz jelde matriks geninin gösterilmesi.
Hat 1; 100 baz'lık ladder DNA, Hat 2; Matriks geni, Hat 3; Lambda DNA *HindIII* marker .



Şekil 3 : Sığır vebası matris geninin PZR ile çoğaltılmasının şematize olarak gösterilmesi.

5.2. Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu matriks geninin Topo XL vektöründe klonlanması

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu çoğaltılan M geni % 0,5'lik agaroz jelden saflaştırılarak, TOPO XL vektörü ligasyon işleminde kullanıldı. Kompetan *E. coli* hücrelerine rekombinant plazmidler transforme edilerek, kanamisinli katı besi yerine ekim gerçekleştirildi. Pleytlerde gözlenen kolonilerin matriks geni içeren koloniler olup olmadığını araştırmak amacıyla PZR tarama testi yapıldı ve pozitif koloniler gösterildi (Şekil 4 Hat 1, 2, 3).



Şekil 4 : % 1,5'lik agaroz jelde PZR taramanın gösterilmesi.
Hat 1, 2 ve 3; PZR tarama ile pozitif koloniler. Hat 4; 100 baz'lık ladder DNA.

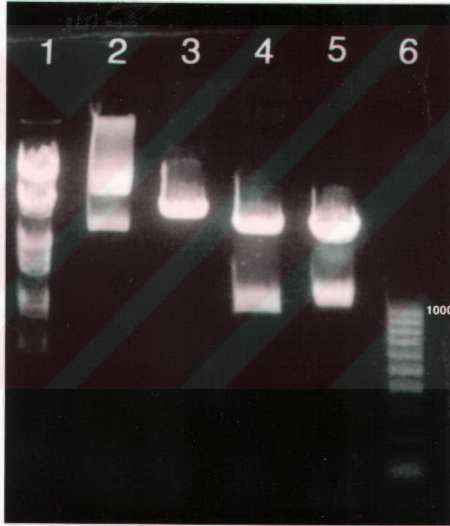
Rekombinant plazmid DNA'ları kullanılarak yapılan kesim deneyleri istenilen gen bölgesinin varlığını teyit etmek için uygulandı. Bu amaçla *EcoRI*, *Sall* kesim enzimleri kullanılmış olup, kesim sonrası 1038 bazlık matriks gen bölgesi gösterildi (Şekil 5 Hat 4). Topo klonlama vektöründe *Sall* kesim enzim bölgesi bulunmamaktadır. Fakat oluşturulan rekombinant plazmide primerden gelen *Sall* enzim kesim bölgesi de yerleştirildi. Bu bölgenin varlığı *Sall* enzim kesimiyle gösterildi (Şekil 5 Hat 3).

TOPO XL vektörünün 277'inci nükleotidinde bir *HindIII* kesim bölgesi bulunmaktadır. Bununla birlikte oluşturulan primer 2'nin 5' ucunda da *HindIII* kesim bölgesi vardır. Böylece *HindIII* enzimi ile yapılan kesim de yaklaşık 1100 bazlık kesim ürünü çıkarıldı (Şekil 5 Hat 5). Bu büyüklükte çıkan parça aynı zamanda klonlama vektörüne matriks geninin doğru şekilde yerleştirildiğini de göstermektedir. Gerek PZR tarama gerekse enzim kesim deneyleri ile M geninin TOPO-XL vektörüne yerleştirildiği teyit edildi. Böylece yaklaşık 4557 baz uzunluğunda olan rekombinant plazmid, pTOPO Matriks plazmidi olarak isimlendirildi (Şekil 5 Hat 2). Oluşturulan rekombinat plazmid pTOPO XL Matriks diye adlandırıldı. Burada yapılan işlemler Şekil 6'da kısaca şematize edildi.

5.3. Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu matriks geninin pCI-neo açıklama vektöründe klonlanması ve Vero hücrelerinde açıklanması

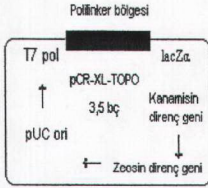
Bu amaçla, rekombinant pTOPO Matriks vektörü *EcoRI* ve *Sall* enzimleriyle kesilmiştir. Daha sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülen kesim ürünleri agaroz jelden saflaştırıldı. Aynı enzimlerle kesilen pCI-neo plazmid DNA'sı ile

matriks genine ligasyon işlemi yapılarak *E.coli* hücrelerine transforme edildi. Ampisilinli katı besi yerinde üreyen kolonilere PZR tarama deneyi yapılarak pozitif koloniler belirlenerek, pozitif kolonilerin plazmid DNA'ları kesim deneyi için kullanıldı. Rekombinant pCI-neo Matrix geni *EcoRI-Sall* enzimleri ile kesilerek matriks geni çıkarıldı (Şekil 7 Hat 6). Yeni oluşan rekombinant pCI-neo Matrix vektörü yaklaşık 6512 baz uzunluğunda olup PZR tarama ve kesim enzim deneyleri ile pCI-neo Matrix geninin klonlandığı teyit edildi. Aynı zamanda oluşturulan rekombinant vektör pCI-Neo Matrix olarak adlandırıldı.

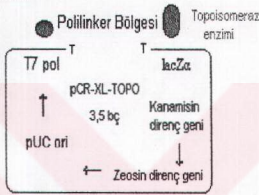


Şekil 5 : % 1,5'lik agaroz jelde pTOPO XL Matriks vektörünün kesim enzimleriyle doğrulanması deneyi.

Hat 1; Lambda DNA *EcoRI-HindIII* marker, Hat 2; Kesilmemiş pTOPO XL Matriks, Hat 3; pTOPO XL Matriks'in *Sall* enzim kesimi, Hat 4; pTOPO XL Matriks'in *EcoRI-Sall* enzim kesimi, Hat 5; pTOPO XL Matriks'in *HindIII* enzim kesimi, Hat 6; 100 baz'lık ladder DNA.



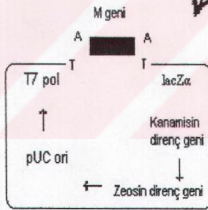
Topoisomerez enzimi



Taq polimerazla çoğaltılan matris gen



LİGASYON



pCR-XL-TOPO-Matrix
rekombinant plazmid
4.5 bp

TRANSFORMASYON

Kompetent E.coli JM109



Rekombinant E.coli

Şekil 6 : SV RBOK aşı suşu matris geninin TOPO XL klonlama plazmidine yerleştirilmesinin şematize olarak gösterilmesi.



Şekil 7 : % 1,5'lik agaroz jelde rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün kesim enzimleriyle doğrulanması.

Hat 1; SV M geni PZR ürünü, Hat 2 ; Kesilmemiş rekombinant pCI-neo Matrix vektörü, Hat 3; rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün *Sall* enzim kesimi, Hat 4; rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün *EcoRI* enzimi ile kesimi, Hat 5; rekombinant pCI-neo Matrix vektörünün *EcoRI-Sall* kesim enzimleri ile kesimi, Hat 6; 100 baz'lık ladder DNA.

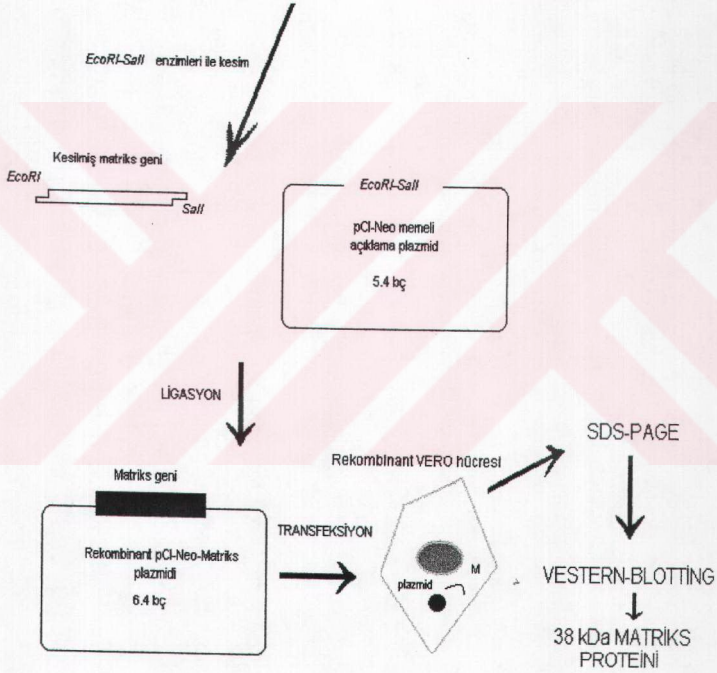
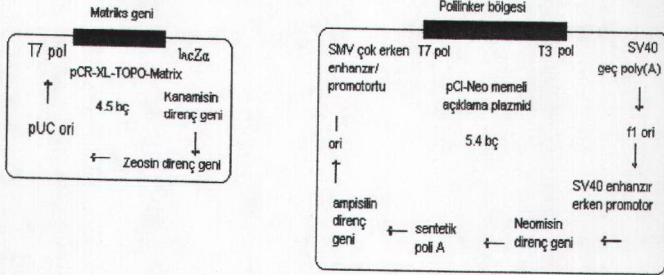
Açıklama vektörüne yerleştirilen matriks geninin Vero hücrelerinde açıklatılması amacıyla rekombinant pCI-neo Matrix vektörü Vero hücrelerine geçici olarak transfekte edilmiştir. Elde edilen hücre lizatları % 10'luk poliakrilamid jel de yürütüldü ve nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfekte Vero hücrelerinin matriks proteinini açıkladığını göstermek amacıyla

Vestern Immunoblotlama deneyi yapıldı. Sonuç olarak rekombinant Vero-pCI-neo Matrix hücrelerinde, sığır vebası pozitif serumlarla yapılan deneyde 38 kDa ağırlığına sahip proteinin varlığı tespit edildi (Şekil 8 Hat 4). Aynı ağırlığa sahip olan protein sığır vebası infekte edilmiş Vero hücre lizatlarında da görüldü (Şekil 8 Hat 3). Fakat bu bantlara Vero ve rekombinant Vero-pCI-neo hücre lizatlarında rastlanmadı (Şekil 8 Hat 1, 2). Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu matrisi geninin pCI-neo açıklama vektöründe klonlanması ve VERO hücrelerinde açıklanması Şekil 9'da şematize edilerek gösterildi.



Şekil 8 : Rekombinant SV matrisi proteinin Vestern blotlama ile gösterilmesi.

Hat 1; Vero, Hat 2; pCI-neo transfeke edilmiş Vero hücre lizatı, Hat 3; SV-infekte Vero hücre lizatı, Hat 4; Rekombinant pCI-neo Matrix transfeke edilmiş olan Vero lizatı, Hat 5; Marker , Ok; yaklaşık 38 kDa'luk Matrisi proteinini.



Şekil 9 : pCI-neo memeli açıklama plazmidine Matrks geninin yerleştirilmesi ve 38 kDa'luk M proteinin açıklatılmasının şematize edilmesi.

6.TARTIşMA

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisi kullanarak, SV RBOK aşı suşu M geni kodlama yapan bölgesi TOPO-XL klonlama vektörüne yerleştirildi. Matriks geninin pCI-neo ökaryotik plazmidinde klonlanmasından sonra hücre kültüründe M proteini aıkladıldı. Rekombinant hücrelerden yaklaşık 38 kDa ağırlığında M proteinin açıklandığı vestern immunublotlama deneyi ile gösterildi.

Sığır vebası hastalığı ile ilgili çalışmalar çok eski zamanlara dayanmaktadır (31). Geliştirilen yeni tekniklerle virüs biyolojisinin karanlıkta kalan birçok kısmı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Moleküler tekniklerin ilerlemesiyle genler üzerinde yapılan manipulasyonlarda kolaylaşmıştır (15, 77). İlk kez SV virüsünün H geni, sonrasında ise F geninde rekombinant DNA teknolojisi kullanarak DNA dizilimi ve klonlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonrasında F ve H genlerini içeren rekombinant plazmidlerle hazırlanan DNA aşıları olumlu yanıt vermiştir. Hemaglütinin proteini bağışıklama ve tanı çalışmalarında güncelliğini korumaktadır (24, 52, 92, 97, 104, 105).

Matriks geninin klonlanması ilk kez 1990 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmayı takiben 1994 yılında in vitro transkripsiyon ve translasyon çalışmaları yapılmıştır. İn vitro transkripsiyon deneyi T7 promotoru altında gerçekleştirilmiştir (11, 64). Bu alışmada SV RBOK aşı suşu M geni pCI-neo vektörü içerisinde bulunan T7 promotorunun yanısıra T3 promotorunda da aıkladılabilecek pozisyonda yerleştirilmiştir. Aynı zamanda ilk kez SMV promotoru altında Vero hücrelerinde M proteininin aıklatılmasında gerçekleştirilmiştir.

Sığır vebası virüsünde M proteini başlıca tomurcuklanmada rol oynamaktadır. Sığır vebası virüs antijenlerine karşı oluşan antikorlar, olgunlaşmaya bağımlı ve bağımsız olmalarına göre ayrılmışlardır. Olgunlaşma esnasında meydana gelen iç proteinlerin açıklanmasında M proteinine karşı oluşan monoklonal antikor epitop düzeyinde ortaya konulmuştur (75).

Sığır vebası RBOK aşısı suşu ve Kabete O suşu M geninin tamamı klonlanmış ve DNA dizilimleri yapılmıştır. Son olarak Shiotoni ve arkadaşları SV lapinize suşu M geninin moleküler özelliklerini ortaya koymuşlardır (11, 90). Kendi tasarladığımız primerlerle sadece SV RBOK suşu M geninin kodlama yapan kısmı üzerinde bu çalışma gerçekleştirildi. Kızamık virüsü Edmonston aşısı suşunda yapılan DNA dizilimi çalışmalarında kodlama yapmayan bölgelerin cis rol oynayan elementleri barındırdığından bahsetmişlerdir (30). Bu elementlerin mRNA stabilitesini ve transkripsiyonunun verimliliğini etkilediği bilinmektedir. Fakat Sığır vebası M geni kodlama yapmayan bölgesinin verimliliği ne kadar etkileyip etkilemediği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bir çok klonlama vektörü SV virüsü genlerinin klonlanması için kullanılmıştır. Kullanılan bu vektörlerin büyük bir kısmında kesim enzimleri sonucunda ligasyonlar sonucu ortaya çıkan klonlar kullanılmıştır (15, 34, 74, 88). Fakat klonlamada kullandığımız PCR-XL-TOPO vektörünün diğer vektörlerden başlıca iki farkı vardır. Bunlar 3' ucunda bir timidin (T) bulunması ve plazmide bağlı olarak bulunan topoisomeraaz enzimini bulundurmasıdır (Invitrogene Topo[®] XL PCR cloning kit Version F Tech. Bulletin). Matriks genini çoğaltmada kullandığımız Taq polimeraz enzimi ise PZR ürünlerinin 3' uçlarına adenosin rezidüleri eklemektedir. Böylece plazmid ve

ligasyon ürünlerinde bulunan, A ve T'ler topoisomerez enzimi sayesinde oda ısında 5 dakika gibi kısa bir sürede birleşmektedir.

Sığır vebası transkripsiyon çalışmalarında başlıca N, P, M, mRNA'larının fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir. Sığır vebası transkriptleri arasında en az P geni, en fazla ise N geni mRNA'sının varlığını bildirmiştir. Sitomegalo virüs-1 (CMV-1) gibi maymun böbrek hücre hatlarının bol miktarda ribonükleaz içerdiği bilinmektedir (41). Bu sebeple SV infekte Vero hücrelerinden elde edilen RNA'ların bir kısmının sindirileceği olasıdır. Elbette ki böyle bir sindirimin mRNA seviyesini haliyle açıklatılabilen protein miktarını azaltacağı bir gerçektir. Aynı zamanda SV'nin B95a hücrelerinde yüksek verimlilik gösterdiği belirtilmiştir (58). Ele alınan sebeplerden dolayı transfeksiyonda bu tip hücrelerin kullanılmasının verimliliği artırabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ökaryotik hücrelere transfekte edilen SV RBOK M geninin protein açıklandığını göstermek için Western immunoblotlama deneyi gerçekleştirildi. Deneyde primer serum olarak ELISA testi ile SV yönünden pozitifliği teyit edilmiş sığır serumları kullanıldı. Barrett ve arkadaşları sığır vebası M proteinini göstermek için yaptıkları çalışmalarda immunopresipitasyon deneyleri ile M proteinin varlığını göstermişlerdir. Kızamık virüsü M proteinini 35. ve 48'inci amino asitlerine karşı oluşturulan serumları ve SV tavşan hiperimmün serumlarını kullanmışlardır (11).

Sığır vebası tanısında N ve H proteinleri önemli yer tutmaktadır. *Paramyxoviridae* ailesinin avian pneumovirüsünün prokaryotik hücrelerden elde edilen M proteinini tanıda çok olumlu yanıt vermiştir (46). Ne var ki SV M proteinini Balb/c farelerinde düşük immün yanıt oluşturduğu rapor edilmiştir (94). Matris

genini içeren memeli açıklatma vektörleri ile herhangi bir DNA çalışması da bildirilmemiştir. Rekombinant pCI-neo Matrix plazmidinde DNA aşılama çalışmalarında farklı sonuçlar ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

Hayvan virüsleri arasında genetik mühendislikte ilk kurtarma sistemleri DNA virüslerinde gerçekleştirilmiştir. Simian virüs 40 (SV40) virüsünün transfekte hücrelerde klonlanması büyük bir zafer olarak görülmüştür. Bunu pozitif iplikli RNA virüslerinde yapılan çalışmalar izlemiştir. Son olarak negatif sarmallı virüslerde kurtarma sistemleri uygulama alanı bulmuştur. Tersine genetik çalışmaları ile viral proteinlerin yapısal analizlerine kadar, viral RNA'daki promotor elementlerinin etkinliği çalışılabilmektedir (20, 69, 77). Elbetteki böyle çalışmaların yapılabilmesi için viral genleri içeren klonların elde edilmesi gerekmektedir. Bu çalışma Türkiye'de gen kütüphanesi oluşturma çabalarının bir parçası olarak değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada primerleri oluştururken 5' ucuna *EcoRI* enzim kesim bölgesi, 3' ucuna ise *HindIII* ve *SalI* enzim kesim bölgeleri yerleştirildi. Böylelikle çalışmada birçok ökaryotik ve prokaryotik açıklama vektörünün kullanılmasına da olanak sağlandı. Yapılan bu çalışma ile rekombinant pCI-neo Matrix'i içeren farklı ökaryotik hücelere stabil tranfeksiyonu düşünülmektedir. Affiniti kromotografik tekniklerle SV virüsü matriks proteinin büyük miktarlarda elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Böylelikle SV virüsü matriks proteinine karşı monoklonal antikor elde edilmesi kolaylaşacaktır. Oluşturulan rekombinant pCI-neo Matrix vektörü ile DNA immunizasyon çalışmalarının yapılması için olanak sağlanmıştır. Elde edilecek olan SV virüsü matriks proteininin tanıda vereceği cevabın değerlendirilmesi önemli görülmektedir. Sığır vebası virüsünün

tomurcuklanmasında esnasında oynadığı rolün tam anlamıyla ortaya çıkarılması açısından önemlidir. Bu gibi gelecekte yapılması düşünülen çalışmalara temel oluşturmaları bakımından yapılan bu çalışma büyük önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ali A, Nayak DP. (2000). Assembly of sendai virus; M protein interacts with F and HN proteins and with the cytoplasmic tail and transmembrane domain of the F protein. *Virology* 276: 289-303.
2. Anonim. (1995). TRI Reagent. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. No 205. Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.
3. Anonim. (1999). Product information. TOPO® XL PCR cloning Kit version F. Invitrogen Co, Carlsbad, CA, A.B.D.
4. Anonim. (1999). Promega Technical Bulletin Wizard® PCR Preps DNA purification system No:118. Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.
5. Anonim. (2000). Promega Product Information Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase M170. Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.
6. Anonim. (2000). Promega technical bulletin Transfast™ Transfection Reagent. Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.
7. Anonim. (2000). Promega technical Bulletin pCI-Neo Mammalian expression vector. No:125. Promega, Co, Madison, WI, A.B.D.
8. Baron MD, Barrett T. (1995). Sequencing and analysis of the nucleocapsid (N) and polymerase (L) genes and the terminal extragenic domains of the vaccine strain of rinderpest virus. *J Gen Virol* 76: 593-602.
9. Baron MD, Barrett T. (1995). The sequence of the N and L genes of rinderpest virus and the 5' and 3' extra-genic sequences; the completion of the genome sequence of the virus. *Vet Mic* 44 : 76-186.
10. Baron MD, Barrett T. (1997) Rescue of Rinderpest virus from cloned cDNA. *J Virol* 71: 1265-127.
11. Baron MD, Goatley L, Barrett T. (1994). Cloning and sequence analysis of the matrix (M) protein gene of rinderpest virus and evidence for another bovine morbillivirus. *Virology* 200: 121-129.
12. Baron MD, Kamata Y, Barras V, Goatley L, Barrett T. (1996). The genome sequence of the virulent Kabete 'O' strain of rinderpest virus: Comparison with the derived vaccine. *J Gen Virol* 77: 3041-3046.
13. Baron MD, Shaila MJ, Barrett T. (1993). Cloning and sequence analysis of the phosphoprotein gene of rinderpest virus. *J Gen Virol* 74: 299-304.
14. Baron MD, Barrett T. (2000). Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *J Virol* 74 : 2603-2611.
15. Bas SC, Baron MD, Barrett T. (2000). Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoprotein of Peste-des-Petits Ruminants virus: Homologous F and H proteins are required for viability. *J Virol* 74: 9039-9047.

16. Bassiri M, Saliki S, Mebus C, Yılma T. (1994). Cloning and expression of nucleocapsid gene of virulent Kabete O strain rinderpest virus in virulent Baculovirus: Use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. *Virology* 198: 138-147.
17. Bellini WJ, Englund G, Richardson CD, Rozenblatt S, Lazzarini RA. (1986). Matrix gene of measles virus and canine distemper virus: Cloning nucleotide sequence and deduced aminoacid sequence. *J Virol* 58: 408-410.
18. Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53: 908-919.
19. Berg M, Hjertner B, Moreno-Lopez J, Linné T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol* 73: 1195-1200.
20. Binns MM. (1993). The application of molecular biology to the study of veterinary infectious disease. *Review Br Vet J* 149: 21-30.
21. Blumberg MD, Crowley JC, Silverman IJ, Menonna J, Cook DS, Dowling PC. (1988). Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. *Virology* 164: 487-497.
22. Boeck R, Curran J, Matsuoka Y, Compans R, Kolakofsky D. (1992). The Parainfluenza virus type 1 P/C gene uses a very efficient GUG codon to start its C' protein. *J Virol* 66: 1765-1768.
23. Bolat Y, Doymaz, MZ. (1998). *Paramyxoviridae* Ailesi. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ders Notları, Fırat Üniversitesi Yayınları Elazığ. Sayfa 302-304.
24. Bos L. (2000). 100 years of virology: from vitalism via molecular biology to genetic engineering. *Trend in Microbiology* 8: 82-87.
25. Brown DA, London E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-136.
26. Bruning A, Bellamy K, Talbot D, Anderson J. (1999). A rapid chromatographic strip test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus. *J Virol Methods* 81: 143-154.
27. Bulut H, Doymaz MZ, Bolat Y. (2001). Sığır vebası virüsünün füzyon geninin polimeraz zincir tepkimesiyle çoğaltılması ve bakteriyel klonlanması. *Türk J Vet Anim Science* 25: 533-537.
28. Bulut Y. (2001). Hepatit B virüsü HBcAg geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Elazığ. Sayfa 4-5.
29. Chamberlain RW, Wamwayi HW, Hockley MS, Shaila MS, Goatley L, Knowles NJ, Barrett T. (1993). Evidence for different lineages of rinderpest virus reflecting their geographic isolation. *J Gen Virol* 74: 2775-2780.
30. Christopher LP, Lerch RA, Walipito P, Wang H, Sidhu SM, Udem AS. (2000). Analysis of the noncoding region of measles virus strain in the edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75: 921-933.

31. Crowther JR. (1997). Rinderpest : At war with disease of war. *Science Progress* 80: 21-43.
32. Curan J, Kolakofsky D. (1988). Ribosomal initiation from an ACG codon in sendai virus P/C mRNA. *EMBO J* 10: 3079-3085.
33. Diallo A, Barrett T, Lefevre PC, Taylor WP. (1987). Comprasion of protein induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants. *J Gen Virol* 68: 2003-2038.
34. Doymaz MZ, Kılıç AO, Bulut H, Ozdarendeli A, Bolat Y. (2000). Cloning and prokaryotic expression of hemagglutinin gene of rinderpest virus. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 14: 189-195.
35. Elseth DG, Baumgardner DK. (1995). *Principles of Modern Genetics*. West Publishing Company St. Paul, MN USA : 134-140.
36. Evans AS, Belsham JG, Barrett T. (1990). The role of the nontranslated regions of the fusion protein mRNAs of canine distemper virus and rinderpest virus. *Virology* 177: 317-323.
37. Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. (1993) *Paramyxoviridae Veterinary Virology*, Academic Press California 471-487.
38. Forsthy M, Barrett T. (1995). Evalution of the polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res* 39: 152-163.
39. Galbraith SE, McQuaid S, Hamill L, Pullen Barrett T, Cosby SL. (2002). Rinderpest and peste des petits ruminants viruses exhibit neurovirulence in mice. *J Neurovirol* 8 : 45-52
40. Garoff H, Hewson R, Opstelten ED. (1998). Virus maturation by budding. *Mic and Mol Bio Re* 62: 1171-1190.
41. Ghosh A, Joshi VD, Shaila MS. (1995). Characterization of an in vitro transcription system from rinderpest . *Vet Mic* 44: 165-173.
42. Ghosh A, Nayak R, Shaila MS. (1996). Inhibition of replication of rinderpest virus by 5-Fluouracil. *Antiviral Res* 31: 35-44.
43. Gombart AF, A Hirano, Wong TW. (1992). Expression and properties of the V protein in acute measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus strains. *Virus Res* 25: 63-78.
44. Goodman S. (2001). More funding needed to wipe out rinderpest. *Nature* 411: 403.
45. Grubman MJ, Mebus C, Dale B, Yamanaka M, Yilma T. (1998). Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus infected cells. *Virology* 163: 261-267.
46. Gulati BR, Cameron KT, Seal BS, Goyal SM, Halvorson AD, Njenga MK. (2000). Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. *J Clinical Mic* 38: 4010-4014.
47. Gürtürk S, Finci E, Burgu İ. (1974) Yurdumuz sığırlarında sığır vebası üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 11: 101-113.

48. Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *S Mol Biol* 5: 557-580.
49. Hirano A, Wang AH, Gombart AF, Wong TC. (1992). The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc Natl Acad Sci USA* 15, 89 (18): 8745-8749.
50. Hofmann MA, Brian DA. (1991). Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques* 11: 30-31.
51. Horikami SM, Hector RE, Smallwood S, Moyer SA. (1997). The Sendai virus C protein binds the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *Virology* 235: 261-270.
52. Hsu D, Yamanaka M, Miller J, Dale B, Grupman M, Yılma T. (1988) Cloning of the fusion gene of rinderpest virus : comparative sequence analysis with other morbilliviruses. *Virology* 166: 149-153.
53. Innis AM, Gelfold DH, Sninsky JJ. (1995). *PCR Strategies*. Academic Press, London.
54. Kamata H, Ohkubo S, Sugiyama M, Matsuura Y, Kamata Y, Tsukiyama-Kohara K, Imaoka K, Kai C, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1993). Expression in baculovirus vector system of the nucleocapsid protein gene of rinderpest virus. *J Virol Methods* 43: 159-65.
55. Kamata H, Sugiyama M, Kamata Y, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1991). Nucleotide sequence of cDNA to the rinderpest virus mRNA encoding the nucleocapsid protein. *Virus Genes* 5: 1-5.
56. Kesari KV, Shaila MS. (1988). Structural proteins of rinderpest virus II : Purification and characterization of the nucleocapsid protein N, the hemagglutinin protein, H and the matrix protein, M. *Indian J Biochemistry & Biophysics* 25: 574-579.
57. Kingsbury DW. (1990). *Paramyxoviridae and Their Replication*. Fields Virology. (Fields BN, Knipe DM, Chaonk RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, eds.) 2nd Ed., Raven press, New York. Sayfa 945-955.
58. Kobune F, Sakata H, Sugiyama M, Sugiura A. (1991). B95a, marmoset lymphoblastoid cell line, as asensitive host for rinderpest virus. *J Gen Virol* 72: 687-692.
59. Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausman S, Curan J, Roux L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: The rule of six revisited. *J Virol* 72: 891-899.
60. Kozak M. (1984). Compilation and analysis sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 857-872.
61. Lamb RA. (1993). Paramyxovirus fusion: A hypothesis for change. *Virology* 197: 1-11.
62. Langedijk JP, Daus FJ, Oirschot JT. (1997). Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J Virol* 71: 6155-6167.
63. Libeau G, Diallo A, Colas F, Guerre L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and PPR using an immunocapture ELISA. *Vet. Record* 134: 300-304.

64. Limo M, Yilma T. (1990). Molecular cloning of the rinderpest virus matrix C sequence analysis with other paramyxoviruses. *Virology* 175: 323-327.
65. Lin GY, Paterson RG, Richardson CD, Lamb RA. (1998). The V protein of paramyxovirus SV5 interacts with damage-specific DNA binding protein. *Virology* 249: 189-200.
66. Luna EJ, Hitt AL. (1992). Cytoskeleton-plasma membran interactions. *Science* 258: 955-963.
67. Lund BT, Tiwari A, Galbraith S, Baron MD, Morrison I, Barrett T. (2000). Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates CD4⁺ T cell responses with broad viral antigen specificity *J Gen Virol* 81: 2137-2146.
68. Mahy WJB, Kangro OH. (1996). *Virology Methods Manual*. Academic Press Limited Oval Road, London.
69. Marriott CA, Easton JA. (1999). Reverse genetics of the paramyxoviridae. *Advances in Virus Research* 53: 321-340.
70. Minamoto N, Kinjo T, Hirayama N, Sasaki H, Yashikawa Y, Yamanouchi K. (1989). Characterization of monoclonal antibodies againsts four structural proteins of rinderpest virus. *J Gen Virol* 70: 2605-2613.
71. Mioulet V, Barrett T, Baron MD. (2001). Scanning mutagenesis identifies critical residues in the rinderpest virus genome promoter. *J Gen Virol* 82: 2905-2911.
72. Nagata K, Mizumoto K, Handa H, Watanabe K. (1996). Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol* 70: 241-247.
73. Nakaramura K, Iwatsuki K, Izumiya Y, Nishimura Y, Ohashi K, Mikami T, Kai C. (1999). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein (P) gene of the lapinized rinderpest virus. *Virus Genes* 18: 175-178.
74. Nakaramura K, Ohishi K, Ohkuba S, Kamata H, Yamanouchi K, Fujiwara K, Kai C. (1988). Immunizing effect of vaccinia virus expressing the nucleoprotein of rinderpest virus on systemic rinderpest virus infections in rabbits. *Comp Immunol Mic & Inf Dis* 21: 91-99.
75. Obi TU, McCullough KC. (1993). Identification of epitope expression an internal proteins of rinderpest virus which is dependant upon virion maturation events. *J Virol Methods* 41: 113-124.
76. Ozdarendeli A, Asci ZT, Bulut Y, Kuk S, Kalkan A. Polimeraz zincir reaksiyonu ile bakteriyel kolonilerin belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. BASIMDA.
77. Palese P, Zheng H, Engelhard OG, Pleschka S, Garcia-Sastre A. (1996). Negative strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci* 113: 11354-11358.
78. Parks CI, Lerch AR, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA. (2001). Analysis of the noncoding regions of measles virus strain in the edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75: 921-933.
79. Paterson RG, Leser GP, Shaughnessy MA, Lamb RA. (1995). The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208: 121-131.

80. Power UF, Ryan KW, Portner A. (1992). Sequence characterization and expression of the matrix protein gene of human parainfluenza virus type 1. *Virology* 191: 947-952.
81. Rey Nores JE, McCullough KC. (1996). Relative ability of different bovine leukocyte populations to support active replication of rinderpest virus. *J Virol* 70: 4419-4426.
82. Rield P, Moll M, Klenk H, Maisner A. (2002). Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Research* 83: 1-12.
83. Rima BK. (1983). The proteins of morbilliviruses. *J Gen Virol* 64:1205-1219.
84. Roeder P, Reichard R. (1999). Outbreak mission to the Russian Federation concerning the outbreak of rinderpest in Amur region in 1998. OIE Mission Report.
85. Roux L, Müller V, Mottet G. (1999). Characterization of sendai virus M protein mutants that can partially interfere with virus particle production. *J. Gen Virol* 80: 2977-2986.
86. Rweyemamu MM, Cheneau Y. (1995). Strategy for the global rinderpest eradication programme. *Vet Mic* 44: 369-376.
87. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
88. Shaji D, Shaila MS. (1999). Domains of rinderpest virus phosphoprotein involved in interaction with itself and nucleocapsid protein. *Virology* 258: 415-424.
89. Sharma B, Norrby E, Blixenkrone-Møller M, Kóvamees J. (1992). The nucleotide and deduced amino acid sequence of the M gene of phocid distemper virus (PDV). *Virus Research* 23: 13-25.
90. Shiotani M, Miura R, Fujita K, Wasaka C, Uema M, Kai C. (2001). Molecular properties of the matrix protein (M) gene of the lapinized rinderpest virus. *J Vet Med Sci* 63: 801-805.
91. Sidhu MS, Menonna JP, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. (1993). Canine distemper virus L gene: Sequence and comparison with related viruses. *Virology* 193: 50-65.
92. Sinnathamby G, Naik S, Renukaradhya GJ, Rajasekhar M, Nayak R, Shaila MS. (2001). Recombinant hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in insect cells induces humoral and cell mediated immune responses in cattle. *Vaccine* 19: 3870-3876.
93. Stallcup KC, Ranie CS, Fields BN. (1983). Cytochlasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology* 124: 59-74.
94. Sugiyama M, Minamoto N, Kinjo T, Hirayama N, Sasaki H, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1989). Characterization of monoclonal antibodies against four structural proteins of rinderpest virus. *J. Gen. Virol* 70: 2605-2613.
95. Sweetman DA, Miskin J, Baron MD. (2001). Rinderpest virus C and V proteins interact with the major (L) component of the viral polymerase. *Virology* 281: 193-204.
96. Tatar N. (1994). Değişik ısı derecelerinde farklı sürelerde tutulan sığır vebası aşısının Vero hücrelerinde aktive kontrolü. *Etlık Vet Mik Dergisi* 7: 5.

97. Tsukiyama K, Sugiyama M, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1987). Molecular cloning sequence analysis of rinderpest viruses mRNA encoding the hemagglutinin protein. *Virology* 160: 48-54.
98. Tsukiyama K, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1988). Fusion glycoprotein (F) of rinderpest virus: entire nucleotide sequence of the F mRNA, and several features of the F protein. *Virology* 164: 523-530.
99. Vincent S, Gerlier D, Manie SN. (2000). Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol* 74: 9911-9915.
100. Walsh EP, Baron MD, Anderson J, Barrett T. (2000). Development of a genetically marked recombinant rinderpest vaccine expressing green fluorescent protein. *J Gen Virol* 81: 709-718.
101. Wamwayi HM, Fleming M, Barrett T. (1995). Characterisation of African isolates of rinderpest virus. *Veterinary Microbiology* 44: 151-163.
102. Westover MK, Hughes AL. (2001). Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Mol Phylo and Evol* 21: 128-134.
103. Yamada H, Hayata S, Omata-Yamada T, Taira H, Mizumoto K, Iwasaki K. (1990). Association of the Sendai virus C protein with nucleocapsids. *Arch Virol* 113: 245-253.
104. Yamanaka M, Hsu D, Crips T, Dale B, Grubman M, Yilma T. (1988). Cloning and sequence analysis of the hemagglutinin gene of the virulent strain of rinderpest virus. *Virology* 166: 251-253.
105. Yilma T, Hsu D, Jones L, Owens S, Grubman M, Mebus C, Yamanaka M, Dale B. (1988). Protection of cattle against rinderpest with vaccinia virus recombinant expressing HA or F gene. *Virology* 242: 1058-1061.
106. Zhimov OP. (1990). Solubilization of matrix protein M1/M from virion occurs at different pH orthomyxo- and paramyxoviruses. *Virology* 176: 276-279.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BOKÜMANTASYON MERKEZİ

8.ÖZGEÇMİŞ

25.05.1975 yılında Çorum ilinde dünyaya gelmişim. İlk ve orta tahsilimi sırasıyla Çorum Tanyeri ve Albayrak ilkokulu, Çorum Atatürk Ortaokulu ve ardından Çorum Atatürk Lisesinde gerçekleştirdim. Lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 1998 yılı içerisinde bitirdim. Aynı yılın güz döneminde Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalında doktora başladım.