

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO* IRIDESCENT VİRÜS REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASINDA ROL OYNAYAN
HÜCRESEL PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ZENGİN

**OCAK 2024
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CHILO* IRIDESCENT VİRÜS REPLİKASYONUNUN BA LAMASINDA ROL OYNAYAN
HÜCRESEL PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ**

Kübra ZENGİN

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 /01 /2024

Tezin Savunma Tarihi : 17 /01 /2024

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“Chilo Iridescent Virüs Replikasyonunun Başlamasında Rol Oynayan Hücresel Proteinlerin Belirlenmesi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışması boyunca büyük sabırla deneylerimin yürütülmesinde, değerlendirmesinde bana yardımcı olan ve çalışma disiplini olarak örnek aldığım sayın hocam Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, tez süreci boyunca değerli bilgilerini benden esirgemeyen ve önüme çıkan tüm engelleri aşmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve her sorduğum soruda beni cevapsız bırakmayan ve ufkumu genişleten sayın hocam Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarındaki biyoinformatik kısımların çözümlenmesinde ve ilerletilmesinde büyük bir özveri ile yardımcı olan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’a, deneylerimde ihtiyaç duyduğum ilave cihazları laboratuvarında kullanmama izin veren başta Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI olmak üzere tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca benden sevgilerini esirgemeyen, çıktığım bu yolda desteklerini arkamda hissettiğim ve başarılı olacağıma her zaman gönülden inanan canım anneme, babama ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK’a (Proje no: 119Z209) teşekkür ediyorum.

Kübra ZENGİN

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Chilo Iridescent Virüs Replikasyonunun Başlamasında Rol Oynayan Hücresel Proteinlerin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı başından sonuna kadar danışmanım Prof. Remziye NALÇACIOĞLU ‘nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 17/01/2024

Kübra ZENGİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Iridoviridae Familyası	2
1.2.1. Virion Morfolojisi	4
1.2.2. Viral Replikasyon	5
1.2.3. Invertebrate Iridescent Virüs 6 (IIV6)	6
1.2.4. IIV6 Yapısal Proteinleri	8
1.2.5. Konak Çeşitliliği ve Patoloji	10
1.3. Virüslerin Konak Hücreye Girişi	11
1.4. Virüs-Reseptör Etkileşimleri	13
1.5. Hücre Yüzeyindeki Yaygın Viral Reseptörler	14
1.5.1. Sialik Asit (SA) Reseptörleri	14
1.5.2. Adezyon Molekülleri (CAM)	15
1.5.3. Fosfatidilserin (PtdSer) Reseptörleri	16
1.5.4. Heparan Sülfat ve Diğer Glikozaminoglikanlar	17
1.5.5. Histo-Grup Antijenleri	17
1.6. Çalışmanın Amacı	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler	19
2.2. Çalışmada Kullanılan Plazmid ve Kitler	19

2.3. Membran Protein İzolasyonu	19
2.4. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	20
2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	20
2.6. Hücre Membran Proteinleri ile Viral Potansiyel Zarf Proteinini 118L'nin Hibridizasyonu.....	21
2.7. LC-MS Sonuçlarının Biyoinformatik Analizleri	22
2.8. Protein-Protein Docking	22
2.9. Böcek Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	23
2.10. Reverse Transkripsiyon -PCR (RT-PCR)	24
2.11. Kompetent Bakteri Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon	26
2.12. Rekombinant Plazmitlerin Belirlenmesi	26
2.13. cDNA'nın Ara Transfer Vektörüne (pFastBacHTA) Klonlanması.....	28
2.14. TER94 Geninin Bac-To-Bac® Bakülovirüs Ekspresyon Sisteminde ifadesi	29
2.14.1. <i>E.coli</i> DH10Bac Kompetent Hücrelerinin Hazırlanışı	30
2.14.2. Rekombinant pFastBacHTA Vektörünün <i>E.coli</i> DH10Bac Kompetent Hücrelerine Transformasyonu ve Transpozisyonu	30
2.14.3. Rekombinant Bakmid DNA'ların İzolasyonu ve PCR ile Doğrulanması.....	30
2.14.4. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücrelerine Transfeksiyonu ve Rekombinant Virüsün Çoğaltılması.....	31
2.14.5. TER94 Proteininin Hücre Kültüründe Üretilmesi.....	32
2.15. 118L Proteininin Bakteriyal Sistemde Üretilmesi	33
2.15.1. <i>E.coli</i> BL21-pLysS Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon	33
2.15.2. Protein İfadesi	33
2.16. Pul-Down Analizi	34
3. BULGULAR	35
3.1. <i>Spodoptera Frugiperda</i> (Sf9) Hücrelerinden Membran Protein İzolasyonu	35
3.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	35
3.2. <i>Spodoptera Frugiperda</i> (Sf9) Hücre Membran Proteinleri ile Viral 118L Proteininin Hibridizasyonu	36
3.3. LC-MS Sonuçlarının Biyoinformatik Analizleri.....	36
3.4. In Silico Protein Etkileşim Analizleri	39

3.5. <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	43
3.6. cDNA Sentezi ve cDNA'nın Klonlanması.....	44
3.7. TER94 Çift Zincir cDNA'sının pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması	44
3.8. TER94 Çift Zincir cDNA'sının pFastBacHTA Ara Transfer Vektörüne Klonlanması.....	45
3.9. Rekombinant Transfer Vektörün Taşıyıcı Hücreye Aktarılması ve Transpozisyon.....	46
3.10. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücre Kültürüne Transfeksiyonu.....	48
3.11. TER94 Proteininin <i>Spodoptera frugiperda</i> Hücrelerinde Üretilmesi.....	49
3.12. 118L Proteininin Bakteriyal Sistemde Üretilmesi.....	50
3.13. Pull-down Analizi.....	51
4. TARTIŞMA.....	52
5. SONUÇLAR.....	54
6. ÖNERİLER	56
7. KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

CHILO IRIDESCENT VİRÜS REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASINDA ROL
OYNAYAN HÜCRESEL PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ

Kübra ZENGİN
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Remziye NALÇACIOĞLU
2024, 66 Sayfa

Iridoviridae familyasına ait bir böcek virüsü olan Chilo iridescent virus (CIV), çift zincirli DNA genoma (212,482 baz çifti) ve ikozahedral morfolojiye sahiptir. DNA genomu, bir lipit tabaka ve bu tabakanın üzerinde protein yapıdaki kapsid ile çevrilidir. Enfekte ettikleri hücreden ayrılış biçimine göre zarflı (tomurcuklanma ile ayrılma) veya çıplak (liziz ile ayrılma) olabilmektedirler. CIV, çok sayıda zararlı böcekte ölümcül ve ölümcül olmayan enfeksiyonlar oluşturmasından dolayı biyopestisit olma potansiyeline sahiptir. Ayrıca CIV'nin memeli hücrelerine girebilmesi fakat bu hücrelerde replike olmaması özelliği de virüsün insan hücrelerine gen aktarmada kullanılabileceğini göstermektedir. CIV'den bilimsel olarak etkili bir şekilde faydalanabilmemiz için virüsün anatomisinin, replikasyonunun ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir. Proteomik çalışmalar CIV'nin 54 adet yapısal proteine sahip olduğunu göstermiştir. Bu yapısal proteinlerden biri virüs replikasyon döngüsü için hayati bir öneme sahip olabilecek 118L açık okuma zinciri (ORF) tarafından kodlanmaktadır. 118L bütün iridovirüs ve askovirüslerde homoloğu bulunan bir genidir. Homologları ile yapılan araştırmalar, 118L'nin CIV'nin hücreye giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olabileceği ve virüs replikasyonunda önemli bir rol üstlenebileceğini göstermektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmada, CIV'ye ait bir zarf proteinini olan 118L'nin *Spodoptera frugiperda* (Sf9) konak hücresinde etkileşime girdiği protein/ler araştırılmıştır. İlk olarak Sf9 hücrelerinden izole edilen total membran proteinleri 118L proteini ile hibridize edildi. Hibridizasyon sonucu oluşan protein bandı LC-MS analizine tabii tutuldu. Analiz sonucu protein bandının, potansiyel olarak Sf9 hücrelerindeki Eukaryotic translation initiation factor 3 (EuTIF3), Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER94), Eukaryotic translation elongation factor 2 (TEF2) ve Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum (ctATPser) isimlerinde dört proteine benzer olabileceğini gösterdi. Yapılan *in silico* deneylerde TER94 proteininin 118L ile yüksek oranda etkileştiği görüldü. Bu etkileşim Baculovirus ekspresyon vektör sisteminde üretilen TER94 proteini ile bakteriyel sistemde üretilmiş 118L proteininin *in vitro*'da pull-down analizinde etkileşim göstermesi ile doğrulandı.

Anahtar Kelimeler: Chilo iridescent virüs (IIV6), *Spodoptera frugiperda*, TER94 proteini

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF CELLULAR PROTEINS PLAYING A ROLE IN THE START OF
CHILO IRIDESCENT VIRUS REPLICATION

Kübra ZENGİN

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

Supervisor: Prof. Remziye NALÇACIOĞLU
2024, 66 Pages

Chilo iridescent virus (CIV), an insect virus belonging to the Iridoviridae family, has a double-stranded DNA genome (212,482 base pairs) and icosahedral morphology. The DNA genome is surrounded by a lipid layer and a protein capsid on top of this layer. They can be enveloped (separation by budding) or naked (separation by lysis) depending on the way they leave the infected cell. CIV has the potential to be a biopesticide because it causes deadly and non-lethal infections in a large number of pests. In addition, the ability of CIV to enter mammalian cells but not replicate in these cells indicates that the virus can be used to transfer genes to human cells. In order to make effective use of CIV scientifically, it is necessary to elucidate the anatomy, replication and molecular mechanisms of the virus. Proteomic studies have shown that CIV has 54 structural proteins. One of these structural proteins is encoded by the 118L open reading chain (ORF), which may be vital to the virus replication cycle. 118L is a gene homologous to all iridoviruses and ascoviruses. Studies with its homologues indicate that 118L may be a member of the entry-fusion complex of CIV and play an important role in virus replication. In line with this information, in this thesis study, the protein/s with which 118L, an envelope protein of CIV, interacts in the host cell of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) were investigated. First, total membrane proteins isolated from Sf9 cells were hybridized with 118L protein. The protein band formed as a result of hybridization was subjected to LC-MS analysis. Analyse results showed that the protein band potentially resembles four proteins in Sf9 cells, namely Eukaryotic translation initiation factor 3 (EuTIF3), Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER94), Eukaryotic translation elongation factor 2 (TEF2) and Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum (ctATPser). In-silico experiments showed that TER94 protein interacted with 118L at a high rate. This interaction was confirmed by the interaction of TER94 protein produced in the Baculovirus expression vector system and 118L protein produced in the bacterial system in-vitro at pull-down analysis.

Key Words: Chilo iridescent virus (IIV6), *Spodoptera frugiperda*, TER94 protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İridoviridlerin diğer nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri (NLCDV) ile filogenetik ilişkileri	4
Şekil 2. İridovirid parçacığının enine kesitinin şematik diyagramı	5
Şekil 3. Frog virus 3 (FV-3) replikasyon döngüsü	6
Şekil 4. İnvertebrate iridescent virus 6 (IIV6)'daki trimerik kapsomerlerin organizasyonu	7
Şekil 5. Virüslerin konak hücreye giriş stratejileri	12
Şekil 6. Yaygın viral reseptör sınıfları	17
Şekil 7. Bac-to-Bac ekspresyon vektör sistemi	32
Şekil 8. Sf9 hücrelerine ait membran proteinlerin Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış SDS-PAGE jelindeki görüntüsü.....	35
Şekil 9. Sf9 hücre membran proteinleri ile 118L proteininin hibridizasyonu	36
Şekil 10. IIV6 118L için AlphaFold programı ve <i>Spodoptera frugiperda</i> 9 (Sf9) konak hücresine ait proteinleri için ColabFold programı kullanılarak oluşturulmuş 3 boyutlu (3D) yapıları.. ..	39
Şekil 11. Viral 118L proteininin aktif ve pasif aminoasit rezidülerinin HADDOCK programı ile elde edilmiş numaraları.....	40
Şekil 12. Hüresel proteinlerin aktif ve pasif aminoasit rezidülerinin HADDOCK programı ile elde edilmiş numaraları.....	41
Şekil 13. Viral 118L proteini ile hüresel proteinler arasında etkileşen amino asitler ve etkileşim dereceleri.....	42
Şekil 14. 118L (sarı) virüs proteini ile TER94 hüresel protein arasındaki etkileşimin HADDOCK v2.4 programı ile belirlenmesi ve etkileşim modelinin üç boyutlu yapısı.....	43
Şekil 15. <i>Spodoptera frugiperda</i> 9 hücrelerinden izole edilmiş total RNA'sının agaroz jel görüntüsü.	43
Şekil 16. <i>Spodoptera frugiperda</i> hücrelerine ait TER94 geninin PCR ile çoğaltılmış çift zincir cDNA'sının görüntüsü.....	44
Şekil 17. TER94 çift zincir cDNA'sının pJET1.2 vektörüne klonlandığını gösteren agaroz jel görüntüsü	45
Şekil 18. pFastBacHTA transfer vektörünün (A) ve rekombinant pFastBacHTA/TER94 rekobinant plazmidlerinin restriksiyon endonükleazlarla muamelesi.....	46

Şekil 19.	<i>E.coli</i> DH10Bac hücrelerinin pFastBacHTA/TER9 ile transformasyonu sonucu oluşan petri görüntüsü	47
Şekil 20.	TER94 cDNA'sının AcNPV bakmid DNA'sı içerisine klonlandığını gösteren PCR görüntüsü	48
Şekil 21.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) hücrelerinin rekombinant virüs (AcNPV/TER94) ile enfeksiyon görüntüleri	49
Şekil 22.	Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde üretilen <i>Spodoptera frugiperda</i> TER94 proteininin Western-blot analizi	50
Şekil 23.	IIV6 118L geninin bakteriyal sistemde ifadesi	50
Şekil 24.	Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) 118L (GST kuyruklu) ile <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) TER94 (Histidin kuyruklu) proteinlerinin GST-pull down analizi	51

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Iridoviridae</i> familyası üyeleri ve özellikleri.....	3
Tablo 2. İki veya daha fazla farklı peptite göre LC_MS/MS analizi ile tanımlanan Sf9 hücresel proteinleri.....	9
Tablo 3. TER94 genine ait primer dizileri.....	24
Tablo 4. <i>Spodoptera frugiperda</i> 'ya ait hücresel protein bandının gen bankasındaki diğer organizmalara ait proteinler ile olan benzerliği	37
Tablo 5. <i>Drosophila melanogaster</i> 'e ait proteinlere benzerlik oranları.....	38
Tablo 6. Virüse ait 118L proteinin bağlandığı muhtemel <i>Spodoptera frugiperda</i> membran proteinleri	39

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
AcNPV	: <i>Autographa californica</i> nükleopolihedrovirüs
ATPaz	: Adenozin trifasfataz
BCIP	: Bromochloroindolyl fosfat
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CaCl	: Kalsiyum klorür
CAM	: Hücresel adezyon molekülleri
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
ddH ₂ O	: Çift distile su
DE	: Delayed Early
DL2	: Drosophila line 2
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
DR1	: Drosophila line 1
dsDNA	: Çift sarmallı DNA
dsRNA	: Çift sarmallı RNA
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EuTIF3	: Eukaryotic translation initiation factor 3
FBS	: Fetal Bovine Serum
FV-3	: Frog virus 3
g	: Gravite
GAG	: Glikozaminoglikanlar
GST	: Glutathione S- Transferase
HBGA	: Histo-kan grubu antijenlerini
HIV	: Human Immunodeficiency Virüs
HMG	: High Mobility Group
HSV	: Herpes simpleks virüsü

IE	: İmmediate Early
IgG	: İmmunoglobulin G
IgsF	: İmmünoglobulin süper ailesi
IIV6	: Invertebrate iridescent virüs 6
IPTG	: Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside
Kb	: Kilo baz
kDA	: Kilodalton
<i>lacZ</i>	: Beta- galaktosidaz
LB	: Lüria Bertani Broth
LC-MS	: Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi
M	: Molar
MCP	: Major kapsid proteini
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mM	: Milimolar
M-MLV	: Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	: Elçi RNA
NaCl	: Sodyum klorür
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NCLDV	: Nükleo-sitoplazmik büyük DNA virüsleri
Ng	: Nanogram
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
OD	: Optical Density
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pg	: Pikogram
PtSer	: Fosfotidilgliserin

RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
rpm	: Revolutions per minute
RT	: Revers transkriptaz
RT-PCR	: Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	: Sodyum dedosilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
Sf9	: <i>Spodoptera frugiperda</i> 9
TAM	: Tirozin kinaz ailesi
TE	: TrisHCl-EDTA
TEF2	: Eukaryotic translation elongation factor 2
TER94	: Transitional endoplasmic reticulum ATPase
TIM	: Müsin domeyni
TNCL1	: <i>Trichoplusia ni</i>
U	: Unit
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D galactopyranoside
β	: Beta

1. GENEL BİLGİ

1.1. Giriş

Virüsler, prokaryotlardan bitki ve hayvanlara kadar her tür yaşam formunda bulunabilen hücresel olmayan zorunlu hücre içi parazitlerdir. Virüs terimi “zehir” anlamına gelen Latince bir kelimedenden köken almaktadır.

İlk olarak 1886 yılında tütün bitkisinin yapraklarında oluşan mozayik hastalığının karakterize edilmesiyle keşfedilmişlerdir. Çeşitli morfolojilere sahip olup boyutları nanometreden mikrometreye kadar değişkenlik göstermektedir. Yapısal olarak, nükleik asit ve onu çevreleyen protein bir örtüden oluşurlar. Nükleik asit DNA veya RNA yapısında olabilmektedir. Bazılarında protein örtünün üzerinde lipid yapıda bir zarf bulunmaktadır. Virüsler hücresel olmadıkları ve zorunlu hücre içi paraziti oldukları için replikasyonları ve yayılımları için konak hücreye bağımlıdır. Şimdiye kadar binlerce virüs keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. Virüslerin yalnızca küçük bir azınlığı tüm canlılarda enfeksiyon sonucunda yaşamı tehdit eden ciddi hastalıklara veya ölümlere neden olmaktadır. Fakat, bu enfeksiyonlar büyük çaplı ekonomik kayıplara yol açabilmektedir. Bununla birlikte bazı viral enfeksiyonların insanların yararına kullanımları söz konusudur. Zararlı böcekleri enfekte eden virüsler bu amaç doğrultusunda kullanılmaktadır.

Günümüzde zararlılarla mücadelede doğal düşmanların kullanılması şeklinde tanımlanan biyolojik mücadele kapsamında, zararlı böcekleri enfekte edebilen virüsler de yer almaktadır. Tarım ve ormancılıkta kayıplara neden olan zararlı böceklerin kontrolünde bu virüslerde kullanılmaktadır. Bugüne kadar çok sayıda böcek virüsü izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Entomopatojen virüslerden *Cydia pomonella* granülovirüsü, elma iç kurduna karşı ülkemizde ruhsat almış bir entomopatojendir. Böcek virüsleri uzun zamandan beri tıbbi, ekonomik ve endüstriyel bakımdan önemli çeşitli proteinlerin üretildiği gen ekspresyon vektörleri olarak biyoteknolojide kullanılmaktadır (Demirbağ vd. 1998, Beljelarskaya 2002).

Baculoviridae, *Iridoviridae*, *Entomopoxvirinae*, *Densovirinae*, *Reoviridae*, *Polydnviridae* ve *Ascoviridae* familyalarına ait farklı böcek virüsleri, böcek popülasyonlarında enfeksiyonlara neden olurlar. *Iridoviridae* familyasına ait Iridovirus cinsinin tip türü olan omurgasız yanardöner virüs 6 (Invertebrate iridescent virus 6, IIV6), kök

kurdu *Chilo suppressalis* (Lepidoptera) böceğinden izole edilmiştir. IIV6, tarıma önemli zararlar veren otçul böceklerin çoğunu enfekte ettiği için özel ekonomik ve ekolojik değere sahiptir. Bu otçul böceklerden biri de *Spodoptera frugiperda*'dır. Mısır, pirinç, sorgum, şeker kamışı, sebzeler ve pamuk gibi bitkilerle beslenen bu otçul böcek yoğun olduğu durumda mahsulünün hızla tükenmesine neden olmaktadır.

Bu çalışmada, IIV6'nın konağı olan *Spodoptera frugiperda*'yı enfeksiyonu sırasında hücre yüzeyinde etkileşime girdiği proteinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada IIV6'ya ait ve potansiyel bir zarf proteini olan 118L proteini *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) hücre hattından izole edilen membran proteinleri ile etkileşime sokulmuş ve virüsün konak hücreye girişindeki rolü araştırılmıştır.

1.2 Iridoviridae Familyası

Iridoviridae familyası mensupları ikozahedral yapıda, nükleo-sitoplazmik büyük DNA virüsleridir (NCLDV) (Marschang ve Rachel, 2011). “Irido” kelimesi, gökkuşağı anlamına gelmekte olup bir Yunan tanrıçasının adı olan İris'ten türemiştir. Familyanın ismi, virüslerin enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazması içinde birikerek oluşturdukları gökkuşağı benzeri yanardöner (iridescent) renkten gelmektedir (Papp ve Marschang, 2019).

Mevcut taksonomiye göre, *Iridoviridae* familyası *Alphairidovirinae* ve *Betairidovirinae* olmak üzere iki alt familyaya ayrılmıştır (Chinchar vd., 2017). *Alphairidovirinae* üyeleri, başlıca ektotermik omurgalıları enfekte eden *Ranavirus*, *Megalocytivirus* ve *Lymphocystivirus* cinslerini içerirken *Betairidovirinae* üyeleri ise böcekler ve kabuklular gibi esas olarak omurgasızları enfekte eden *Iridovirus*, *Chloriridovirus* ve *Decapodiridovirus* cinslerini içermektedir (Papp ve Marschang, 2019). *Betairidovirinae* alt familyasının üyeleri, omurgasız iridescent virüsler (IIV'ler) olarak bilinir. *Iridoviridae* familyası mensuplarının genel ismi önceleri iridovirüsler olarak belirtilirken, daha sonra *Iridovirüs* cinsi üyeleri ile karışıklıklar yaşandığı için “iridoviridler” olarak değiştirilmiştir.

Iridoviridler virion parçacık boyutuna, konak tercihine, DNA metiltransferazı kodlayan genin varlığına, amino asit dizisine ve major kapsid proteininin GC içeriğine göre sınıflandırılmıştır (Tablo 1) (Chinchar vd., 2005; King vd., 2011).

Tablo 1. *Iridoviridae* familyası üyeleri ve özellikleri (Chinchar vd, 2005; King vd, 2011)

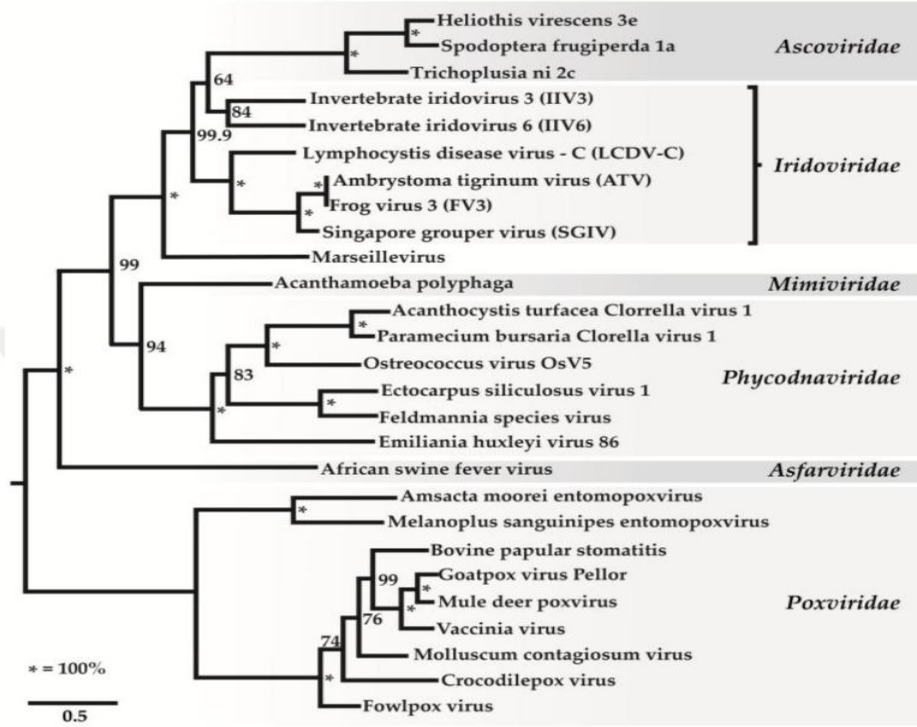
Alt familyası	Cins	Virion boyutu	Konak	GC içeriği	DNA metilasyonu
<i>Betairidovirinae</i>	<i>Iridovirus</i>	120-130 nm	Eklembacaklılar, özellikle böcekler	29-32%	Mevcut değil
	<i>Decapodiridovirus</i>	158 nm	Karides, ıstakoz	35%	Mevcut değil
	<i>Chloriridovirus</i>	180 nm	Suda yaşayan larva aşamasındaki dipteralar, başlıca sivri sinekler	48%	Mevcut değil
<i>Alphairidovirinae</i>	<i>Lymphocystivirus</i>	198-227 nm	Pisi balığı	29.1-33%	Mevcut
	<i>Ranavirus</i>	150 nm	Sürüngenler, amfibiler ve kemikli balıklar	54%	Mevcut
	<i>Megalocytivirus</i>	140-200 nm	Deniz balıkları	54.8%	Mevcut

Yeni iridoviridler sürekli olarak keşfedilmektedir. Ancak sınırlı sayıda IIV genomu dizilenmiştir ve bu nedenle genetik heterojenliği kesin olarak ölçmek veya tahmin etmek zordur (İnce vd., 2018).

İridoviridlerin filogenetik olarak sınıflandırılmasında korunmuş iridovirid genleri (26 gen) kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tam genom dizilerine dayalı filogenetik analiz daha üstün bir sınıflandırma sağlamaktadır (İnce vd., 2018). Genomları tamamen dizin analizi yapılmış 15 iridoviridin, 26 korunmuş gene göre filogenetik analizi, *Iridoviridae* familyası içindeki cinsler arasında net bir ayrım olduğunu göstermektedir (Eaton vd., 2010).

Asfarviridae, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* ve *Poxviridae* familyalarındaki nükleositoplazmik büyük DNA virüslerinin (NCLDV) *Iridoviridae* familyasındaki virüsler ile yakınlığı araştırılmış ve bir filogenetik ağacı oluşturulmuştur. (Şekil 1). Bu filogenetik ağaca göre iridovirid proteinlerinden D5 tip ATPaz, A32 ATPaz, A2L/VLTF3 transkripsiyon faktörü, major kapsid proteini (MCP) ve DNA polimeraz B, diğer nükleositoplazmik büyük DNA virüslerinin üyeleri ile özellikle *Ascoviridae*,

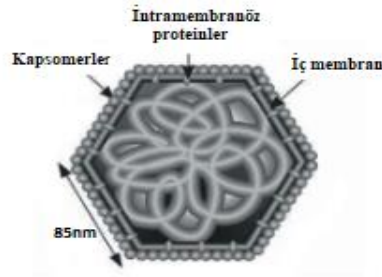
Phycodnaviridae, *Marseilleviridae*, *Mimiviridae*, *Poxviridae*, *Iridoviridae* ve *Asfarviridae* familyaları üyeleri ile yüksek aminoasit benzerlikleri göstermiştir (King vd., 2011; Boyer vd., 2009).



Şekil 1. İridoviridlerin diğer nükleositoplazmik büyük DNA virüsleri (NLCDV) ile filogenetik ilişkileri (İnce vd., 2018; Boyer vd., 2009).

1.2.1. Virion Morfolojisi

IIV'ler, ikosahedral simetri gösterirler ve çapları 110–300 nm arasındadır. IIV'lerin çift zincirli DNA (dsDNA) genomlarının uzunlukları 100 ile 210 kb aralığındadır (Fauquet vd., 2005). Genomları, hayvan virüsleri arasında benzersiz olup dairesel olarak permütasyon ve terminal olarak tekrarlar gösterir (Papp ve Marschang, 2019). Virüs partikülü, dış protein kapsid tabakası, ara lipid zarı ile ilişkili polipeptitler ve nükleositoplazmik dsDNA genomu içeren üç merkezli alandan oluşmaktadır (Chinchar vd., 2005; Williams 1998; Yan vd., 2009) (Şekil 2).



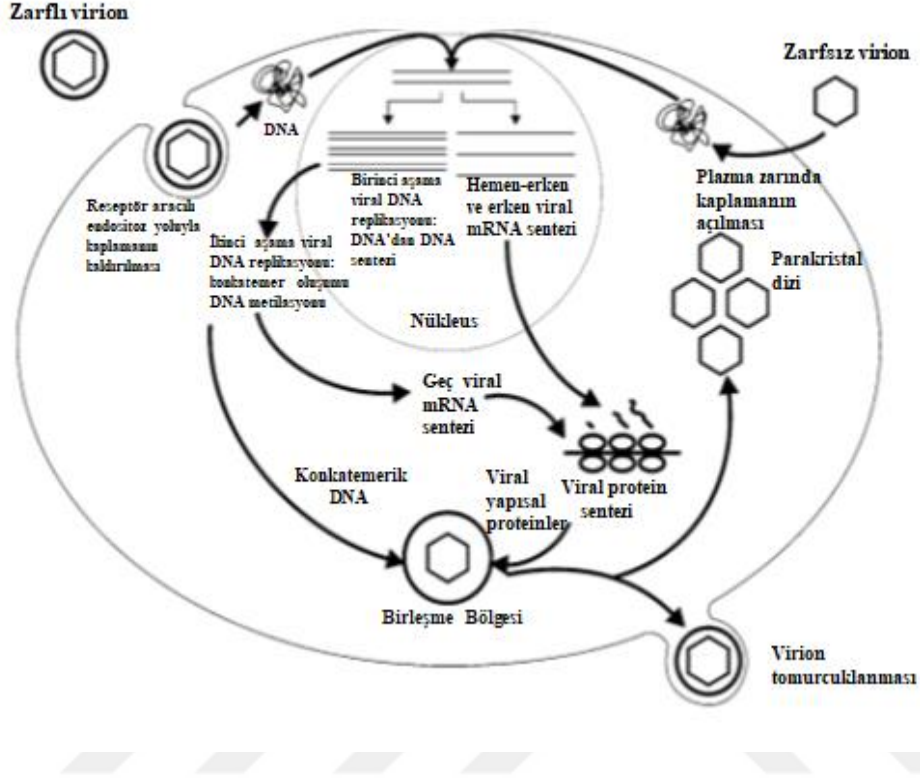
Şekil 2. İridovirid parçacığının enine kesitinin şematik diyagramı (Darcy-Tripier vd., 1984).

1.2.2. Viral Replikasyon

Alphairidovirinae alt familyasının *Ranavirus* cinsine ait olan Frog virus 3 (FV-3) omurgalı iridoviridler için model organizmadır ve iridoviral genom replikasyonu, transkripsiyonu ve virüs aracılı konakçı istilasını açıklamak için kullanılmıştır (Granoff, 1984). Buna göre iridoviridlerde virionun hücreye girişi, reseptör aracılı endositoz ile zarflı virüslerin alınması (Braunwald vd., 1985) veya plazma zarında virüsün zarfının açılıp çıplak viron şeklinde konak hücre içerisine girmesi ile gerçekleşmektedir (Chinchar, 2002). Zarfın kaldırılmasının ardından viral DNA çekirdeğe girer ve burada birinci aşama erken (IE=immediate early) ve gecikmeli erken (DE= delayed early) transkriptler, viral genomik DNA'dan hücresel RNA polimeraz II (Pol II) aracılığı ile sentezlenir (Goorha, 1981; Goorha vd., 1978) (Şekil 3). IE ve DE viral transkriptleri tarafından kodlanan gen ürünleri hem düzenleyici hem de katalitik proteinleri içermektedir (Murphy vd., 2012).

Viral DNA sentezinin ikinci aşaması sitoplazmada gerçekleşir. Viral DNA; uzun, peş peşe eklenmiş, konkatamerler halinde sentezlenir (Goorha, 1982; Goorha ve Dixit, 1984). Geç viral transkriptlerin sentezi, sitoplazmada meydana gelir ve geç genlerin tamamının transkripsiyonu, önceden DNA sentezi gerektirir (Şekil 3). RNA polimeraz II'nin en büyük iki alt biriminin homologları, tüm iridoviridler tarafından kodlanır (Murphy vd., 2012).

Virion oluşumu, sitoplazmada morfolojik olarak farklı virüs toplanma bölgeleri içinde gerçekleşir. Viral alt yapıların birleşmesini takiben virionlar, sitoplazmada büyük parakristal diziler içinde birikir veya plazma zarından tomurcuklanarak bir zarf kazanırlar (Chinchar, 2002) (Şekil 3). Hücre kültüründe ise çoğu virion, hücre içinde kalır ve yalnızca enfekte hücrelerin parçalanmasının ardından salınır (Goorha ve Granoff, 1978).



Şekil 3. Frog virus 3 (FV-3) replikasyon döngüsü (Chinchar, 2002).

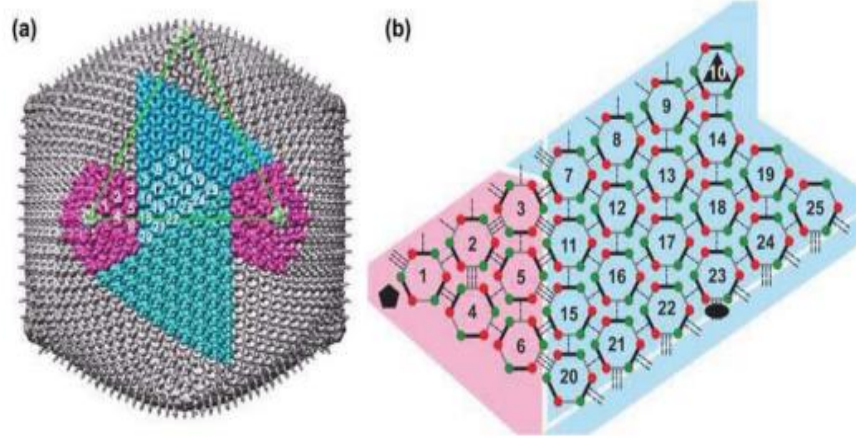
1.2.3. Invertebrate Iridescent Virüs 6 (IIV6)

Iridoviridae familyasının *Iridovirüs* cinsine ait bir tür olan Invertebrate iridescent virüs 6 (IIV6), Chilo iridescent virüs (CIV) olarak da isimlendirilmektedir. IIV6, çok çeşitli böcek larvalarını enfekte edebilmektedir. Virionlar, dairesel olarak permütasyonlu, bir adet doğrusal dsDNA molekülü içermektedir (Jakob vd., 2001). IIV6, ilk olarak lepidoptera'ya ait *Chilo supresalis*'ten (pirinç sap kurdu) izole edilmiştir (Fukaya ve Nasu, 1966). IIV6 ile enfekte olmuş hücrelerde yoğun bir şekilde kümelenen virionlar, mavi ile mor karışımı karakteristik yanardöner bir renk oluşturur (Yan vd., 2009).

IIV6, yaprak zararlılarını ve bazı eklembacaklıları içeren geniş bir konukçu yelpazesine sahiptir (Devauchelle vd., 1985). Biyolojik açıdan IIV6, pirinçte ve sert çekirdekli meyvelerde büyük zararlara neden olan bir dizi otçul böceği enfekte ettiğinden, özel

ekonomik ve ekolojik öneme sahiptir (Smith, 1976). Bu nedenle IIV6, biyolojik mücadele için potansiyel bir kontrol ajanı olarak kabul edilebilir.

IIV6; fibriller ile kaplı, ikosahedral simetriye sahip büyük DNA virüsüdür. Virüs parçacığı üç kısımdan oluşur; dışta protein yapıda bir kapsid, polipeptitler ile bağlantılı bir ara lipid zar ve merkezde genomu içeren bir DNA-protein merkezli kompleksi. Virionların hücreden tomurcuklanarak çıktığı durumlarda, kapsid üzerinde bir dış zarf içerebilmektedir (Williams vd., 2005; Williams, 1998). Virion çapı 120-200 nm arasındadır (İnce, 2012). IIV6 kapsidi (çıplak virion) üzerinde yapılan kriyo-elektron mikroskopisi ve üç boyutlu görüntüleme çalışmalarında, virion yüzeyinden dışarı çıkan fibriller ile birlikte virionun çapının maksimum 185 nm olduğu gösterilmiştir. Her virion 12 pentasimetron ve 20 trisimetronun oluşturduğu ikozahedral yapıya sahiptir. Trisimetronların her birinde 55 kapsomer vardır (Yan vd., 2009) (Şekil 4).



Şekil 4. Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)'daki trimerik kapsomerlerin organizasyonu. a: 20 yüzlü (açık mavi ve koyu mavi renkler) ve 12 beşli simetriye sahiptir (pembe renk). İkosahedronun bir üçgen yüzeyi yeşil çizgiler ile gösterilmiştir. b: Bir asimetric birim içindeki kapsid proteinleri interaksiyonlarının şematik diyagramı. Siyah elips, üçgen ve beşgen sembolleri, sırasıyla 2'li, 3'lü ve 5'li ekseninde katlanma yerlerini göstermektedir (Yan vd., 2009).

IIV6 major kapsid proteini (MCP), toplam protein kütlesinin neredeyse yarısını oluşturur (Balange-Orange vd., 1982; Bamford vd., 2005). İç lipid membran ile ilişkili ve MCP ile beraber en az üç minor kapsid proteininin varlığı bildirilmiştir. Bu proteinler parmak (finger, 19.7 kDa), fermuar (zip, 11.9 kDa) ve tutunma (anchor, 32.4 kDa) proteinleri olarak isimlendirilmiştir (Yan vd., 2009 ve İnce, 2012). Virion, kesiksiz bir iç lipid çift tabakası oluşturmaya yetecek kadar % 9 lipid içerir. Viral zarda, fosfatidilinositol ve digliseritlerde bol miktarda bulunur ve onu konakçı hücreden ayıran bir bileşime sahiptir; bu da IIV6'nın onu asemblesi sırasında elde etmiş olabileceğini düşündürür (Balange-Orange vd., 1982). Virüs, ikosahedral yapı içinde 212.482-bp uzunluğunda bir dsDNA genomu bulundurur (Devauchelle vd., 1985). Genom, virüs kütlesinin yaklaşık % 12'sini oluşturur (Yan vd., 2009) ve döngüsel olarak değişiklik göstermekte olup yaklaşık %12 fazlalık içerebilmektedir (Schnitzler vd., 1987).

1.2.4. IIV6 Yapısal Proteinleri

IIV6 virion proteinlerini tanımlamak için LC-MS/MS ile birleştirilmiş bir ve iki boyutlu SDS-PAGE kullanılarak kapsamlı bir proteomik analiz yapılmış ve virion yapısında 54 proteinin varlığı tespit edilmiştir. Varsayılan IIV6 proteinlerin on beşinin olası fonksiyonları, blast araştırmaları sonucunda ortaya konulmuştur. Bunlar serin-treonin kinazlar (209R, 380R, 439R), fosfatazlar (123R, 355R), viral DNA polimeraz N-terminal domainine sahip protein (232R), NTPaz (22L), fasiklin domaini (96L), ribonükleaz III (142R), tirozin protein kinaz (179R), katepsin (361L), HMG proteini (401R), protein disülfid izomeraz (453L), lizozomla ilişkili membran glikoproteini (061R) ve transmembran proteini (118L). Bunların dışındaki diğer 39 protein, literatürdeki proteinler ile benzerlik göstermemiştir (İnce vd., 2010) (Tablo 1).

Tablo 2. İki veya daha fazla farklı peptite göre LC_MS/MS analizi ile tanımlanan IIV6 yapısal proteinleri (İnce, 2010).

ORF	Erişim no	Mol. kütle (kDA)	Karşılık gelen protein yüzdesi (% amino asitlere göre)	İlk sırada karşılık gelen peptitler	Nispi yoğunluk (%)	Öngörülen domeyn/işlev
443R	AAK82303	237.22	8.10	15	0.3	-
295L	AAK82156	156.42	24.70	24.70	0.22	Bipartite nükleer lokalizasyon sinyali
179R	AAB94478	137.93	14.70	24	0.06	Varsayılan lipopolisakarit değiştirici enzim, tirozin protein kinaz
022L	AAD48148	135.34	32.20	34	0.20	Varsayılan nükleosid trifosfat I, DEXDc; DEAD-benzeri sarmal süper ailesi
261R	AAK82122	129.06	2.70	30	2.20	Potansiyel
209R	AAK82071	118.34	39.20	52	0.69	Serin/treonin protein kinaz
396L	AAK82256	111.28	21.90	29	0.16	Potansiyel tekrarlayan protein
268L	AAK82129	83.22	46.10	74	2.06	-
149L	AAB94464	76.41	36.60	72	0.91	-
232R	AAK82093	75.56	49.00	75	1.63	DNA polimeraz N-terminal domeyni
439L	AAK82299	63.45	12.10	8	0.02	Protein kinaz domeyni
361L	AAK82221	60.58	50.70	55	1.06	Kathepsin B
380R	AAK82240	59.91	54.50	73	2.05	Serin veya treonine özgü kinaz
213R	AAK82075	58.42	29.70	22	0.16	Varsayılan peptidoglikan bağlı protein
118L	AAB94444	55.29	55.10	65	1.77	Varsayılan zarf proteini
198R	AAK82060	52.15	42.60	26	0.32	-
274L	AAK82135	51.29	63.20	157	17.97	Başlıca yapısal protein
229L	AAK82090	50.64	22.30	15	0.25	-
337L	AAK82199	46.13	27.20	25	0.21	Fonksiyonu bilinmeyen Poxvirus proteini
159L	AAB94468	45.76	34.90	58	3.98	-
329R	AAK82190	42.74	28.80	16	0.29	-
219L	AAK82081	34.64	19.00	5	0.01	-
142R	AAB94459	33.64	33.60	16	0.25	dsRNA_spesifik ribonükleaz
457L	AAK82317	33.13	25.90	47	2.97	-
155L	AAB94465	29.81	39.20	23	0.40	-
401R	AAK82261	28.23	25.50	11	0.04	DNA bağlayıcı proteinlerin HMG_box süper ailesi
117L	AAB94443	27.45	29.70	43	0.93	-

Tablo 2'nin devamı

415R	AAK82275	26.66	63.20	70	1.34	-
309L	AAK82170	24.83	70.00	12	0.10	-
422L	AAK82282	22.73	49.50	19	0.20	<i>Cydia pomonella</i> granülovirüs ORF34
378R	AAK82238	22.21	47.70	12	0.10	2-sistein adaptör domeyni
355R	AAK82216	22.01	52.70	10	0.02	Ctd- benzeri fosfatazların katalitik domeyni
234R	AAK82095	21.09	62.70	63	3.07	-
111R	AAB94438	20.01	35.40	9	0.05	-
096L	AAB94430	19.69	33.30	11	0.05	Fasiklin domeyni
374R	AAK82234	19.12	22.40	3	0.00	Yarasa koronavirüs spike proteini
325L	AAK82186	18.91	24.50	5	0.08	-
203L	AAK82065	18.53	18.80	7	0.02	-
084L	AAB94426	18.40	25.50	15	0.04	-
061R	AAB94416	17.91	31.60	17	0.01	Lizozom ortak zar glikoproteinleri
123R	AAB94448	16.38	7.70	3	0.00	Çift özlü fosfatazlar
453L	AAK82313	15.91	26.10	12	0.05	Protein disülfid izomeraz
034R	AAK81969	14.63	16.40	5	0.03	-
366R	AAK82226	13.66	17.50	2	0.01	-
138R	AAB94455	13.03	16.70	7	0.02	-
312R	AAK82173	10.60	20.70	3	0.01	-

1.2.5. Konak Çeşitliliği ve Patoloji

Insecta sınıfında, IIV6'nın konukçu aralığı, altı takıma ait 100'den fazla tür içerir. *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera* ve *Orthoptera*, ordolarına mensup doğal konukçuları araştırılmıştır (Williams, 2008).

Omurgasız iridoviridlerinin (IIV) enfekte ettikleri konaklarında oluşturdukları iridescent renk, özellikle yağ dokusu başta olmak üzere hemen hemen tüm dokuların hücrelerinde parakristal yapıların varlığına bağlı olarak ortaya çıkan açık enfeksiyonlarla ilişkilendirildi (Hunter vd., 2003). Ağır derecede enfekte olmuş omurgasızların bu iridescent rengi, IIV enfeksiyonunun en bariz işaretidir (Williams, 1998). IIV6, *Drosophila line 2* (DL2), *Drosophila line 1* (DR1), *A. albopictus*, *Aedes aegypti*, *Anticarsia gemmatalis* (BCIRL-AG-AM), *Helicoverpa zea* (BCIRL-Hz-AM1), *Heliothis virescens* (BCIRL-HV-AM1), *Pieris rapae* (PR-5), *Plutella xylostella* (BCIRL-PX2-HNV3), *Spodoptera frugiperda* line 21 (Sf21), Sf9 ve *Trichoplusia ni* (TN-CL1) dahil olmak üzere on iki farklı böcek hücre hattında çoğaltılabilmektedir. Tüm bu hücrelerin enfeksiyona duyarlı olmasına rağmen, analizler, iki

Drosophila soyunun, DL2 ve DR1'in IIV6'ya karşı en yüksek duyarlılığa sahip olduğunu, *Aedes albopictus* ve *Plutella xylostella*'dan gelen hücre suşlarının ise dört kat daha az duyarlı olduğunu göstermiştir (Constantino vd., 2001). Bu hücrelerin tümünün genom dizisi analizleri yapılmıştır ve bu hücrelerin tümü gen bankasında bulunmaktadır.

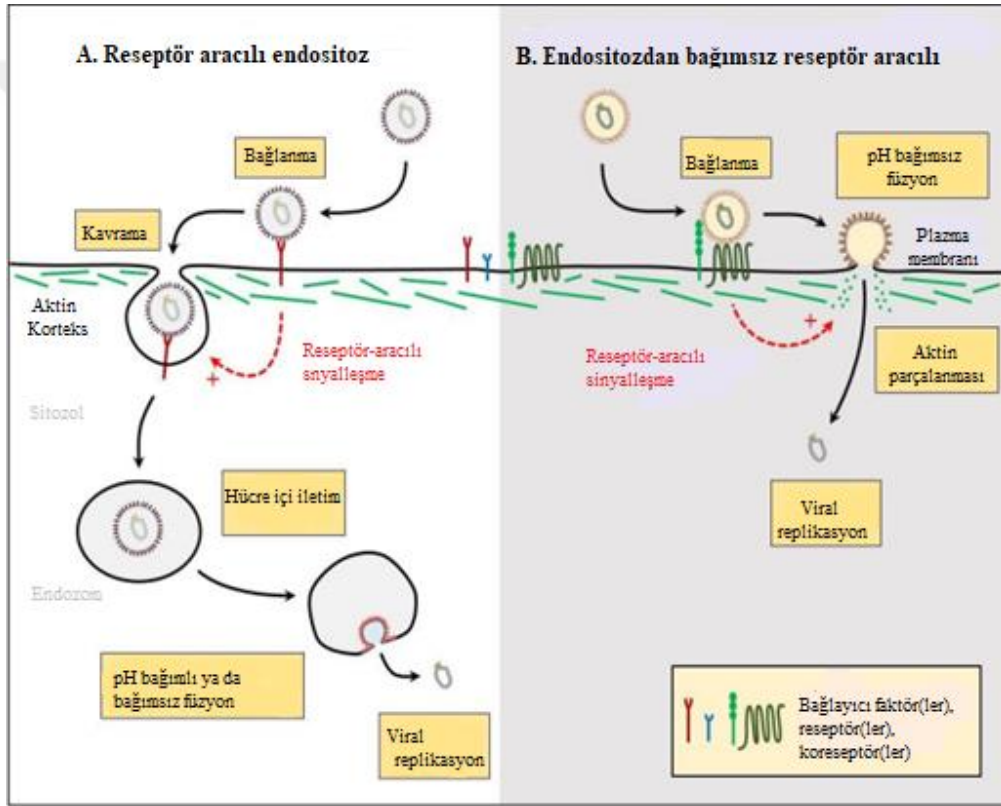
İlginç bir şekilde, IIV ile enfekte böceklerle beslenen sürüngenler ve amfibiler enfekte olmuş gibi görünmektedir (Just vd., 2001; Weinmann vd., 2007; Papp vd., 2014; Marschang, 2011; Stöhr vd., 2016). Laboratuvar koşullarında ve yüksek dozlarda bu omurgalılar IIV'lerle enfekte olabilseler ve öldürücülükte gözlemlenebilseler dahi doğal enfeksiyonlar nadiren semptomatik veya öldürücüdür. Bu da IIV replikasyonunun omurgalı konakçılarda daha sınırlı olduğunu ve konak bağışıklık sisteminin viral replikasyonu inhibe edebildiğini düşündürmektedir (İnce vd., 2018).

1.2. Virüslerin Konak Hücreye Girişi

Virüsler zorunlu hücre içi parazitlerdir ve virüslerin yaşam döngüleri, çoğalmalarını ve yayılmalarını teşvik etmek için tamamen hücresel işlevlerin ele geçirilmesine bağlıdır. Virüsün hücreye girişi, viral enfeksiyonun ilk adımıdır. Virüsün içeri alınmasına aracılık eden hücresel reseptörleri ve giriş yollarını karakterize etmek için birçok çalışma yapılmıştır (Boulant vd., 2015).

Virüslerin hücre yüzeyine bağlanması, viral nükleik asitin hücre sitoplazmasına verilmesine yol açan yayılımın ilk aşamasıdır. Zarflı virüslerde bu süreç, viral membran glikoproteinlerinin spesifik hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimiyle başlatılır. Virüslerin hem duyarlı hem de duyarlı olmayan hücrelerin yüzeyine tutunması gerçekleşse de (Piraino, 1967) viral penetrasyon, hedef hücre yüzeyinde aynı kökenli bir reseptörün ekspresyonunu gerektirir. Sonuç olarak, reseptör seçimi ve türler arasındaki yoğunluğu, bu reseptöre özgü virüsün konak aralığının belirlenmesinde büyük bir etkiye sahiptir. Ayrıca, bir organizmada reseptörü ifade eden hücrelerin doku dağılımı da viral patogenezi etkileyebilir (Schneider-Schaulies, 2000). Reseptör bağlanmasından sonra virüs enfeksiyonu, zarf glikoproteininin, viral ve hücre zarlarının füzyonuna ve viral genomun hücreye girmesine yol açan karmaşık bir dizi konformasyonel değişiklik yoluyla ilerler (Barnard ve Young, 2003).

Virüsler hücreye girmek için iki farklı strateji kullanabilir. Bunlardan ilki, klasik viral endositoz modelidir (Şekil 5A). Bu mekanizmaya göre, bir veya daha fazla hücresel reseptöre bağlanmayı takiben, virüs partikülleri, endositik hücresel mekanizma tarafından fiziksel olarak içeri alınır. İkinci stratejide ise hücresel reseptörlere virüs bağlanması, endositik mekanizmayı atlayarak virüs partiküllerinin plazma zarından doğrudan penetrasyonuna yol açar. Bu sürece endositozdan bağımsız reseptör aracılı giriş denir (Boulant vd., 2015) (Şekil 5B).



Şekil 5. Virüslerin konak hücreye giriş stratejileri. Konak hücrelerin sitoplazmasına erişmek için virüsler iki ana strateji kullanabilir. Bu stratejilerden biri (A) endositoz yoluyla ve reseptör aracılı endositoz olarak adlandırılan bir süreçte endozomal veziküller aracılığı ile olurken, diğeri ise (B) plazma zarından doğrudan penetrasyon yoluyla, endositozdan bağımsız reseptör aracılı giriş ile olur (Boulant vd., 2015).

1.4. Virüs-Reseptör Etkileşimleri

Yeni viral reseptörlerin tanımlanması ve virüs-reseptör etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması, virüs aracılı konakçı hücre istilasının ve viral hastalık sonuçlarının bilinmesine yönelik sunduğu katkılar sayesinde heyecan verici bir araştırma alanı oluşturmuştur. Ayrıca, virüslerin ve reseptörlerinin ayrıntılı moleküler etkileşimlerinin tanımlanması, yeni antiviral tedavilerin ve aşı teknolojilerinin geliştirilmesi için de önemli bilgiler sağlamıştır (Maginnis, 2018).

Hücresele reseptörü tanıma ve etkileşim, enfektif viral yaşam döngüsünde kritik bir ilk adımdır ve konak spektrumu, doku tropizmi ve viral patogeneze düzenleyici olarak önemli bir rol oynamaktadır (Grove ve Marsh, 2011).

Bilindiği üzere virüsler, enfeksiyöz bir yaşam döngüsü yürütmek ve nihayetinde yeni konak hücrelere yayılmak için konak hücre mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle virüsler, plazma zarını geçmek ve hücre mekanizmasına erişmek için bir veya daha fazla reseptöre bağlanabilecekleri çeşitli stratejiler kullanırlar. Viral bağlanma proteini (viral reseptör), konakçı hücre yüzeyindeki “kilit” (reseptör tanıma proteini) ile etkileşime girerek hücrelerin kilidini açan ve viral yaşam döngüsünü takip eden adımları başlatan “anahtar” olarak görülebilir (Maginnis, 2018). Viral reseptörler sadece bağlanma yapıları olarak değil, aynı zamanda giriş faktörleri, viral kaçakçılığın koordinatörleri ve sinyal olaylarının aktivatörleri olarak da işlev görürler. Çoğu durumda virüsler, viral yaşam döngüsü içinde farklı işlevleri yerine getirmek için birden fazla reseptör kullanırlar (Marsh ve Helenius, 2006).

Viral reseptörlerin bazıları kendi başlarına viral partiküllerin hücreye girişini tetikleme yeteneğine sahipken bazıları da viral partiküllerin hücreye girişinden sorumlu olan ikincil yüzey molekülleri ile etkileşime girerek viral partiküllerin hücreye girişini desteklerler (Boulant vd., 2015). Viral reseptörler ile etkileşimlere genellikle eksprese edilen spesifik viral bağlanma proteinleri aracılık eder. Viral yapıların şekil (ikosahedral veya sarmal) ve bileşimindeki (zarflı veya zarfsız) farklılıklar viral bağlanma proteinlerinin genel mimarisini etkiler (Maginnis, 2018). Zarflı virüslerin bağlanma proteinleri genellikle sivri uçlu olup viryonun yüzeyinden uzanırlar ve bağlanma proteininin plazma zarı üzerindeki reseptör ile ilk temas noktası olarak görev yaparlar (Grove ve Marsh, 2011). Zarfsız virüsler, poliovirüsler

(Neu vd., 2013) gibi uzantıları olmadan küresel olabilir veya reovirüsler (Guglielmi vd., 2006) gibi virion yüzeyinden uzanan viral proteinlerle dekore edilebilirler.

1.5. Hücre Yüzeyindeki Yaygın Viral Reseptörler

Viral reseptör ve hücre tutunma proteini arasındaki ilk etkileşimler çeşitlidir ve spesifik olmayandan oldukça spesifik olana kadar değişebilir. Çoğu durumda, virüs önce düşük afiniteli, yüksek aviditeli etkileşimle bir reseptöre bağlanır ve ardından yüksek afiniteli bir etkileşimle ikincil veya üçüncül bir reseptörle etkileşime girer (Yamauchi vd., 2013). Viral ve hücresele reseptör etkileşimleri viral doku tropizmi ve enfeksiyonunda önemli bir düzenleyici adım olduğundan, konakçı hücre ile ilk etkileşim, düşük veya yüksek afiniteli bağlanma olayı olup olmadığına bakılmaksızın detaylı şekilde incelenmektedir. Genel olarak, yüksek afiniteli reseptörlerle viral etkileşimler, düşük afiniteli bağlanma olaylarından sonra daha özelleşmiş bir reseptörle gerçekleşir (Dermoddy vd., 2009; Barton vd., 2001).

Virüs-reseptör etkileşimleri, viral bağlanma proteinlerindeki konformasyonel değişikliklere aracılık edebilir, girişte işlev görebilir veya virüsün enfeksiyöz yaşam döngüsü için gerekli olan sinyal yollarını aktive edebilir (Grove ve Marsh, 2011). Birçok virüsün konakçı hücrelerle ilk düşük afiniteli etkileşimleri, siyalillenmiş glikanlar veya sialik asitler (SA'lar) gibi karbonhidratlarla etkileşimleriyle gerçekleşir (Stencel-Baerenwald vd., 2014). Virüsler için tanımlanan hücresele reseptörlerin çoğu, hücresele adezyon molekülleri (CAM'ler) (Barton vd., 2001; Bergelson vd., 1997; Tomko vd., 1997; Bhella, 2015) ve fosfatidilserin (PtdSer) reseptör ailesi kategorisine dahil edilebilir (Morizono vd., 2011; Meertens vd., 2012; Moller-Tank ve Maury, 2014).

1.5.1. Sialik Asit (SA) Reseptörleri

Çeşitli virüslerin, konakçı hücre yüzeyine ilk bağlanmada SA reseptörleri ile etkileştiği gösterilmiştir. Bazı durumlarda, bu etkileşimler, viral yapının hücre içine alınması veya sinyal olaylarının aktivasyonu gibi virüs yaşam döngüsündeki ek adımları içerir (Neu vd., 2011; Stehle ve Khan, 2014). SA'lar, asparajin (N-) veya serin/treonin (O-) bağlantılı glikoproteinler ve glikolipidlerin glikan zincirlerini sonlandıran ve net negatif yüklü dokuz

karbonlu bir omurgaya sahip bir monosakkarit olan nöraminik asit türevleridir (Varki vd., 2009; Li ve Chen, 2012; Schauer, 2009). SA'lar, 2-karbon konumundan glikoprotein veya glikolipidin ana şeker zincirine kadar farklı bağlantılar yoluyla daha da çeşitlendirilir. En yaygın bağlantılar, α 2,3 veya α 2,6-bağlı SA olarak adlandırılan Gal veya GalNAc kalıntısına α 2,3- veya α 2,6- bağlanmasıdır. SA'lar ayrıca diğer Sia kalıntılarına da bağlanabilir ve bu da α 2,8 bağlantılı bir SA oluşturur (Varki vd., 2009). Gangliositler ise bir veya daha fazla SA içeren hücre dışı bir oligosakaritten ve plazma zarına gömülmüş bir zincirinden oluşan SA içeren glikosfingolipidlerdir (Maginnis, 2018) (Şekil 6).

Ökaryotik hücrelerin yüzeyindeki dallı SA yapılarının çok fazla ifadesi, çeşitliliği ve konumlandırılması, onları konak hücrelere patojen bağlanması için çekici bir hedef haline getirmektedir. Bu nedenle virüs-SA etkileşimleri, girişe aracılık eden ikincil proteinli reseptörlerle ek etkileşimlere yol açan ilk hücre teması noktası olarak hizmet edebilir veya SA, konformasyonel değişiklikleri ve sonraki füzyon olaylarını indükleyebilen tek reseptör olabilir (Grove ve Marsh, 2011; Stehle ve Khan, 2014).

1.5.2. Adezyon Molekülleri (CAM)

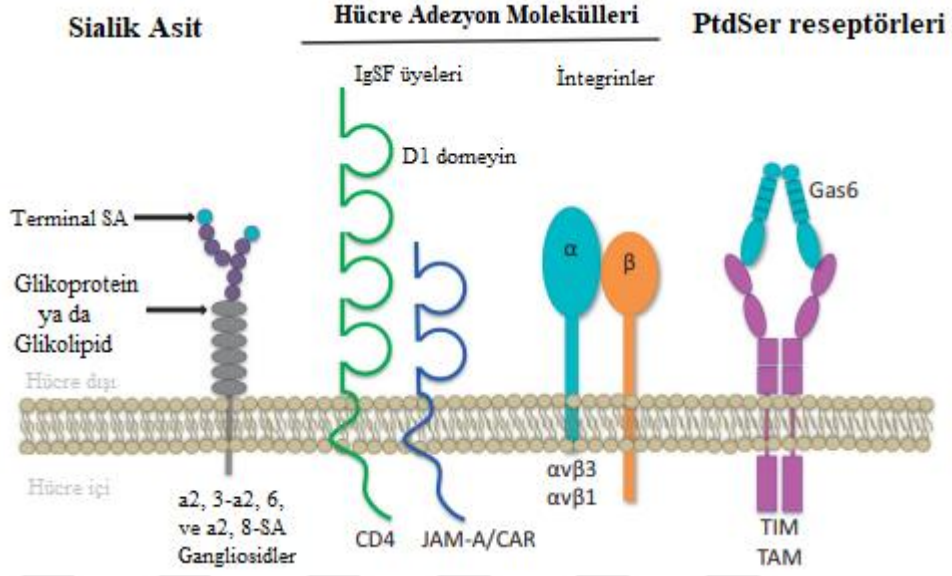
Bugüne kadar tanımlanan virüs bağlanma reseptörlerinin çoğu, hücreden hücreye ve hücreden hücre dışı matrise yapışmada işlev gören CAM'lardır (Şekil 6). CAM'ler gelişme, hücre yapının sürdürülmesi, hücre sinyali gibi hücresel süreçlerin temel araçlarıdır (Bhella, 2015; Farahani vd., 2014). CAM'ların ligand bağlama, endositoz ve sinyalleşmedeki her yerde bulunan ekspresyonu ve çok faktörlü işlevi, virüslerin CAM'larla birleşmesi için çok sayıda olasılık sağlar (Maginnis, 2018). CAM ailesi selektinleri, kadherinleri, integrinleri ve IgSF üyelerini içerir (Farahani vd., 2014). HIV (Maddnon vd., 1986), kızamık virüsü (Tatsua vd., 2000), reovirüs (Barton vd., 2001), adenovirüs (Bergelson vd., 1997), rinovirüs (Staunton vd., 1989) ve çocuk felci virüsü (Mendelsohn vd., 1989) gibi virüsler reseptör olarak hücre adezyon moleküllerinden biri olan IgSF (immünglobulin süper ailesi) üyelerini kullanır. Bir IgSF üyesi olan JAM-A hem memeli reovirüsü (Barton vd., 2001) hem de calicivirüs (Makino vd., 2006) için hücresel bir reseptördür. Bu homodimerik protein, iki monomer (Prota vd., 2003) tarafından oluşturulur ve D1 alanları arasındaki etkileşimler, bir dimer arayüzü oluşturur. İntegrinler, hücre adezyonu ve sinyal olayları dahil olmak üzere

çeşitli fonksiyonlara aracılık eden integral membran proteinleridir (Campbell ve Humphries, 2011). İntegrinler, α ve β olarak adlandırılan iki transmembran alt birimden oluşup hücre yüzeyinde heterodimerler olarak bulunurlar (Şekil 6).

CAM'lar, konakçı hücrenin viral istilasını mümkün kılan bağlanma, giriş, sinyalleşmeye veya çoklu adımlara aracılık etme işlevi görür. Örneğin; adhezyon proteinlerinden biri olan E-kadherin hepatit C virüsü için bir reseptör olarak kullanılır. Bu kullanım kronik karaciğer hastalığının önemli bir nedeni olduğu yakın zamanda gösterilmiştir (Li vd., 2016).

1.5.3. Fosfatidilserin (PtdSer) Reseptörleri

PtdSer normalde canlı hücrelerin plazma zarının iç kısmında ifade edilmektedir. T-hücresi, immüoglobülin ve müsin domeyni (TIM) ve TYRO3, AXL ve MERTK reseptör tirozin kinaz ailesi (TAM'lar) dahil olmak üzere PtdSer reseptörlerinin her ikisinin de (Şekil 6), çoklu virüs ailelerinden zarflı virüsler için reseptör görevi gördüğü gösterilmiştir (Moller-Tank ve Maury, 2014). PtdSer reseptörlerinin, pokvirüs ailesine ait olan vaksinya virüs (Mercer ve Helenius, 2008) ve Marburg virüs (MARV) (Kondratowicz vd., 2011) dahil olmak üzere bir dizi zarflı virüsün viral girişine aracılık ettiği rapor edilmiştir. Bu reseptör aileleri farklı olmakla birlikte tümü, zarflı virüslerin viral zarfı üzerindeki PtdSer'i tanır ve viral bağlanma, giriş ve/veya sinyal olaylarının aktivasyonuna aracılık eder (Meertens vd., 2012; Moller-Tank ve Maury, 2014; Bhattacharyya vd., 2013; Meertens vd., 2017).



Şekil 6. Yaygın viral reseptör sınıfları. Yaygın viral reseptörler, SA'lar ve SA gibi siyalillenmiş glikanları içerir. Gangliyozydler, CD4, JAM-A, CAR dahil olmak üzere IgSF üyeleri gibi CAM'lar ve $\alpha\beta3$ gibi integrinler ve PtdSer reseptörleri, hücre immüoglobulin ve müsin alanı (TIM) ve Tyro3, Axl ve Mer (TAM) reseptörleri. Virüs IgSF üyelerine bağlanmaya D1 alanı aracılık eder (Maginnis, M.S., 2018).

1.5.4. Heparan Sülfat ve Diğer Glikozaminoglikanlar

Glikozaminoglikanlar (GAG'ler) (heparan, kondroitin ve dermatan sülfat dahil), herpes simpleks virüsü (HSV), enterovirüsler, flavivirüsler gibi çeşitli virüslerin bağlanmasında geniş çapta yer alan negatif yüklü sülfatlanmış şekerlerdir (Evans, 2008).

1.5.5. Histo-Grup Antijenleri

HBGA'lar hem serbest oligosakkaritler olarak hem de mukozal epitelin yüzeyine yapışık olarak bulunan kompleks karbonhidratlardır. Virüsler tarafından bağlanmak için kullanılan protein olmayan moleküller, akut gastro enterite neden olan pozitif sarmallı RNA virüsleri olan noro virüsleri için reseptör görevi gören histo-kan grubu antijenlerini (HBGA'lar) de içerir (Evans, 2008).

1.6. Çalışmanın Amacı

Invertebrate iridescent virüs 6 (IIV6), biyoteknolojik kullanım potansiyeli olan önemli bir böcek virüsüdür. Virüsün konak spesifikliğı ve virülansı ile ilgili moleküler mekanizmaları anlamak için virüsün konak hücreye girişinde rol oynayan proteinlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Laboratuvarımızda daha önce yaptığımız çalışmalarda, virüsün konak hücreye girişinde 118L proteininin önemli bir rol oynadığını bulmuştuk. Bu tez çalışmasında ise IIV6'nın konak hücreye girişinde hücreye ait hangi protein veya proteinlerin rol aldığı belirlenmesi amaçlanmıştır. Virüsün taşıdığı önem göz önünde bulundurulduğunda, viral membran proteininin hangi hücresel protein ile etkileşime girdiğinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Tez kapsamında IIV6 'nın konağı olan *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) hücrelerine ait membran protein(ler)inden hangisinin virüs enfeksiyonunu başlatmak üzere virüse ait 118L proteini ile etkileşime girdiğı araştırılacaktır.

2. Yapılan Çalışmalar

2.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler

Ökaryotik hücre olarak *Spodoptera frugiperda* (Sf9) böcek hücre suşu kullanıldı. Prokaryotik hücre olarak *E.coli* DH10 β suşu klonlama aşamalarında, *E.coli* DH10Bac suşu bacmid DNA oluşturulmasında ve *E.coli* BL21-pLysS suşu da protein ekspresyonunda kullanıldı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Plazmid ve Kitler

Klonlama için pJET1.2 Blunt (Thermo) ekspresyon için pGEX-2T, transfeksiyon için pFastBackHTA plazmidini kullanıldı. Ayrıca çalışmada çok çeşitli kitler kullanılmıştır. Bunlar klonlamada kullanılan, pJET1.2 Blunt (Thermo) kiti plazmit izolasyonu için plazmit izolasyon (Fermentas) kiti, DNA'ları jelden temizlemek için Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma (Macherey-Nagel) kiti, ökaryotik ekspresyon için Bakülovirüs ekspresyon sistemi (Bac-to-bac, Invitrogen) kiti ve protein saflaştırmak için MagneHis™ Protein Purification System (Promega) kiti kullanıldı.

2.3. Membran Protein İzolasyonu

IIV6'ya ait potansiyel zarf proteini 118L'nin konak hücre membranında hangi protein ile etkileşime girdiğini belirleyebilmek için IIV6'nın replike olduğu *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinden membran protein izolasyonu yapıldı. Sf9 hücreleri, 28°C'lik inkübatörde %5 Fetal Bovin Serum (FBS, Sigma, Cat No: F-0643) içeren SF900II-SFM (Gibco, Cat No: 10902088) besi ortamında çoğaltıldı. Belli bir yoğunluğa ulaşan hücreler hemositometre lamında sayıldı. 4,26x10⁶ hücre/ml olarak sayılan Sf9 hücrelerinden Mem-PER™ Plus Membran Protein Ekstraksiyon kiti ve kitin içerisindeki prosedür kullanılarak membran protein izolasyonu yapıldı.

2.4. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Proteinlerin konsantrasyonunun belirlenmesi için Bradford'un (1976) geliştirdiği metot kullanıldı. Bradford standardının hazırlanması için sığır serum albümini (BSA, Promega) kullanıldı. Standart grafiği için 0, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 µg BSA içeren solüsyonlar ddH₂O ile 500 µl son hacme getirildi. Farklı BSA konsantrasyonlarını içeren çözeltilerden üç tekrarlı olacak şekilde 96 gözlü kaba aktarıldı. Örnekler, 37°C'de 15 dakika inkübasyondan sonra SpectraMax M2 (Molecular Devices) cihazı kullanılarak 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Membran proteinlerinin görüntülenmesi için SDS poliakrilamid jel elektrofrez metodu kullanıldı. Aynı anda birbirinin kopyası iki adet jel elektrofrez yapıldı. Bunun için membran protein örnekleri (bir kuyu için 40 µg) 2X muamele tamponu (2x Laemmli Sample Buffer, BioRad) (tampon ve örnekten 1:1 oranında olacak şekilde) ile karıştırıldıktan sonra örnekler 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Protein örnekleri %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi (Laemmli, 1970). Jeldeki proteinler 40 mA akım uygulanarak elektrofrez edildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jelin bir tanesi protein bantlarının görüntülenmesi için boyama işlemine tabi tutulurken diğer jel, hibridizasyon için kullanıldı. Boyama yapılacak jel, 2 saat fiksasyon çözeltisi (250 ml %99,5'lik izopropanol, 100 ml %100'lük Asetik asit, 650 ml ddH₂O) içerisinde bekletildi. Ardından 3 kez 5'er dakika ddH₂O ile yıkandı. Daha sonra Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %10 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı. Boyamanın ardından jel 3 defa 5'er dakika ddH₂O ile yıkandı. Jeldeki fazla boyayı uzaklaştırmak için jel, hızlı yıkama çözeltisi (250 ml %100'lük asetik asit, 200 ml %96'lık metanol, 2250 ml ddH₂O) içerisinde boya uzaklaştırılana kadar bekletildi.

2.6. Hücre Membran Proteinleri ile Viral Potansiyel Zarf Proteinini

118L'nin Hibridizasyonu

Virüse ait potansiyel zarf proteinini 118L'nin konağa ait hangi protein ile etkileşime girdiğini belirleyebilmek için hibridizasyon deneyi yapıldı. Laboratuvarımızda tamamlanan bir yüksek lisans tez çalışması (Yaylı, 2022) kapsamında, Invertebrate iridescent virüs 6 (IIV-6)'ya ait potansiyel bir membran proteinini kodlayan 118L ORF'si Bakülovirüs ekspresyon sisteminde (Bac-to-bac) eksprese edildi. Üretilen protein hibridizasyon işleminde kullanıldı. Hibridizasyon işlemi Sf9 hücrelerinin membran proteinleri ile yapıldı. Blotlama için 2.5.'de yapılan membran proteinlerine ait jellerden boyama yapılmayan kullanıldı. Jeldeki proteinler önce membrana aktarıldı ardından membrandaki proteinler, çözünür haldeki 118L proteini ile hibridize edildi.

Jeldeki proteinlerin membrana aktarılması yapıldı. Bunun için nitrocelülöz membran ve Whatman kağıtları jel boyutunda kesildi. 3 Whatman kağıdı elektroblotlama tamponu (48 mM Tris, 39 mM Glycine, %0,0375-w/v SDS) ve %20 metanol içeren solüsyonda ıslatılıp cihaza konuldu. Jel boyutunda kesilmiş nitrocelülöz membran %100 metanolde ıslatıldı ve whatman kağıtlarının üzerine yerleştirildi. Üzerine jel ve jelin üzerine de yine elektroblotlama tamponu ve %20 metanol içeren solüsyonda ıslatılan 3 Whatman kağıdı cihaza yerleştirildi. Bir saatlik blotlama işlemi sonunda membran PBS'de hazırlanmış %0,5'lik süt tozunda (1X PBS, 0,5 g süt tozu, %0,05'lik Tween 20) 2 dakika yıkandı. Daha sonra 2 saat yine PBS'de hazırlanmış %5'lik süt tozu (1X PBS, 5 g süt tozu, %0,05'lik Tween 20) içerisinde bloke edildi. Takiben 3 defa 5'er dakika %0,5'lik süt tozunda yıkandı.

Bu işlemlerin ardından membrandaki proteinler ile çözünür haldeki 118L proteininin hibridizasyonu aşamasına geçildi. Bu işleme, protein membran overlay deneyi de denilmektedir. Bunun için membran, 10 ml 1X PBS içerisinde çözünmüş 118L (80 µg) proteini ile +4°C'de 1 gece hibridize edildi. Hibridizasyon işleminden sonra membran %0,5'lik süt tozu ile 2 dakika yıkandı ve %5'lik süt tozunda 2 saat bekletilerek blotlama işlemi yapıldı. Takiben %0,5'lik süt tozunda 3 defa 10'ar dakika yıkandı. Daha sonra 1 gece anti-poly Histidine antikoru (1:1000 sulandırma) (Sigma, H-1029) içeren %0,5'lik süt tozunda oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve bu sürenin sonunda tekrar 3 defa 10'ar dakika %0,5'lik süt tozunda yıkandı. Ardından 1 saat Anti IgG-Alkalin Fosfataz antikoru

(1:1000 sulandırma) (Sigma, A-3562) içeren %0,5'lik süt tozu içinde oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Sonra %0,5'lik süt tozu içerisinde 3 defa 10'ar dakika takiben AP (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5, 1X) tamponu içerisinde 2 kez 10'ar dakika yıkama gerçekleştirildi. Bandın görünmesi için membran substrat (NBT/BCIP, Roche, 11681451001) içeren 10 ml AP tamponu içinde inkübe edildi. Renk gelişmeye başlayınca reaksiyon, membranın bolca ddH₂O ile yıkanması ile durduruldu.

Hibridizyan sonucunda açığa çıkan protein bandının konağa ait hangi protein olduğunun belirlenmesi için, coomassie ile boyanmış jelde karşılık gelen protein bandı kesilip mili-Q'lu su içerisinde LC-MS (Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi) analizi yapılması için Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi'ndeki Prof. Dr. Murat KASAP'a gönderildi.

2.7. LC-MS Sonuçlarının Biyoinformatik Analizleri

LC-MS analizi sonuçları, jelden keserek gönderdiğimiz protein bandının olası muhtemel proteinlerin isimlerinin ve olasılıklarının yer aldığı bir liste halinde elimize ulaştı. Bu sonuçlar değerlendirildi ve muhtemel proteinlerden deney sonucu elde edip sekanslamaya gönderdiğimiz proteinin ağırlığına karşılık gelebilecek ve en yüksek skorlara sahip olan proteinler belirlendi. Bu proteinler NCBI veri tabanında *Spodoptera frugiperda*'nın genomu ile Protein-BLAST analizi yapıldı. BLAST sonucu 118L proteini ile hibridize olabileceği düşünülen *S. frugiperda*'ya ait Eukaryotic translation initiation factor 3 (EuTIF3), Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER94), Eukaryotic translation elongation factor 2 (TEF2) ve Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum (ctATPser) isimli dört farklı protein tespit edildi.

2.8. Protein-Protein Docking

Protein-BLAST sonucu belirlenen ve 118L ile hibritleşmiş olması muhtemel *S. frugiperda*'ya ait dört farklı proteinin in silico olarak 118L ile etkileşimlerini görebilmek için protein-protein docking çalışması yapıldı. Bu işlem için öncelikle IIV6'ya ait 118L'de dahil olmak üzere hibritleşmiş olması muhtemel *S. frugiperda* proteinlerinin üç boyutlu yapıları AlphaFold ve ColabFold programı kullanılarak oluşturuldu. HADDOCK v2.4 programı

kullanılarak konağa ait muhtemel dört farklı protein ile virüse ait 118L proteininin üç boyutlu yapılarının etkileşimlerine bakıldı. Docking sonucunda 118L ile en iyi etkileşim gösteren protein (TER94) ile çalışmaya devam edildi.

2.9. Böcek Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Konağa ait belirlenen proteininin 118L ile etkileşimi *in silico* olarak teyit edildikten sonra, bu etkileşimin *in vitro* olarak da gösterilebilmesi elde edilen sonucu daha da kuvvetlendirecektir. Bunun için de belirlenen genin çoğaltılması, proteininin ekspresyonu, saflaştırılması ve 118L ile etkileşimlerinin *in vitro* ortamda pull-down analizi ile gösterilmesi işlemleri yapılacaktır.

Belirlenen proteine ait genin çoğaltılması için mRNA'ya ihtiyaç vardır. Bu nedenle önce *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Önceden T25 flask içinde %5 FBS içeren Sf-900 SFM (Gibco ®) besiyerinde büyütülen Sf9 hücrelerinden 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde 5 ml hücre alındı. Hücreler 15 ml'lik tüpe aktarıldı. 10 dakika 1000 x rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan hücre pelleti 500 mikrolitre Trizol içinde çözüldü. Karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Karışıma 100 µl kloroform eklendi. Nazikçe alt-üst edilip yine oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Karışım bu süre sonunda 12000 x g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda iki faz oluştu. RNA'ların olduğu üst faz dikkatli bir şekilde alınıp yeni bir tüpe aktarıldı. Alınan faza 250 µl izopropanol eklendi ve alt-üst edilip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. 12000 x g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 500 µl %70'lik ethanol içerisinde 8000 x rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Oluşan RNA pelleti, ethanolü uzaklaştırmak için oda sıcaklığında 10-15 dakika kurutuldu. Pellet 50 µl RNaz içermeyen steril ddH₂O'da çözüldü. İzole edilen RNA'ları çözünür hale getirmek için 10 dakika 55°C'de bekletildi. RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu nanodropla tespit edildi.

2.10. Reverse Transkripsiyon-PCR (RT-PCR)

Sf9 hücre hattından izole edilen total RNA'dan belirlediğimiz hücresel gene (TER94) özgü cDNA oluşturmak için revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) yapıldı. Bunun için 2 µg total RNA, 1,5 µl genin mRNA sekansına özgü tasarlanmış geri yöndeki primer (Tablo 2) bir araya getirilerek ddH₂O ile 15 µl hacme tamamlandı. Karışım 70°C'de 5 dakika bekletildi ve ardından buza bırakıldı. Reaksiyona M-MLV 5X tamponundan 5 µl, dNTP (10 mM) karışımından 1,5 µl ve M-MLV RT (200 ünite/µl) enziminden 1 µl eklendi ve hacim nükleaz içermeyen ddH₂O ile 25 mikrolitreye tamamlandı. Reaksiyon 42°C'de 1 saat bekletilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3. TER94 genine ait primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')
mRNA Trans-R	5'-TTAGCTGTACAGGTCGTCGTCGCCGCCCTCC3'
Trans-Fw	5'-GGATCCGGCAGATAGTAAAGGTAATCC-3'
Trans-Rv	5'- <u>AGGCCT</u> TTAGCTGTACAGGTCGTCG-3'

*Enzimler için restriksiyon bölgeleri kalın harflerle belirtilmiştir. BamHI, kalın harflerle, StuI, kalın ve altı çizili harflerle gösterilmiştir.

Tek zincirli olarak sentezlenen konak genine ait cDNA'yı klonlanabilmesi için öncelikle bu cDNA'yı çift zincirli hale getirmemiz gerekmektedir. Bunun için de tek zincirli cDNA kalıp olarak kullanılarak gene özgü tasarlanan ileri ve geri primerler ile PCR yapıldı. Reaksiyon içeriği aşağıdaki gibi hazırlandı.

<u>PCR Reaksiyonu</u>		<u>PCR Döngüsü</u>	
Reaksiyon bileşenleri	Miktarları		
5X Green Tampon	10 µl		
MgCl ₂ (50mM)	2.5 µl (2.5 mM)	95 °C →	1 dk
dNTP	1 µl (10 µM)	95 °C →	0.50 sn
İleri Primer	1 µl (10 µM)	58 °C →	1 dk
Geri Primer	1 µl (10 µM)	72 °C →	3 dk
Kalıp cDNA	9 µl (<0.5µg/50µl)	72 °C →	2 dk
GoTaq DNA polimeraz	0.25 µl (1.25 u)	4 °C →	∞
ddH ₂ O	25.25 µl		

} X35
döngü

PCR reaksiyonu sonucu çoğaltılan DNA fragmentleri %1 yoğunluktaki agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi. Jelde istenilen boyutta görülen DNA fragmentleri jelden kesilip Nucleospin Extract II DNA Saflaştırma kiti jelden temizlendi.

Gene ait DNA fragmenti pJET1.2 Blunt klonlama vektörüne 3 DNA fragmenti: 1 vektör oranında (0.3 µg DNA fragmenti ve 0.1 µg pJET1.2 blunt) klonlandı. PCR reaksiyonu için kullanılan Go-taq polimeraz enzimi özelliği itibariyle DNA fragmentinin 3' ucuna sarkık poli A kuyruğu eklediğinden dolayı klonlamadan önce PCR ürünü küt uçlu hale getirildi. Klonlama için hazırlanan ligasyon reaksiyonu aşağıdaki gibi oluşturuldu.

<u>Ligasyon bileşenleri</u>	<u>Miktarlar</u>
2X reaksiyon tamponu	10 µl
Blunting enzim	1 µl
PCR ürünü	4.5 µl
pJET1.2 Blunt	1 µl
T4 DNA ligaz	1 µl
ddH ₂ O	3.5 µl

2.11. Kompetent Bakteri Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

Ligasyon reaksiyonunu transform etmek için kompetent hücelere ihtiyaç vardır. Bunun için *Escherichia coli* DH10 β hücreleri kullanıldı. Kompetent hücre hazırlamak için Luria Bertani (LB) Agar besiyerinde büyütülmüş *E. coli* DH10 β hücrelerinden koloni alınıp LB Broth besiyerine aşılama yapıldı ve hücreler 37°C'de 200 x rpm'de 16 saat büyütüldü. Kompetent hücre hazırlamak için CaCl₂ metodu kullanıldı. İnkübasyon sonrası LB Broth besiyeri ile 1/10 oranında seyreltilen gece kültürünün absorbansı spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüldü. 30 ml LB Broth ortamı içerisine 0.1 optik yoğunlukta (OD) olacak şekilde bu gece kültürü ortamından aşılama yapıldı. OD'si 0.4-0.5'e ulaşana kadar yaklaşık 1,5 saat boyunca 37°C, 200 x rpm'de inkübe edildi. Kültür daha sonra 50 ml'lik tüpe aktarıldı ve 4500 x rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve pellete 10 mililitre 100 milimolar soğuk CaCl₂ ilave edilip pellet hafifçe çalkalanarak bu solüsyon içerisinde çözüldü ve karışım 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Tekrar 4500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 mililitre soğuk CaCl₂ ile yavaşça çalkalanarak çözüldü. Bu şekilde hazırlanan kompetent hücreler kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edildi. Kompetent *E.coli* DH10 β hücrelerinden 100 μ l alınıp steril ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine ligasyon ürününden 3 μ l eklenerek iyice karıştırıldı ve 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Sonraki işlemde karışım 42°C'de 2 dakika şoklanıp buz üzerine alındı. Tüpün üzerine 1 ml LB Broth besiyeri eklendi ve 37°C'de 200 x rpm' de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültür 6000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Geride 100 mikrolitre kalacak şekilde üst sıvı döküldü ve pellet kalan sıvı içinde çözüldükten sonra 50 μ g/ml ampisilin içeren LB Agar petrisine yayıldı. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

2.12. Rekombinant Plazmitlerin Belirlenmesi

Transformasyon sonucu petride oluşan kolonilerin hedef geni içerdiğini teyit etmek amacıyla kolonilerden kültür yapılması, bu kültürlerden plazmid izolasyonu ve plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi işlemleri yapılacaktır.

Bunun için kolonilerden 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine inokülasyon yapıldı ve kültürler 37°C'de 200 x rpm'de 16 saat inkübe edildi. Plazmid DNA izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14000 x rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant geride yaklaşık 50 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve çöktürülen kalan sıvı içerisinde vorteksenerek çözüldü. Üzerlerine 300 µl TENS tamponu ilave edildi ve 5-6 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. Bir sonraki adımda karışımların üzerlerine 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edilip tekrar 5-6 kez alt-üst edilerek karıştırıldı ve 10 dakika boyunca buz üzerinde (her beş dakikada bir alt-üst edilip karıştırılarak) bekletildi. 14000 x rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve üzerlerine 900 µl %100'lük etanol eklenerek 3 dakika 14000 x rpm'de santrifüj edildi. Pelletler 500 µl %70'lik etanol ile 14000 x rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek yıkandı ve 37°C'de etüvde 10 dakika bekletilerek kurutuldu. Kuruyan plazmit pelletleri 30 µl TE tamponunda (0.1 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA) çözüldü.

İzole edilen plazmid DNA'larının klon olup olmadığını tespit etmek için bu plazmid DNA'ları gene ait primerlerin 5' uçlarına eklenen restriksiyon endonükleaz enzimlerinden biri ile muamele edildiler. Bunun için 10 µl plazmid DNA'sı, 1 µl *StuI* (Thermo), 2 µl enzime ait reaksiyon tamponu ve 4 µl RNaz'lı ddH₂O bir araya getirilerek 20 µl'lik reaksiyon hazırlandı ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler enzim inaktivasyonu için 65°C'de 10 dakika bekletildi. Ardından %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı ve hedef geni taşıyan rekombinant plazmitleri içeren klonlar tespit edildi. Bu gende PCR kaynaklı herhangi bir mutasyon olup olmadığını belirlemek için genin dizi analizi yapıldı. Geni içerdiğini restriksiyon enzim muamelesi ile doğruladığımız iki klondan plazmit izolasyon kiti kullanılarak ve kitin önerdiği prosedüre göre plazmid DNA'ları izole edildi. Plazmidler dizi analizi yaptırılmak üzere MacroGen firmasına (Hollanda) gönderildi. Analiz sonucunda elde edilen nükleotit sırası gen bankasındaki bu gene ait sıralar ile NCBI web adresindeki Blast programı kullanılarak karşılaştırıldı.

2.13. cDNA'nın Ara Transfer Vektörüne (pFastBacHTA) Klonlanması

TER94 genine ait cDNA'yı pJET1.2 vektöründen primerlerin uçlarına bıraktığımız enzimler ile kesip alarak aynı enzimler ile kesilmiş transfer vektörü pFastBacHTA'ya yerleştirmemiz gerekmektedir. Bunun için TER94 cDNA'sının klonlandığı pJET1/2 vektörünü içeren *E.coli* DH10 β hücrelerinden ve pFastBacHTA vektörünün bulunduğu *E.coli* DH10 β hücrelerinden LB besiyerine (+50 μ g/ml ampisilin) ekim yapıldı ve 37°C'de 200 \times rpm'de 16 saat inkübe edildi. Büyüyen kültürler 14000 x rpm'de 2 dakika çöktürüldükten sonra bu hücre pelletlerinden plazmid izolasyonu yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmit DNA'lardan 500 ng, 1'er μ l *Bam*HI ve *Stu*I restriksiyon enzimleri ve her bir enzime ait 2'şer μ l 10X reaksiyon tamponu bir araya getirilerek toplam 30 μ l'lik hacimde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyonlar enzim inaktivasyonu için 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. pJET1.2 Blunt vektöründen restriksiyon enzimleriyle kesilerek ayrılmış olan TER94 gen bölgesi agaroz jelden kesilerek alındı. Yine aynı restriksiyon endonükleazlarla lineer hale getirilen pFastBacHTA vektörü jelden kesilerek alındı. Her iki DNA fragmanı DNA temizleme kiti kullanılarak jelden temizlendi. İlgili enzimlerle kesilen TER94 genine ait DNA ve pFastBacHTA vektörü 3 vektör: 1 DNA oranında bir araya getirilerek aşağıda belirtildiği gibi ligasyon reaksiyonu hazırlandı.

Ligasyon Reaksiyonu

<u>Reaksiyon bileşenleri</u>	<u>Miktarları</u>
10X T4 DNA Ligaz Tamponu	2 μ l
T4 DNA Ligaz	1 μ l (5u/ μ l)
İnsert (TER94)	2.5 μ l (27 ng/ μ l)
Vektör (pFastBacHTA)	0.7 μ l (73 ng/ μ l)
ddH ₂ O	13.8 μ l

Reaksiyon 45 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4°C’de gece boyu bekletildi. Ligasyon ürününün transformasyonu 2.11.’de açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Yine 2.12.’de açıklandığı gibi transformasyon sonucu oluşan kolonilerden TER94 genini içeren rekombinant pFastBacHTA plazmitinin seçilmesi gerçekleştirildi.

2.14. TER94 Geninin Bac-To-Bac® Bakülovirüs Ekspresyon Sisteminde ifadesi

TER94 geninin ökaryotik bir sistemde ifadesini gerçekleştirmek için bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi (Bac-to-Bac) kullanıldı. Genin bu sistemde ifadesi Şekil 7’de gösterilmektedir.

2.14.1. *E.coli* DH10Bac Kompetent Hücrelerinin Hazırlanışı

Hazırlanan ara transfer vektörünün bakülovirüs sistemine aktarılması için *E.coli* DH10Bac bakteri hücreleri kullanıldı. Bu hücreler özel hücrelerdir ve transpozisyon için gerekli enzimin kaynağı olan yardımcı plazmide ve bakteriyal replikasyon orijinine sahip *Autographa californica* multi nükleopolihedrovirüs (AcNPV) viral DNA’sına (bakmid) sahiptirler.

Transformasyon işlemi için önce *E.coli* DH10Bac hücreleri kompetent hale getirildi. Bunun için LB agar ortamında büyütülmüş olan bu hücrelerden alınıp kanamisin (50 µg/ml) ve tetrasiklin (10 µg/ml) içeren 3 ml LB besiyerinde 16 saat büyütüldü. Ertesi gün bu kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C’de 600 nm dalga boyunda yoğunlukları 0.6-0.9 olacak şekilde büyütüldü. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler 15 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4°C’de 4000 × rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldü ve pellet 1 ml soğuk CaCl₂ (100 mM)’de çözülerek aynı CaCl₂ solüsyonuyla hacmi 10 ml’ye tamamlandı. Karışım buz içerisinde 1.5 saat bekletildikten sonra 4°C’de 4000 × rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet 1 ml %15 gliserol içeren 100 mM’lık CaCl₂ solüsyonunda çözülerek 100’er µl şeklinde ependorf tüplere dağıtılıp -80°C’ye kaldırıldı.

2.14.2. Rekombinant pFastBacHTA Vektörünün *E.coli* DH10Bac Kompetent Hücrelerine Transformasyonu ve Transpozisyonu

Önceden hazırlanmış 1,5 ml'lik tüplerde bulunan 100'er µl iki adet DH10Bac kompetent hücre tüpü alındı. Bir tüpe 0.8 µl (200 pg) rekombinant vektörden ilave edildi. Diğer tüpe hiçbir şey eklenmeyip kontrol amaçlı kullanıldı. Her iki tüp buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra tüpler 45°C'de 45 saniye tutularak ısı-şok işlemi gerçekleştirildi ve ardından buz içerisine alınıp 2 dakika soğutma işlemi uygulandı. Tüplere 900 µl LB besiyeri eklendi ve 37°C'de 225 × rpm'de 4 saat inkübe edilerek transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu süre sonunda hücreler, gentamisin (7 µg/ml), kanamisin, tetrasiklin, IPTG ve X-Gal içeren besiyerinde 48 saat büyütüldü. İnkübasyon sonucu oluşan beyaz koloniler, yine aynı içeriğe sahip besi ortamına, kolonilerin tamamen saf ve beyaz renkte olduğundan emin olmak için çizgi ekim yapıldı ve 48 saat 37°C'de inkübe edildi.

2.14.3. Rekombinant Bakmid DNA'ların İzolasyonu ve PCR ile Doğrulanması

Beyaz fenotipe sahip koloniler kanamisin, tetrasiklin ve gentamisin içeren 2 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi. Hücreler 37°C'de 225 × rpm'de 16 saat büyütüldü. Kültürlerin 1.5 ml'lik kısmı 14000 × rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Pellet kısmı 300 µl Solüsyon I (15 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNaz A)'de hafif vorteks yapılarak çözüldü ve üzerine 300 µl Solüsyon II (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklenerek karıştırıldı. Karışım hücrelerin liziz olması için oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Üzerine 300 µl 3M Potasyum asetat (pH 5.5) ilave edilerek karıştırıldı. Örnekler buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra 14000 × rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı içerisinde 800 µl izopropanol içeren tüplere aktarıldı ve tüpler alt-üst edilerek 10 dakika buzda bekletildi. 14000 × rpm'de 15 dakika santrifüj edilip üst sıvı dikkatli bir şekilde döküldü. Tüplere 500 µl etanol (%70) ilave edilip alt-üst edildi ve 14000 x rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Süpernatant döküldü ve pelletler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra pellet halindeki bakmid DNA 40 µl TE tamponunda çözülüp +4°C'ye kaldırıldı.

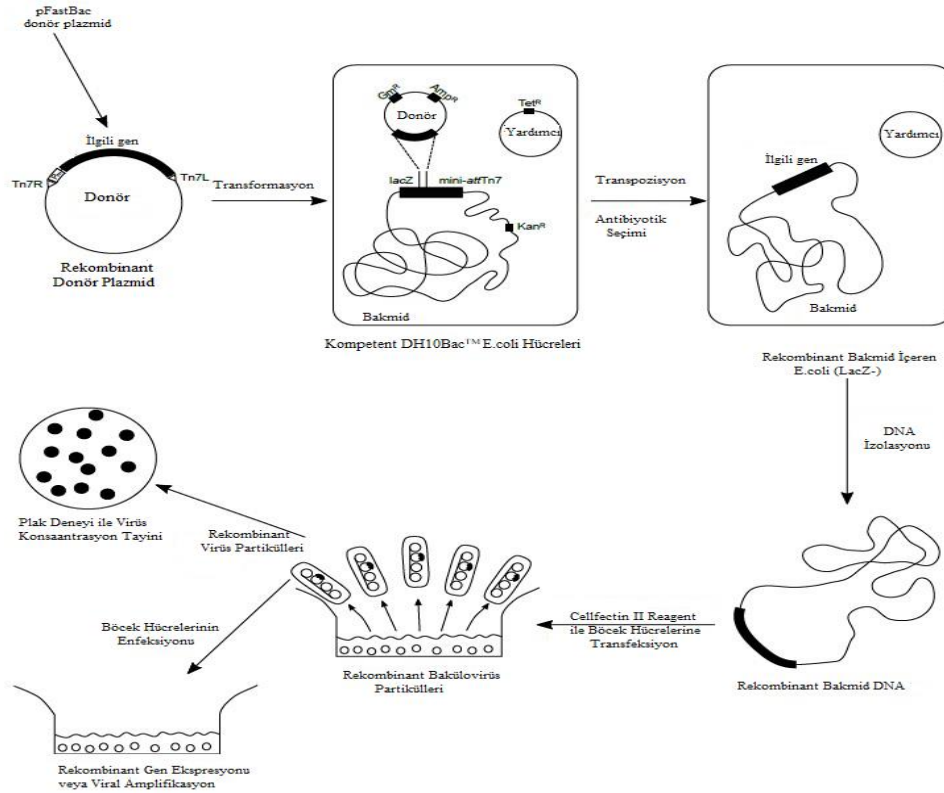
Bakmid DNA'ların TER94 genini içerip içermediği PCR ile analiz edildi. Bunun için M13Fw - M13Rv primer çifti ve M13Fw - GentaRv primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Doğruluğu teyit edilen klonlardan bir tanesi seçildi ve bu transfeksiyon işleminde kullanıldı.

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

Sf9 hücrelerinden her bir gözde 2×10^6 hücre olacak şekilde 6 gözlü hücre kültür kaplarına bırakıldı ve hücrelerin tabana tutunması için 28°C 'de 2 saat bekletildi. 200 pg rekombinant bakmid DNA ile 100 μl katkısız Grace's Insect Medium (Gibco®) karıştırıldı. Diğer taraftan 8 μl Cellfectin® Reagent (Invitrogen) ile 100 μl katkısız Grace's Insect Medium homojen bir şekilde karıştırıldı ve bu iki solüsyon polystyrene tüpte birbirine karıştırılıp 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir alt-üst edilerek oda sıcaklığında bekletildi. 6 gözlü kaptaki tutunan hücreler, üzerinde 2 ml katkısız Grace's Insect yavaşça gezdirilerek yıkandı. Diğer yandan polystyrene içinde bulunan Lipid-DNA karışımının üzerine 800 μl katkısız Grace's Insect eklendi, nazikçe karıştırıldı ve yikanan hücrelerin üzerine yavaşça ilave edildi. Hücreler bu şekilde 28°C 'lik etüvde 5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası transfeksiyon sıvısı hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve üzerlerine %5 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren 2 ml Sf-900™ II SFM (Gibco®) besiyeri eklendi. Hücreler 72 saat 28°C 'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan rekombinant virüslerin eldesi, hücrelerin toplanması ve $500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmesi ile gerçekleştirildi. Elde edilen üst sıvı, A1 viral stok olarak adlandırıldı. A1 viral stoğun konsantrasyonunu arttırmak için bu viral stok kullanılarak tekrardan enfeksiyon yapıldı ve çoğaltılan rekombinant virüsler toplandı. Bu virüsler A2 stoğu olarak adlandırıldı. T75 flasklere bırakılan 9×10^6 hücre A2 viral stoktan 500 μl kullanılarak enfekte edildi. 28°C 'de inkübasyona bırakılan enfekteli hücreler 3 günün sonunda toplandı ve rekombinant bakmid DNA'ları taşıyan bakülovirüsleri içeren süpernatant kısmı bir sonraki enfeksiyonlarda kullanılmak için $+4^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

2.14.5. TER94 Proteininin Hücre Kültüründe Üretilmesi

İlgili gene ait proteini hücre kültüründe üretmek için öncelikle Sf9 hücreleri T75 flasklere 9x10⁶ hücre/flask olacak şekilde bırakıldı. Bu hücreler 2.13.4.'de anlatılan çoğaltılmış rekombinant bakülovirüsler ile enfekte edildi. 2 ml hacimde olacak şekilde hazırlanan enfeksiyon sıvısı T75 flasklerde bulunan hücrelerin üzerine yavaşça ilave edilip 2.5 x rpm hızda 2 saat sallandı. Virüslerin hücrelere tutunması sağlandıktan sonra flasklere %5 FBS içeren Sf-900 II SFM besiyeri ilave edilerek son hacim 10 ml'ye tamamlandı. Enfeksiyonlar 28°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler besiyeri ile birlikte toplandı ve 4°C'de 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücrelerin oluşturduğu pelletten SDS-PAGE yapmak için bir miktar alınarak 2.5 ve 2.6'da anlatıldığı gibi protein jeli yapıldı ve westen blot analizi ile beklenen proteinin üretildiği teyit edildi. Hücrelerin geri kalanı ise diğer deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.



Şekil 7. Bac-to-Bac ekspresyon vektör sistemi.

2.15. 118L Proteininin Bakteriyal Sistemde Üretilmesi

118L proteininin ifadesi için mikrobiyoloji laboratuvarında daha önceden klonlanmış olan pGEX-2T/118L vektörü (Özşahin, 2016) kullanıldı. Genin ifadesi için *E. coli* BL21-pLysS suşu kullanıldı. Bunun için ilk önce BL21-pLysS hücreleri kompetent hale getirildi.

2.15.1. *E.coli* BL21-pLysS Kompetent Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

E.coli BL21-pLysS hücreleri 2.11 numaralı başlık altında anlatıldığı şekilde kompetent hale getirildi. pGEX-2T/118L vektörü bu hücrelere transform edildi. Bunun için hazırlanan kompetent hücrelerden 200 µl alındı ve üzerine pGEX-2T/118L vektöründen 5 µl eklenip 2.11’de belirtildiği gibi vektörün hücrelere transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonucu oluşan hücreler 50 µg/ml kanamisin içeren LB Agar petrilere yayıldı. Gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

2.15.2. Protein İfadesi

pGEX-2T vektörünü içeren *E.coli* BL21-pLysS hücrelerinden tek bir koloni alınarak 50 µg/ml kanamisin içeren 2 ml LB besiyerine aşılama yapıldı ve 37°C’de 225 × rpm’de gece boyu inkübe edildi. Büyütülen kültürden 50 µg/ml kanamisin içeren LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 600 nm’de OD değeri 0.6-0.8 oluncaya kadar 37°C’de 140 × rpm’de büyütüldü. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra ortama 1mM olacak şekilde IPTG ilave edildi ve böylece protein ekspresyonu indüklendi. Ekspresyon düşük sıcaklık (25°C) ve düşük rpm’de (140 x rpm) 5 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler 4500 × rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Protein üretiminin gerçekleştiğini teyit etmek için pelletten bir miktar alınarak 2.1.2’de belirtildiği gibi SDS-PAGE yapıldı ve jel Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyandı. Pelletin geri kalanı diğer işlemlerde kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

2.16. Pul-down Analizi

His-TER94 ve GST-118L proteinlerinin ifade edildikleri doğrulandıktan sonra, daha önce elde ettiğimiz ve ifade edilen proteinleri içeren 5 ml'lik hücre solüsyonları 6000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek oluşan pelletler ayrı ayrı tüplerde 500'er µl PBS (Phosphate buffered Saline, 1X) içerisinde çözüldüler. Hücreler sonikasyon işlemi ile patlatıldı ve ardından 6000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. His-TER94 ve GST-118L'nin üretildiği hücrelerin süpernatantlar biraraya getirildi. Karışım 3 saat +4°C'de yavaşça sallandı. Bu karışımdan histidin kuyruğu aracılığı ile protein saflaştırıldı. Çözünebilir lizatlardan TER94 proteini saflaştırıldı. Her bir 1 ml örnek için 30 µl Ni boncuk eklendi ve proteinin bu boncuklara bağlanması için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Magnetik standa konulan Ni partiküllerinin çekilmesi sağlandı ve sıvı kısım boncuklardan uzaklaştırıldı. 500 mM NaCl içeren Yıkıma/Bağlama tamponuyla Ni partikülleri süspanse edilip tekrar Magnetik standa konularak yıkandı. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Örneğe 150 µl çözücü tamponu eklenip 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar standa yerleştirilip protein içeren sıvı kısım alındı. Örnekten 20 µl alınıp %10'luk SDS-PAGE'de yürütüldü ve His-taq kuyruk ile saflaştırılan TER94 proteini ile 118L proteininin de birlikte saflaştığını görüntüleyebilmek için GST kuyruğuna özgü antikorlar kullanılarak western blot hibridizasyonu yapıldı. Western blot işlemi 2.6'da belirtildiği gibi yapıldı.

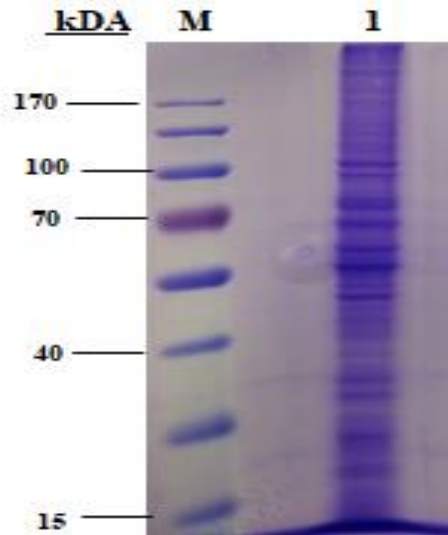
3. BULGULAR

3.1. *Spodoptera Frugiperda* (Sf9) Hücrelerinden Membran Protein İzolasyonu

Spodoptera frugiperda (Sf9 hücreleri, 28°C 'de %10 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren SF900II-SFM besi ortamında çoğaltıldı. Kültür kabının tabanını dolduran hücreler hemositometrede sayıldı ve $4,26 \times 10^6$ hücre/ml olarak sayılan Sf9 hücrelerinden membran protein izolasyonu yapıldı. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu Bradford metodu temel alınarak hazırlanan BSA standardına göre belirlendi ve konsantrasyon 1700 µg/ml olarak belirlendi.

3.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

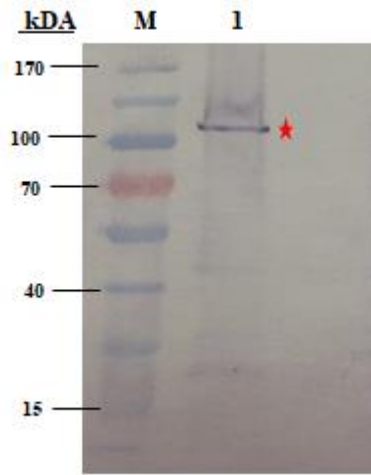
Sf9 hücrelerinden izole edilen membran proteinleri SDS-PAGE'ne tabi tutuldu. Proteinler jel üzerinde Coomassie Brilliant Blue boyası ile görüntülendi (Şekil 8).



Şekil 8. Sf9 hücrelerine ait membran proteinlerin Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış SDS-PAGE jelindeki görüntüsü. M, marker (prestained, Thermo); 1- Sf9 membran proteinleri

3.2. *Spodoptera Frugiperda* (Sf9) Hücre Membran Proteinleri ile Viral 118L Proteininin Hibridizasyonu

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)'ya ait bir membran proteinini kodladığı düşünülen 118L ORF'si Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde ifade edildi. İfade edilen 118L proteini, nitroselüloz membrana aktarılmış Sf9 hücre membran proteinleri ile hibridize edildi. Membran sonucunun görüntülenmesi 118L proteininin sonuna eklenmiş histidin kuyruğuna bağlanabilen ve alkalın fosfataz enzimi ile işaretli antikor kullanılarak yapıldı. Hibridizasyon sonucunda IIV-6'ya ait 118L proteinin Sf9 hücre membran proteinlerinden yaklaşık 110 kDa'luk bir protein ile hibridize olduğu tespit edildi.



Şekil 9. Sf9 hücre membran proteinleri ile 118L proteininin hibridizasyonu. M, marker (prestained Thermo); 1- 118L proteininin hibridize olduğu membran proteini.

3.3. LC-MS Sonuçlarının Biyoinformatik Analizleri

Spodoptera frugiperda membran proteinleri ile IIV6 118L proteininin hibridizasyonu sonucu belirlenen banta karşılık gelen membran proteini, comassie ile boyanmış jelde tespit edildi ve bu bant jelden kesilerek LC-MS (Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi) analizine

gönderildi. Bu analiz yapılırken *S. frugiperda* genomu ile ilgili bilgi henüz gen bankasında bulunmuyordu. Bu nedenle kesip gönderdiğimiz protein bantının benzerliği gen bankasında mevcut diğer böcek genomları arasında araştırıldı. LC-MS sonucu elimize ulaşan potansiyel proteinler (Tablo 4 ve 5) score, peptid ve coverege değerlerine bakılarak değerlendirildi. Bu değerler açısından en yüksek olan proteinler belirlendi.

Tablo 4. *Spodoptera frugiperda*'ya ait hücrel protein bantının gen bankasındaki diğer organizmalara ait proteinler ile olan benzerliği.

Erişim no:	Protein adı	Kapsamı (%)	Peptidler	PSM'ler	Benzersiz peptidler	Protein Grupları	AAs	MW [kDa]	calc. pI	Skor	Peptidler
Q1HPK6	Translation elongation factor 2	10	9	17	9	1	844	94,7	6,48	20,13	9
Q0ZB76	Eukaryotic translation initiation factor 3	9	7	9	7	1	876	101,5	6,76	5,93	7
P98092	Hemocytin	0	1	1	1	1	3133	343,1	5,67	0	1
P31398	Hemolin	2	1	1	1	1	413	45,7	7,78	0	1
P84317	Elongation factor 1-alpha	2	1	1	1	1	413	45,1	8,48	0	1
H9JU86	Poxin	3	1	1	1	1	255	28,1	7,25	0	1
P29520	Elongation factor 1-alpha	2	1	1	1	1	463	50,3	9,19	0	1
O17449	Tubulin beta-1 chain	10	1	1	1	1	447	50,2	4,86	0	1
Q26487	Elongation factor 1-alpha	2	1	1	1	1	413	45,1	8,48	0	1

Tablo 5. *Drosophila melanogaster*'e ait proteinlere benzerlik oranları.

Erişim no:	Protein adı	Kapsamı (%)	Peptitler	PSM'ler	Benzersiz peptitler	Protein grupları	AAs	MW [kDa]	calc. pI	Skor	Peptitler
P22700	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum	11	9	19	9	1	1020	111,65	4,13	2,76	9
B4J789	Eukaryotic translation initiation factor 3	1	1	2	1	1	928	107,66	6,04	5,08	1
Q26365	ADP,ATP carrier protein	7	2	2	2	1	312	34,2	9,8	4,15	2
P13060	Eukaryotic translation elongation factor 2	2	2	2	2	1	844	94,4	6,6	1,9	2
P15357	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	16	2	2	2	1	156	17,9	9,77		2
Q9VWA1	Clathrin light chain	4	1	1	1	1	219	23,8	4,78		1
Q9VLM8	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	1	1	1	1	1	966	107,76	6,13		1
Q29GR8	Moesin/ezrin/radixin homolog 1	2	1	1	1	1	593	69,9	6,37		1
Q7KN62	Transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94	18	13	49	13	1	801	88,8	5,35	5,74	13

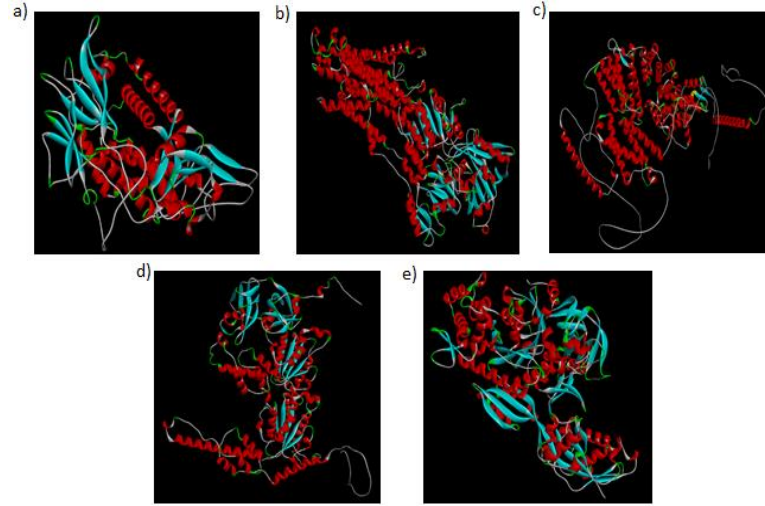
LC-MS analizinin ardından *S. frugiperda* genomunun dizi bilgisi gen bankasına yüklendi. Dolayısı ile belirlemiş olduğumuz, 118L ile hibridize olan ve konağa ait muhtemel proteinlerin, *S. frugiperda* genomunda hangi proteine daha yüksek oranda benzediğini bulmak için NCBI-Protein Blast programı kullanılarak protein blastı yapıldı. Blast sonucu ve LC-MS sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, proteinlerin benzerlik oranları, aminoasit uzunlukları ve transmembran domaini içerip içermedikleri göz önünde bulundurularak dört farklı potansiyel protein belirlendi (Tablo 5).

Tablo 6. Virüse ait 118L proteinin bağlandığı muhtemel *Spodoptera frugiperda* membran proteinleri.

Gen no.	Gen adı
118274724	Eukaryotic translation initiation factor 3 (EuTIF3)
118265900	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER94)
118265757	Eukaryotic translation elongation factor 2 (TEF2)
118266866	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum (ctATPser)

3.4. *In Silico* Protein etkileşim Analizleri

Seçilen dört proteinin, *in vitro* deneylerde kullanılmadan önce *in silico* ortamda 118L proteini ile etkileşim oranları analiz edildi. Bunun için belirlenen proteinlere ait genlerin nükleotit dizileri gen bankasından temin edildi. Temin edilen bu diziler proteine dönüştürüldü. Elde edilen protein sıralarının AlphaFold ve ColabFold programı kullanılarak üç boyutlu yapıları oluşturuldu (Şekil 10).



Şekil 10. IIV6 118L için AlphaFold programı ve *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) konak hüresine ait proteinleri için ColabFold programı kullanılarak oluşturulmuş 3 boyutlu (3D) yapıları. IIV6 118L (a), ctATPser (b), EuTIF3 (c), TER94 (d), TEF2 (e).

Üç boyutlu yapısı oluşturulan viral 118L proteini ile hücreye ait dört proteinin aralarındaki etkileşimler in silico ortamda araştırıldı. Bunun için ilk önce HADDOCK v2.4 programıyla virüse ait 118L geninin aktif ve pasif amino asit rezidüleri tespit edildi. Buna göre 118L'nin 29 aktif ve 55 tane pasif rezidüye sahip olduğu belirlendi (Şekil 11). Aynı şekilde, 118L ile etkileştiği düşünülen dört hücrel proteinin de aktif ve pasif amino asitleri belirlendi (Şekil 12). Hücrel proteinlerin 118L ile etkileşimleri yine aynı programda oluşturuldu. Bu analiz sonucunda etkileşime konulan proteinlerin etkileşen amino asitleri ve etkileşim dereceleri belirlendi (Şekil 7). Tüm analiz sonuçları değerlendirildiğinde 118L ile en yüksek etkileşim (13 amino asit) gösteren hücrel proteinin TER94 olduğu belirlendi (Şekil 13). İn vitro deneylere bu protein ile çalışılmaya karar verildi.

Tahmin edilen kalıntılar (HADDOCK'daki aktif kalıntılar):

193, 197, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211,
215,316, 318, 321, 356, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 500, 501,

Çevreleyen kalıntılar (HADDOCK'daki pasif kalıntılar):

185, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 194, 195, 196, 198, 199, 212, 213,
214,216, 217, 218, 219, 220, 242, 243, 311, 314, 315, 317, 319, 320, 322,
323,324, 337, 353, 354, 355, 357, 358, 367, 368, 374, 390, 461, 463, 464,
465.466. 469. 495. 496. 498. 499. 502. 503. 504. 505.

Şekil 11. Viral 118L proteininin aktif ve pasif aminoasit rezidülerinin HADDOCK programı ile elde edilmiş numaraları

ctATPser

Tahmin edilen kalıntılar (HADDOCK'daki aktif kalıntılar):

50, 53, 54, 57, 66, 70, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 88, 92, 95, 99, 100, 103, 104, 106, 107, 293, 296, 913, 927, 928, 931, 932, 934

Çevreleyen kalıntılar (HADDOCK'daki pasif kalıntılar):

47, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 67, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 93, 96, 101, 102, 105, 108, 109, 110, 111, 272, 288, 289, 290, 292, 294, 297, 298, 313, 316, 325, 802, 805, 809, 910, 922, 923, 925, 926, 929, 935, 938, 939, 978

Eutif3

Tahmin edilen kalıntılar (HADDOCK'daki aktif kalıntılar):

4, 6, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 235, 236, 238, 239, 823, 834, 837, 838, 841, 844, 845, 848, 849

Çevreleyen kalıntılar (HADDOCK'daki pasif kalıntılar):

2, 3, 5, 7, 8, 19, 20, 28, 30, 31, 32, 207, 208, 215, 216, 232, 233, 234, 237, 240, 241, 242, 819, 820, 821, 822, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 835, 836, 839, 840, 842, 843, 846, 847, 850, 851

TEF2

Tahmin edilen kalıntılar (HADDOCK'daki aktif kalıntılar):

2, 4, 5, 6, 28, 29, 31, 44, 45, 54, 55, 56, 67, 71, 72, 73, 78, 111, 112, 440, 441, 442, 443, 700, 701, 702, 703, 704, 706

Çevreleyen kalıntılar (HADDOCK'daki pasif kalıntılar):

1, 3, 7, 8, 10, 11, 41, 42, 47, 50, 51, 52, 53, 59, 60, 64, 65, 66, 74, 80, 99, 100, 163, 166, 221, 388, 444, 445, 446, 518, 538, 580, 582, 583, 584, 585, 656, 657, 660, 664, 695, 696, 697, 698, 699, 705, 708, 709, 795, 796, 797, 798

TER94

Tahmin edilen kalıntılar (HADDOCK'daki aktif kalıntılar):

547, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 596, 598, 630, 631, 634, 635, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 780, 783, 793, 795

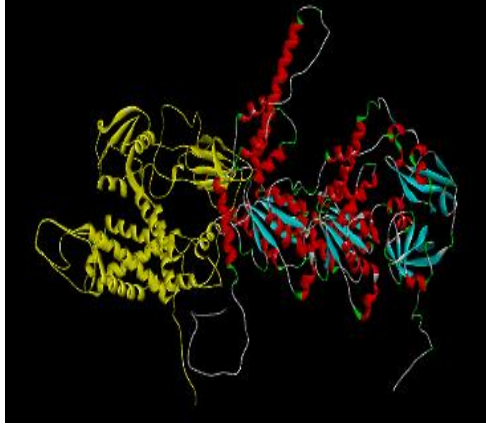
Çevreleyen kalıntılar (HADDOCK'daki pasif kalıntılar):

314, 350, 542, 544, 545, 548, 549, 557, 559, 560, 563, 580, 583, 584, 585, 591, 592, 593, 594, 597, 601, 608, 627, 628, 633, 636, 637, 639, 640, 641, 761, 762, 763, 764, 765, 777, 778, 779, 781, 782,

Şekil 12. Hücrel proteinlerin aktif ve pasif aminoasit rezidülerinin HADDOCK programı ile elde edilmiş numaraları.

118L ile EuTIF3 arasındaki etkileşim			118L ile ctATPser arasındaki etkileşim		
118L	EuTIF3	Doluluk oranı	118L	ctATPser	Doluluk oranı
TYR209-Side	ASN834-Side	200.00%	THR203-Side	PHE73-Side	200.00%
THR405-Side	HIS620-Side	100.00%	SER418-Main	TRP107-Side	100.00%
GLN179-Side	GLU686-Main	100.00%	GLU421-Side	ARG324-Side	200.00%
ALA210-Side	GLN841-Side	100.00%			
GLY206-Main	LYS840-Side	100.00%			
ILE197-Side	ARG3-Side	100.00%			
LEU190-Side	ARG24-Side	100.00%			
GLU184-Side	ARG683-Side	200.00%			
SER183-Side	ARG687-Side	100.00%			
GLN204-Side	LEU375-Side	200.00%			
118L ile TER94 arasındaki etkileşim			118L ile TEF2 arasındaki etkileşim		
118L	TER94	Doluluk oranı	118L	TEF2	Doluluk oranı
THR417-Side	SER588-Main	100.00%	GLY204-Main	GLU445-Side	200.00%
THR417-Side	SER588-Side	100.00%	TYR209-Main	THR5-Main	100.00%
THR415-Side	SER588-Side	100.00%	VAL205-Main	MET440-Main	100.00%
ARG404-Side	THR548-Side	100.00%	TYR209-Side	VAL2-Main	200.00%
SER189-Side	GLY586-Main	100.00%	GLY187-Main	GLN64-Side	100.00%
LEU190-Main	SER584-Main	100.00%	LYS512-Side	GLY306-Main	300.00%
LYS508-Side	GLU797-Side	100.00%	LYS393-Side	GLY445-Main	200.00%
GLY204-Main	GLN765-Side	200.00%	LYS393-Side	GLY446-Main	100.00%
THR417-Side	SER588-Main	100.00%	ALA181-Main	ARG50-Side	100.00%
THR417-Side	GLY586-Main	100.00%	GLU184-Side	THR54-Side	100.00%
THR415-Side	SER588-Side	100.00%			
PHE447-Side	ASN623-Side	100.00%			
PHE500-Main	GLN796-Side	100.00%			

Şekil 13. Viral 118L proteini ile hücrel proteinler arasında etkileşen amino asitler ve etkileşim dereceleri; Mavi: Gen aktif bölgesi, Kırmızı: pasif bölge, Yeşil: transmembran domaini.



Şekil 14. 118L (sarı) virüs proteini ile TER94 hüresel protein arasındaki etkileşimin HADDOCK v2.4 programı ile belirlenmesi ve etkileşim modelinin üç boyutlu yapısı.

3.5. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

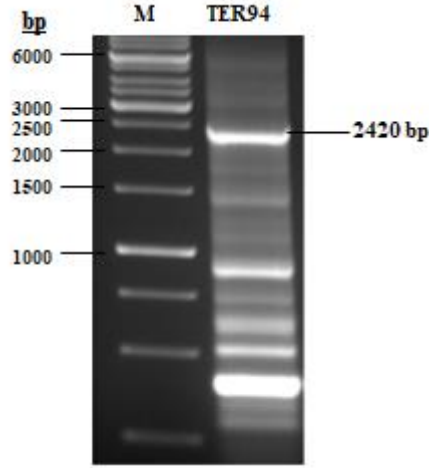
T25 flask içinde Sf-900 SFM besiyerinde büyütülen Sf9 hücrelerinden (2×10^6 hücre/ml) olacak şekilde hücre alındı ve bu hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA %1'lik agaroz jelde elektroforez edildi (Şekil 15).



Şekil 15. *Spodoptera frugiperda* 9 hücrelerinden izole edilmiş total RNA'sının agaroz jel görüntüsü.

30.6. cDNA Sentezi ve cDNA'nın Klonlanması

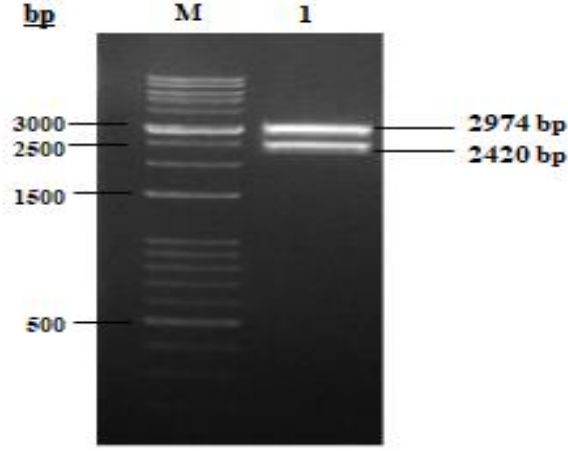
Sf9 hücrelerine ait TER94 genine özgü mRNA sekansına uygun tasarlanmış geri primer kullanılarak total RNA'dan genin cDNA'sı oluşturuldu. TER94 çift zincir cDNA'sı, uçlarına uygun restriksiyon enzim (*Bam*HI, *Stu*I) bölgeleri eklenmiş primerler kullanarak tek zincir cDNA'dan PCR ile çoğaltıldı. İstenilen büyüklükteki (2420 bp) PCR ürünü 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 16).



Şekil 16. Spodoptera frugiperda hücrelerine ait TER94 geninin PCR ile çoğaltılmış çift zincir cDNA'sının görüntüsü. M: Marker (1 kb, Thermo).

3.7. TER94 Çift Zincir cDNA'sının pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması

TER94 genine ait çift zincir cDNA pJET1.2 vektörüne klonlandı ve ardından *E.coli* DH10β hücrelerine transforme edildi. Oluşan kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı ve klon olup olmadıklarını belirlemek için restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı. Kesim sonuçları jelde görüntülendi (Şekil 17).

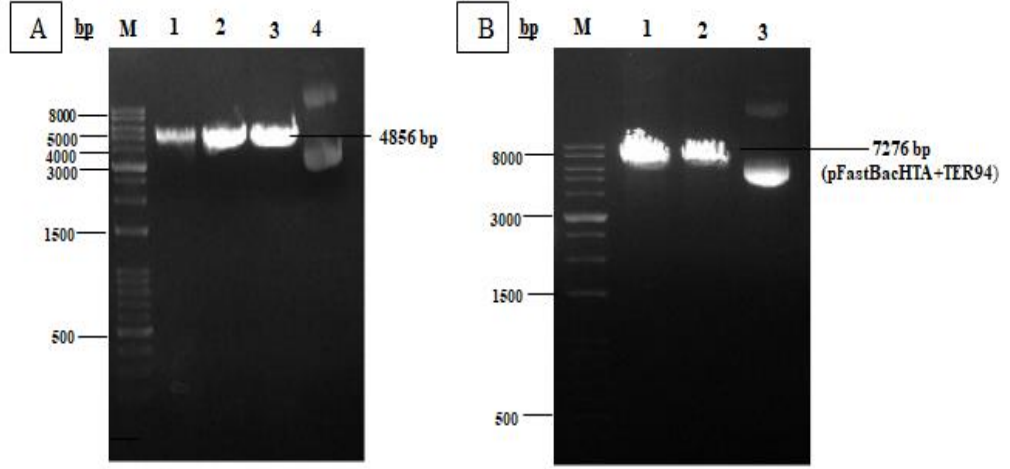


Şekil 17. TER94 çift zincir cDNA'sının pJET1.2 vektörüne klonlandığını gösteren agaroz jel görüntüsü. M: Marker (1 kb, abm); 1: pJET1.2/TER94 rekombinant plazmidinin *Bam*HI ve *Stu*I restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş görüntüsü.

Restriksiyon enzimler ile TER94 cDNA'sının pJET1.2 vektörüne klonlandığını doğruladıktan sonra genin nükleotit diziliminde mutasyon olup olmadığını belirlemek için pJET1.2/TER94 klonunu dizin analizi yaptırıldı. Analiz sonucunda cDNA'nın nükleotit diziliminde mutasyon olmadığı belirlendi.

3.8. TER94 Çift Zincir cDNA'sının pFastBacHTA Ara Transfer Vektörüne Klonlanması

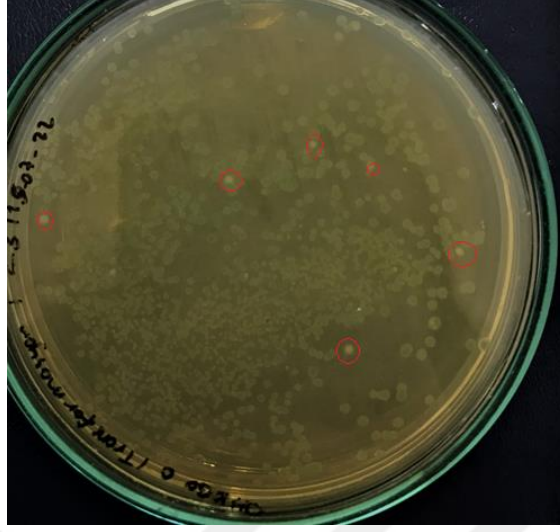
pJET1.2/TER94 klonundaki TER94 geni cDNA'sı, *Bam*HI ve *Stu*I enzimleri ile kesilerek alındı ve yine aynı enzimler ile doğrusal hale getirilmiş bakülovirüs ekspresyon vektörü pFastBacHTA (Invitrogen)'ya (Şekil 18A) klonlandı. Oluşan rekombinant plazmidler *E.coli* DH10 β hücrelerine transforme edildi. Transform edilen rekombinant plazmidin hücredeki varlığı plazmid DNA izolasyonu ve ardından restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrulandı. Enzim muamelesinde sadece *Stu*I enzimi kullanıldı. Kesim sonucunda elde edilen 7276 bp büyüklüğündeki linear DNA fragmanı bize 2420 bp büyüklüğündeki TER94 cDNA'sının 4856 bp büyüklüğündeki transfer vektörüne klonlandığını doğruladı (Şekil 18B).



Şekil 18. pFastBacHTA transfer vektörünün (A) ve rekombinant pFastBacHTA/TER94 rekobinant plazmidlerinin restriksiyon endonükleazlarla muamelesi. M: Marker (1kb, abm); A1, A2, A3: Boş pFastBacHTA plazmidin *Bam*HI ve *Stu*I restriksiyon enzimleri ile muamele sonucu, A4: Kesilmemiş pFastBacHTA plazmidini, B1, B2: pFastBacHTA/TER94 rekombinant plazmidinin *Stu*I restriksiyon enzimi ile muamele sonucu; B3: Halkasal pFastBacHTA/TER94 plazmidini.

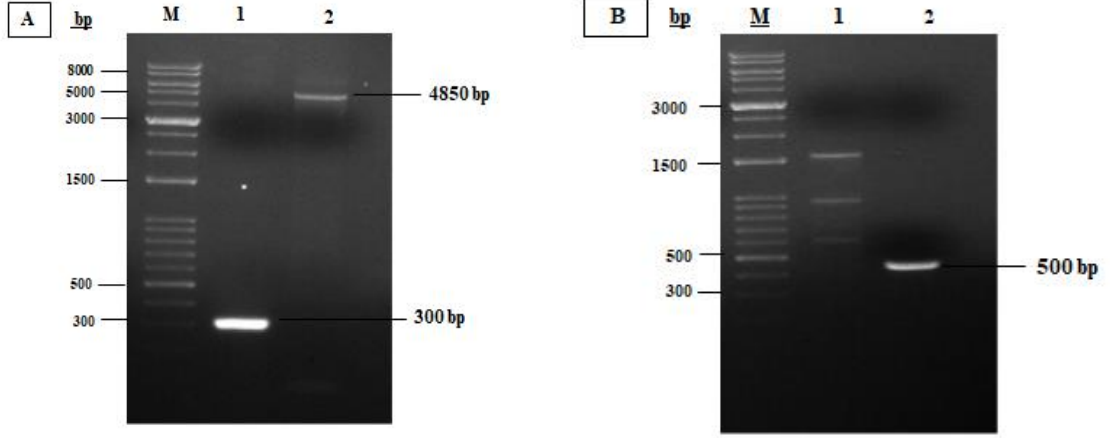
3.9. Rekombinant Transfer Vektörünün Taşıyıcı Hücreye Aktarılması ve Transpozisyon

Rekombinant transfer vektörü, pFastBacHTA/TER9, *E.coli* DH10 β hücrelerinden izole edildi. Plazmid DNA'lar rekombinant bakülovirüs (AcNPV) DNA'sı (bakmid) ve transpozisyonun olmasına aracılık eden yardımcı plazmidini bulunduran *E.coli* DH10Bac hücrelerine transforme edildi. *E.coli* DH10Bac hücreleri içerisinde bulunan bakmid DNA'sı ile TER94 cDNA'sını içeren transfer vektörü arasında üzerlerinde ortak olarak bulunan Tn7R ve Tn7L rekombinasyon bölgeleri sayesinde transpozisyon gerçekleşti ve böylece TER94 cDNA'sı bakmid DNA'sına aktarılmış oldu. Oluşan beyaz kolonilerden (Şekil 19) rekombinant bakmid DNA'ları izole edildi ve TER94 cDNA'sını içerip içermedikleri yapılan iki farklı PCR ile doğrulandı.



Şekil 19. *E.coli* DH10Bac hücrelerinin pFastBacHTA/TER9 ile transformasyonu sonucu oluşan petri görüntüsü. Rekombinant vektörü içermesi muhtemel beyaz koloniler kırmızı daireler içerisinde gösterilmiştir.

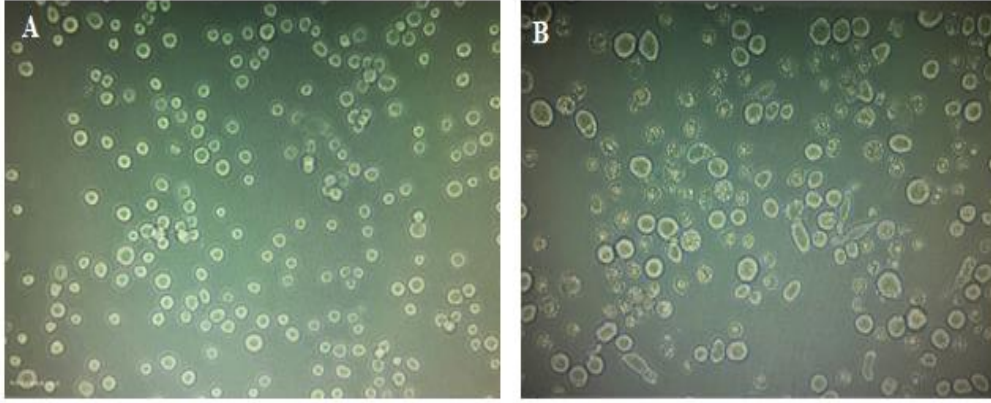
Transformasyon sonucu oluşan beyaz koloniler, beyaz renkte olduklarından emin olmak amacıyla tekrar yeni besiyeri üzerine inoküle edildi ve inkübasyon sonucunda yine beyaz oldukları görülünce bu kolonilerin, potansiyel rekombinant bakmid DNA'larını içerdiği doğrulandı. Rekombinant bakmid DNA'larının doğrulanmasında ilave olarak PCR kullanıldı. Önce beyaz kolonilerden bakmid DNA'sı izole edildi ve ardından bu DNA'lardan iki farklı PCR yapıldı. Birinci PCR'da M13Fw ve M13Rv primer çifti kullanıldı. Bu PCR sonucunda eğer pFastBacHTA vektörü ile boş bakmid DNA'sı arasında transpozisyon gerçekleşmiş ise 2430 bp uzunluğundaki bakmidden gelen bir bölgeye ilave olarak bakmid genomuna yerleştirilen DNA'nın (2420 bp) büyüklüğü kadar bir ürün oluşması beklenmektedir. Eğer bakmid boş ise 300 bp uzunluğunda bir fragman oluşumu beklenmektedir. PCR sonuçları da bu şekilde oluştu ve 4850 bp büyüklüğünde DNA fragmenti çoğaltıldı. Bu sonuç TER94 cDNA'sının bakmid DNA'sına aktarıldığını gösterdi (Şekil 20A). TER94 cDNA'sının bakmid içerisine klonlandığını teyit etmek amacıyla yapılan diğer PCR'da ise M13Fw ve GentaRv primer çifti kullanıldı. Bu PCR analizinde de eğer klonlanılan gen bakmid DNA'sı içerisinde ise 500 bp'lik bir ürün oluşturması gerekmektedir. Bakmid DNA'sı boş ise herhangi bir spesifik bant oluşumu beklenmemektedir. PCR sonucu beklenildiği gibi oldu ve 500 bp uzunluğunda bir fragman elde edildi (Şekil 20B).



Şekil 20. TER94 cDNA'sının AcNPV bakmid DNA'sı içerisine klonlandığını gösteren PCR görüntüsü. M13Fw ve M13Rv primerleriyle yapılan PCR (A), M13Fw ve GentaRv primerleriyle yapılan PCR (B). M: Marker (1kb, abm); 1: Boş bakmid DNA'sından yapılan PCR, 2: Rekombinant bakmid DNA'sından yapılan PCR.

3.10. Rekombinant Bakmid DNA'sının Böcek Hücre Kültürüne Transfeksiyonu

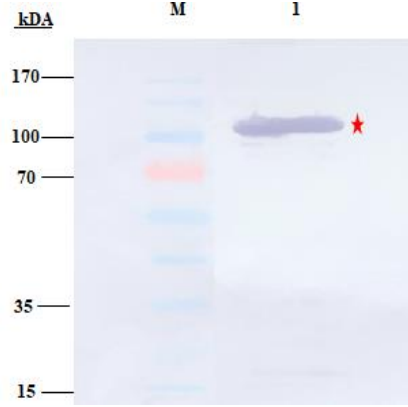
TER94 cDNA'sını içeren bakmid DNA'sı *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerine transfekte edildi. Bakülovirüs DNA'sı enfektif olduğu için hücrelere transfekte edilen rekombinant bakmid DNA'sı, Sf9 hücresel proteini TER94 cDNA'sını taşıyan rekombinant AcNPV virüslerinin (AcNPV/TER94) oluşumunu sağladı. Oluşan viral süspansiyon ile yeni enfeksiyonlar yapıldı. Bu enfeksiyonlarda, Sf9 hücrelerinin nükleuslarının büyümesi, hücrelerin sitoplazmasında granüllerin oluşması ve virüslerin yatay bir şekilde yayıldığına göstergesi olan hücrelerin uzayıışı şeklinde enfeksiyon belirtileri gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 21. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinin rekombinant virüs (AcNPV/TER94) ile enfeksiyon görüntüleri. A: Enfekte olmamış hücreler, B: Enfekte olmuş hücreler.

3.11. TER94 Proteininin *Spodoptera frugiperda* Hücrelerinde Üretilmesi

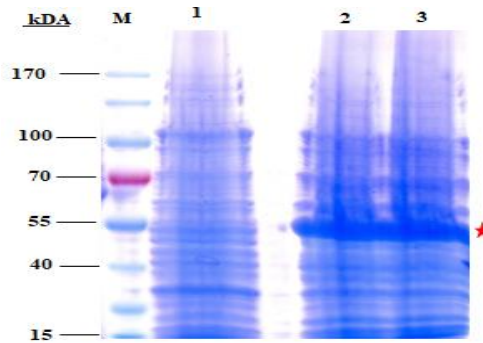
Rekombinant virüsler (AcNPV/TER94) kullanılarak T75 kültür kaplarındaki Sf9 hücreleri enfekte edildi. Enfeksiyondan 4 gün sonra hücreler toplandı, santrifüj edildi ve oluşan hücre pelletinden bir miktar alınıp western blot analizi yapıldı. Western blot sonucu TER94 proteininin üretildiği, proteinin N-terminaline eklenmiş histidin amino asitine özgü antikorlar kullanılarak doğrulandı (Şekil 22).



Şekil 22. Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde üretilen *Spodoptera frugiperda* TER94 proteininin Western-blot analizi. M: Marker (prestained,Thermo); 1: AcNPVTER94 ile enfekte olmuş Sf9 hücrelerinden 4. gün sonunda alınmış hücre ekstraktı.

3.12. 118L Proteininin Bakteriyal Sistemde Üretilmesi

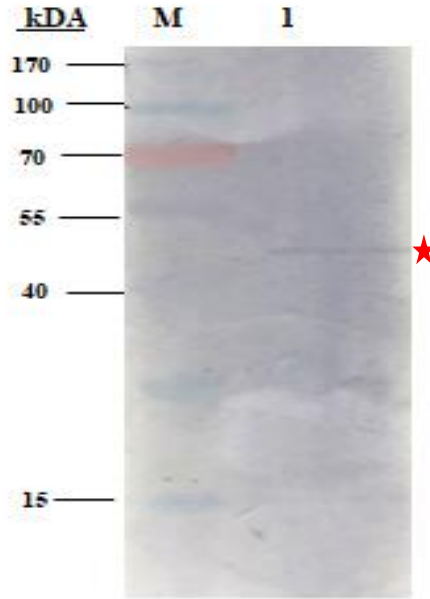
Laboratuvarımızda yapılmış önceki çalışmalarda pGEX-2T klonlama vektörüne klonlanmış olan Invertebrate irisedecnt virus 6 (IIV6)'ya ait 118L geninin ifade edilebilmesi için *E.coli* BL21-pLysS suşu kullanıldı. Bakteriyal sistemde GST kuyruğa sahip 118L proteinin ifadesi gerçekleştirildikten sonra proteinin üretildiği SDS-PAGE ile doğrulandı (Şekil 23).



Şekil 23. IIV6 118L geninin bakteriyal sistemde ifadesi. M: Marker (prestained, Thermo); 1: Boş *E.coli* BL21-pLysS hücre ekstraktı; 2 - 3: pGEX-2T118L vektörünü içeren *E.coli* BL21-pLysS hücre ekstraktları.

3.13. Pull-down Analizi

Eldedilen TER94 ve 118L proteinlerinin birbirleri ile etkileşimlerini göstermek için pull-down analizi yapıldı. 118L proteini pGEX-2T vektöründe GST uzantısı ile ifade edilirken, TER94 geni pFastBacHTA vektöründe His-taq kuyruk ile ifade edildi. Farklı ekspresyon sistemlerinde üretilen proteinler, hücrelerin parçalanması ve oluşan ekstraktların çözünebilir kısımlarının alınması ile elde edildi. Bu şekilde elde edilen proteinler birbirlerine karıştırıldı ve His-taq uzantısından faydalanarak protein saflaştırma işlemi yapıldı. His-taq kuyruk ile saflaştırılan proteinler SDS-PAGE’de ayrıştırıldı ve GST kuyruğuna özgü antikor kullanılarak western blot hibridizasyon analizine tabi tutuldu. GST antikoru ile yapılan western sonucunda 118L protein bantının görülmesi bize, His-taq kuyruk ile saflaştırılan TER94 proteininin GST kuyruk ile ifade edilen 118L ile bağlandığını göstermiş oldu (Şekil 24).



Şekil 24. Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) 118L (GST kuyruklu) ile *Spodoptera frugiperda* (Sf9) TER94 (Histidin kuyruklu) proteinlerinin GST-pull down analizi. 1: Histidin antikoru ile saflaştırılmış TER94-118L proteinlerinin GST antikoru ile Western blot sonucu; M: Marker; GST: 26 kDA; 118L+GST: 54 kD

4. TARTIŞMA

Günümüzde artan nüfus ile birlikte tüketim de bu doğrultuda artmaktadır. Kaliteli meyve ve sebzenin yanı sıra bu meyve ve sebzelerin üretim miktarı da arttırılmak istenmektedir. Tarımda kaliteyi arttırmak adına yapılabilecek iyileştirmelerin başında, tarım bitkilerine zarar veren böceklerin kontrol altına alınması gelmektedir. Bu ihtiyaç doğrultusunda biyolojik mücadele kavramı ön plana çıkmaktadır. Biyolojik mücadele, zararlı böcek popülasyonlarını azaltarak bu zararı en aza indirmek için canlı organizmalardan veya onların ürünlerinden faydalanılarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir mücadele yöntemidir. Bu yöntemin ana unsurları zararlıların mücadelesinde kullanılan parazitoidler, predatörler ve entomopatojenlerdir.

Entomopatojenlerin, mikrobiyal mücadele etmeni olarak kullanımı; besinler üzerinde kalıntı oluşturmaması, ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğe tehdit oluşturmaması, insanlar ve hedeflenmemiş diğer organizmalar açısından güvenli olması gibi birçok avantajlara sahiptir. Doğadaki böceklerin hastalanmalarına ve ölmelerine neden olan bakteri, virüs, mantar, nematod veya protozoa orijinli pek çok entomopatojen mevcuttur. Bu entomopatojenlerden biri olan virüslerin, biyolojik mücadele kapsamında böcekleri enfekte ederek böcek kaynaklı salgınları kontrol altına aldıkları bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Zararlı böceklerle mücadele kapsamında virüsler içerisinde en çok kullanılan bakülovirüslerdir. Bakülovirüslerin yanısıra cypovirüsler, reovirüsler, entomopoxvirüsler ve iridovirüsler de zararlı böcekler ile mücadelede kullanılma potansiyeline sahiptirler. Iridoviridae familyasının Iridovirüs cinsine ait bir tür olan Invertebrate iridescent virüs 6 (IIV6), biyolojik mücadele açısından potansiyeli yüksek virüslerden biridir.

IIV6, ikosahedral simetriye sahip nükleositol plazmik büyük DNA virüsüdür (Williams vd., 2005). dsDNA genomu 212.482-bp uzunluğundadır (Devauchelle vd., 1985). IIV6'nın konak spektrumu oldukça geniştir. Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera ve Orthoptera ordolarına mensup çok sayıda böceğin IIV6'ya duyarlı olduğu bilinmektedir (Williams vd., 2008). IIV6'nın enfekte ettiği böcekler arasında bazı önemli zararlı böceklerin bulunması, bu virüsü potansiyel biyolojik mücadele ajanı olarak ön plana çıkarmaktadır (Kleespies vd., 1999; Hernandez vd., 2000).

IIV6 virion yapısında 54 proteinin varlığı tespit edilmiştir. IIV6 proteomunda bulunan beş ORF (022L, 118L, 142L, 274L ve 295L) tüm iridoviridlerde ortak olarak tespit edilmiştir. Dolayısı ile bu beş ORF şu an için sayıları 26 olarak bildirilen iridovirüs kor genleri arasındadır (Earton vd., 2007; İnce vd., 2010). IIV6 118L ORF'sinin, *Rana gryliovirus* (RGV)'deki homoloğu olan ORF 53R'nin viral bir zarf proteinini kodladığı gösterilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2008). 118L tüm iridovirüs ve askovirüslerde homoloğu bulunan bir genidir. Bu genin Singapore grouper iridovirüsünde homoloğu olan VP088 proteini ile yapılan bir çalışmada proteinin virüse ait yapısal proteinlerden biri olduğu ve bu proteinin virüs konağında 94kDA'luk bir hücre membran proteini ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Zhou vd., 2011). Başka bir çalışmada Frog virüs-3'e ait ve yine 118L'nin homoloğu olan 53R geninin virüs replikasyonu için hayati öneme sahip miristilasyonlu bir membran proteini kodladığı belirlenmiştir (Whitley vd., 2010). Ayrıca, *Rana grylio* virüse ait 53R geninin virüs inşası için önemli olduğu, genin susturulması durumunda %58 oranında enfeksiyonun azaldığı tespit edilmiştir (Kim vd., 2010). IIV6 118L ORF'sinin homologları ile yapılan bu çalışmalar 118L'nin, virüsün hücreye giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan bir tez çalışmasında, 118L'nin dokuz farklı viral proteinle (117L, 229L, 355R, 366R, 374R, 307L, 415R, 422L, 378R) etkileştiği tespit edilmiştir (Özşahin, 2015). Bunlardan biri 374R proteini olup Koronavirüste sınıf I virüs füzyon proteini olarak sınıflandırılan bir protein ile homoloji göstermektedir. Bu durum da 118L'nin virüsün giriş-füzyon kompleksinin bir üyesi olma ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Virüsün hücreye giriş-füzyon kompleksinin anlaşılması, viral enfeksiyonun başlangıcını anlamak için önemli bir bilgidir.

Bu çalışmada 118L proteini bakteriyal sistemde eksprese edilmiş ve daha sonra konağı olduğu Sf9 hücrelerinin membran proteinleriyle hibridize edilmiştir. Hibridizasyon sonucunda CIV'nin hücreye girişinde muhtemel reseptör görevi gören TER94 proteini bakulovirüs ekspresyon sisteminde eksprese edilmiştir. Üretilen proteinin viral 118L ile etkileşime girip girmediğini belirlemek adına 118L proteini ile TER94 proteini pull-down deneyi ile in vitro ortamda etkileşime konulmuştur ve proteinlerin birbirleri ile etkileştiği tespit edilmiştir.

TER94, ökaryotik hücrelerde bol miktarda bulunan ve temel işlevleri bilinen, evrimsel olarak korunmuş AAA ATPaz ailesinin bir üyesidir (Lyupina ve diğerleri, 2018). Bu gen ürünü sitozolik olmasına rağmen birçok virüsün giriş füzyonunda, replikasyonunda ve

çoğalmasında önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Koronavirüs (WongHH, vd., 2015) ve Influenza virüs (Bhowmick, vd., 2017) dahil olmak üzere birçok virüs, optimal viral enfeksiyon ve replikasyon için konak hücrelerine ait TER94'ü seçmektedir. Yapılan bir çalışmada TER94'ün, model bakülovirus olan *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (AcMNPV) Replikasyonundaki rolü araştırılmıştır. TER94 ATPaz aktivitesinin inhibisyonu, virüsün DNA replikasyonunu ve BV üretimini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. TER94'ün bakülovirüs yaşam döngüsünün çoklu adımlarında, genom replikasyonu, çıplak virüs (BV) ve gömülü virüs (ODV) oluşumu dahil olmak üzere çok önemli işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Li, Y. vd., 2019). Bir diğer çalışmada ise sivrisinek hücrelerinin Zika virüs (ZIKV) ile enfeksiyonu sırasında transisyonel endoplazmik retikulum proteini olan TER94'ün susturulması, ZIKV kapsid bozulmasını önlediği ve viral replikasyonu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Gestuveo, 2021).

Virüs enfeksiyonunun yanı sıra TER94 bazı sinyal yollarında pozitif yönde düzenleyici rol üstlenmektedir. Örneğin, *Drosophila* üzerinde yapılan bir çalışmada ATPase TER94'ün, kanat gelişimi sırasında Notch sinyalinin pozitif bir düzenleyicisi olarak hareket ettiği ve böylece TER94'ün kanat gelişimindeki yeni aydınlatılmıştır (Li, Y. vd., 2019).

TER94 proteininin herhangi bir transmembran domaini içermediği ve sitozolik bir protein olduğu bilinmektedir. Virüslerin konak hücreye girişlerinde ilk olarak hücre membranında bir molekül ile etkileşime geçip ardından konak hücre içerisine alındığı bilinmektedir. Fakat TER94 proteinin sitozolik olması ve transmembran domainine sahip olmaması, bu proteinin viral zarf proteini 118L ile etkileşime girmesine engel değildir. Bu iki proteinin etkileşimindeki olası bir neden, TER94'ün virüsün giriş füzyonundaki aşağı akış sinyal yollarını düzenleyen bir protein olabilme ihtimalidir.

Bu bilgiler ışığında TER94 proteininin, virüsün hücreye giriş-füzyonunda ve replikasyonunda önemli bir protein olduğu düşünülmektedir. Dolayısı ile virüs enfeksiyonunda olası bir aracı reseptör olarak görev yapabilmesi mümkündür.

5. SONUÇLAR

Bu tezde; Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)'ya ait membran proteini olan 118L'nin konak hücre, *Spodoptera frugiperda*, yüzeyinde hangi protein ile etkileştiğini bulmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasıyla protein membran overlay deneyi, LC-MS analizi, *in silico* protein protein etkileşimleri, protein ekspresyonu ve pull down analizidir. Çalışmaların sonuçlarını maddeler halinde şu şekilde sıralayabiliriz:

1) *Spodoptera frugiperda* (Sf9) böcek hücrelerinin membran proteinlerinin izolasyonu gerçekleştirildi. Membran proteinleri SDS-PAGE ile ayrıştırıldı ve takiben jelden nitroselüloz membrana aktarıldı.

2) IIV6 virüsüne ait saflaştırılmış 118L proteini ile membran aktarılan Sf9 hücrelerinin membran proteinleri hidridize edildi. 118L proteininin membran proteinlerinden yaklaşık 110 kDa büyüklüğünde bir protein ile hibridize olduğu, 118L'nin N-terminaline eklenmiş histidin kuyruğuna özgü antikolar kullanılarak belirlendi.

3) Belirlenen protein bandı jelden kesilip tanımlanmak üzere LC-MS'e gönderildi. *Drosophila melanogaster* ve diğer bazı böcek hücreleri ile kıyaslama yapılarak protein tanımlanmaya çalışıldı.

4) LC-MS sonucu 118L ile etkileşime girebilmesi muhtemel 4 protein belirlendi. Bunlar; Eukaryotic translation initiation factor 3 (Eutif3), Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER94), Eukaryotic translation elongation factor 2 (TEF2) ve Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum (ctATPser)'dur.

5) Bu proteinlerin, IIV6 118L proteini ile etkileşimleri (docking) *in silico* ortamda çalışıldı. Sonuç olarak bunlar arasından TER94 konak proteininin 118L ile en iyi etkileştiği belirlendi.

6) TER94 proteini kodlayan gen bölgesi, Sf9 hücrelerinden izole edilen total RNA'dan reverse transkripsiyon-PCR ile elde edildi.

7) Çoğaltılan TER94 geni önce pJET1.2 klonlama vektörüne klonlandı. Klonlandıktan sonra vektördeki baz dizilimleri doğrulandı.

8) TER94 geni bakülovirüs ekspresyon vektör sistemine aktarılmak üzere ara transfer vektörü olan pFastBacHTA'ya klonlandı ve hücre içerisinde gerçekleşen transpozisyon işlemi ile bakmid genomuna dahil edildi.

9) Bakmid DNA'sı hücre kültürü ortamında, Sf9 hücrelerine virüs oluşturulması amacıyla transfekte edildi. Oluşan virüsler çoğaltıldı ve klonlanan gene ait proteininin hücre kültüründe geniş çaplı üretimi gerçekleştirildi.

10) Üretilen proteinin western blot analizi sonucu TER94 genine ait proteinin yaklaşık 110 kDa olduğu gözlemlendi. Bu ağırlıklar beklenen protein sırası ile uyumludur.

11) Önceki çalışmalarda pGEX-2T klonlama vektörüne klonlanmış olan 118L geninin, bakteriyal sistemde (*E.coli* BL21-Lys) ekspresyonu gerçekleştirildi. GST kuyruğu ile üretilen 118L proteininin 54 kDa büyüklüğünde olduğu gözlemlendi.

12) TER94 ve 118L proteinlerini ifade eden hücrelerden elde edilen ekstraktların çözünebilir lizatları birbirlerine karıştırılıp +4°C'de 3 saat inkübe edilerek pull-down işlemi gerçekleştirildi.

13) Pull-down solüsyonundan histidin kuyruk kullanılarak protein saflaştırılması yapıldı. Saflaştırılan proteinler SDS-PAGE'de ayrıştırılıp nitroselülöz membrana aktarıldı. GST kuyruğa özgü antikorlar kullanılarak membrana western blot işlemi uygulandı.

14) Histidin antikoruna ile saflaştırılan TER94 - 118L protein ikilisinin GST antikoruna ile western blot analizinde tespit edilmesi, bu iki proteininin etkileştiklerini *in vitro* ortamda kanıtlamıştır.

6. ÖNERİLER

Biyolojik mücadelede kimyasal ajanları kullanmak yerine böcek patojeni mikroorganizmaları (bakteri, virüs, fungus, protopzoa) ve bu mikroorganizmalardan elde edilen bazı insektisidal ürünleri kullanmak hem yararlı böcekleri hem de çevreyi korumak adına önemli bir avantajdır.

Invertebrate iridescent virüs 6 (IIV6), biyoteknolojik kullanım potansiyeli olan önemli bir böcek virüsüdür. Virüsün etkili olduğu böcekler üzerindeki etkisini arttırmak, konak spesifikliğı ve virülansı ile ilgili moleküler mekanizmaları aydınlatmak için virüsün konak hücreye girişinde rol oynayan proteinlerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Yapılan önceki çalışmalarda, virüsün konak hücreye girişinde kapsid proteini olan 118L proteininin önemli bir rol oynadığı bulunmuştu. Bu tez çalışmasında ise IIV6'nın konak hücreye girişinde hücreye ait hangi protein veya proteinlerin rol aldığı belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar neticesinde viral zarf proteini 118L'nin konağına ait TER94 adında bir proteinle etkileştiğı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasının devamı niteliğinde olabilecek bir çalışmada ise konağına ait TER94 proteininin inaktivasyonu yapılarak IIV6'nın konağı, enfeksiyonunun bu durumdan nasıl etkilendiğı araştırılabilir.

Alternatif bir çalışmada ise IIV6 ile enfekte olmuş hücrelerdeki TER94 ekspresyon seviyesi ile enfekte olmamış hücrelerdeki TER94 ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması yapılarak, bu proteinin viral enfeksiyon durumunda ekspresyon seviyesindeki değışiklik belirlenebilir.

Bunların dışında IIV6 ile enfekte olan hücrelerde enfeksiyonun gerçekleştiğı süre boyunca TER94 proteinin hücredeki lokalizasyonu ve virüs ile proteinin hücre yüzeyinde veya hücre içinde etkileşimlerini göstermek adına her iki proteinin floresans işaretlemeler ile işaretlenerek takip edilmesi yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Altheide, T.K., Hayakawa, T., Mikkelsen, T.S., Diaz, S., Varki, N. ve Varki, A. (2006). System-wide genomic and biochemical comparisons of sialic acid biology among primates and rodents: evidence for two modes of rapid evolution, Journal of Biological Chemistry, 281, 25689-25702.
- Balange, O.N. ve Devauchelle, G. (1982). Lipid composition of an iridescent virus type 6 (CIV), Arch. Virol., 73, 363–367.
- Bamford, D.H., Grimes J.M. ve Stuart D.I. (2005). What does structure tell us about virus evolution, Curr. Opin. Struct. Biol., 15, 655–663.
- Barnard, R.J.O. ve Young, J.A.T. (2003). Alpharetrovirus envelope-receptor interactions, Cellular Factors Involved in Early Steps of Retroviral Replication, 107-136.
- Barton, E.S., Connolly, J.L., Forrest, J.C., Chappell, J.D. ve Dermody, T.S. (2001). Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening, Journal of Biological Chemistry, 276, 2200-2211.
- Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J. ve Dermody, T.S. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus, Cell, 104, 441-451.
- Beljelarskaya, S.N. (2002). A baculovirus expression system for insect cells, Molecular Biology, 36, 281-292.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S. ve Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, Science, 275, 1320-1323.
- Bhattacharyya, S., Zagorska, A, Lew, E.D., Shrestha, B., Rothlin, C.V. ve Naughton, J. (2013). Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors, Cell Host Microbe, 14, 136–147.
- Bhella, D. (2015). The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 370
- Bhowmick S., Chakravarty C., Sellathamby S. ve Lal S.K., 2017. The influenza A virus matrix protein 2 undergoes retrograde transport from the endoplasmic reticulum into the cytoplasm and bypasses cytoplasmic proteasomal degradation, Arch Virol, 162, 919–929.
- Boulant, S., Stanifer, M. ve Lozach, P.Y. (2015). Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding, signaling, and endocytosis, Viruses, 7, 2794-2815.

- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S. ve Rossmann, M.G. (2009). Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms, Proc. Natl. Acad. Sci., *106*, 21848–21853.
- Braunwald J., Nonnenmacher H. ve Tripier-Darcy F.B. (1985). Ultrastructural and biochemical study of frogvirus 3 uptake by BHK-21 cells, J Gen Virol., *66*, 283–293.
- Brockhausen, I., Schachter, H. ve Stanley, P., 2009. O-GalNAc glycans, Essentials of Glycobiology.
- Brunelle, J.L. ve Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE), In Methods in enzymology, *541*, 151-159.
- Campbell, I.D. ve Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., *3*.
- Cao, X., He, Y., Hu, Y., Wang, Y., Chen, Y.R., Bryant, B., Clem, R.J., Schwartz, L.M., Blissard, G. ve Jiang, H. (2015). The immune signaling pathways of *Manduca sexta*, Insect Biochem. Mol. Biol., *62*, 64–74.
- Chen, H., Xie, M., Lin, L., Zhong, Y., Zhang, F. ve Su, W. (2022). Transcriptome analysis of detoxification-related genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae), Journal of Insect Science, *22*, 11.
- Chen, Y.P., Becnel, J.J. ve Valles, S.M. (2012). RNA viruses infecting pest insects, Insect pathology, 133-170.
- Chinchar, V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers, Archives of virology, *147*, 447-470.
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q. ve ICTV Report Consortium (2017). ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae, Journal of General Virology, *98*, 890-891.
- Chinchar, V.G., Yang, F., Huang, J., Williams, T., Whittington, R., Jancovich, J., Subramaniam, K., Waltzek, T., Hick, P. ve Ince, I.A. (2019). One new genus with one new species in the subfamily Betairidovirinae.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C.F. ve Williams, T.A. (2001). Comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6, J. Virol. Methods, *98*, 109–118.
- Coyne, C.B. ve Bergelson, J.M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions, Cell, *124*, 119-131.
- Cronin, J., Zhang, X.Y. ve Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping, Current gene therapy, *5*, 387-398.

- Darcy-Tripier, F., Nermut, M.V., Braunwald, J. ve Williams, L.D. (1984). The organization of frog virus 3 as revealed by freeze-etching, Virology, 138, 287-299.
- Demirbağ, Z.İ., Beldüz, A.O. ve Demir, İ. (1998). Baculovirus' ün ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması, Türk J Biol, 22, 249-262.
- Dermody, T.S., Kirchner, E., Guglielmi, K.M. ve Stehle, T. (2009). Immunoglobulin superfamily virus receptors and the evolution of adaptive immunity, PLoS pathogens, 5.
- Devauchelle, G., Attias, J., Monnier, C., Barray, S., Cerutti, M., Guerillon, J. ve Orange-Balange, N. (1985). Chilo iridescent virüs, Iridoviridae, 37-48.
- Eaton, H.E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C. ve Brunetti, C. R. (2007). Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes, Virol J, 4, 11.
- Eaton, H.E., Ring, B.A. ve Brunetti, C.R. (2010). The genomic diversity and phylogenetic relationship in the family Iridoviridae, Viruses, 2, 1458-14775.
- Evans, D. (2008). Viral receptors, Oxford: Academic Press.
- Farahani, E., Patra, H.K., Jangamreddy, J R., Rashedi, I., Kawalec, M., Rao Pariti, R.K. ve Wiechec, E. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness, Carcinogenesis, 35, 747-759.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. ve Ball, L.A. (2005). Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press.
- Federici, B. (1980). Isolation of an iridovirus from two terrestrial isopods, the pill bug, *Armadillidium vulgare* and the sow bug, *Porcellio dilatatus*, J. Invertebr. Pathol., 36, 373-381.
- Federici, B.A. (2009). Pathogens of insects, In Encyclopedia of insects, 757-765.
- Forrest, J.C., Campbell, J.A., Schelling, P., Stehle, T. ve Dermody, T.S. (2003). Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1: implications for the mechanism of reovirus attachment, Journal of Biological Chemistry, 278, 48434-48444.
- Fukaya, M. ve Nasu, S. (1966). A Chilo iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), Appl. Entomol. Zool., 1, 69-72.
- Gestuveo, R.J., Royle, J., Donald, C.L., Lamont, D.J., Hutchinson, E.C., Merits, A. ve Varjak, M. (2021). Analysis of Zika virus capsid-Aedes aegypti mosquito interactome reveals pro-viral host factors critical for establishing infection, Nature Communications, 12, 2766

- Goorha R. ve Dixit P. (1984). A temperature sensitive mutant of frogvirus 3 is defective in second stage DNA replication, Virology, 136, 186–195.
- Goorha R. ve Granoff A. (1979). Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. Comprehensive Virology, Newly Characterized Vertebrate Viruses, 347-399.
- Goorha R. (1981). Frogvirus 3 requires RNA polymerase II for replication, J Virol, 37, 496–499
- Goorha R. (1982). Frogvirus 3 DNA replication occurs in two stages, J. Virol, 43, 519–528.
- Goorha R., Murti G., Granoff A. ve Tirey R. (1978). Macromolecular synthesis in cells infected by frogvirus 3. VIII. The nucleus is a site of frogvirus 3 DNA and RNA synthesis, Virology, 84, 32–50.
- Goorha, R., Granoff, A., Willis, D.B. ve Murti, K.G. (1984). The role of DNA methylation in virus replication: inhibition of frog virus 3 replication by 5-azacytidine, Virology, 138, 94-102.
- Grove, J. ve Marsh, M. (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry, Journal of Cell Biology, 195, 1071-1082.
- Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T. ve Dermody, T.S. (2006). Attachment and cell entry of mammalian orthoreovirus, Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis, 1-38.
- Haase, S., Sciocco-Cap, A. ve Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives, Viruses 7, 2230–2267.
- Harrison, R. ve Hoover, K. (2010). Baculoviruses and other occluded insect viruses, Insect pathology, 73-131.
- He, F. (2011). Bradford protein assay, Bio-protocol.
- Hernandez, O., Maldonado, G. ve Williams, T. (2000). An epizootic of patent iridescent virus disease in multiple species of blackflies in Chiapas, Mexico, Medical and Veterinary Entomology, 14, 458–462.
- Hruska, A.J. ve Gould, F. (1997). Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua, J. Econ. Entomol, 90, 611–622.
- Hunter, W., Lapointe, S., Sinisterra, X., Achor, D. ve Funk, C. (2003). Iridovirus in the root weevil *Diaprepes abbreviatus*, J. Insect Sci., 3, 1–6.

- Hussain, A. G., Wennmann, J. T., Goergen, G., Bryon, A. ve Ros, V.I. (2021). Viruses of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: A review with prospects for biological control Viruses, 13, 2220.
- Ibarra, J.E. ve Del Rincón-Castro, M.C. (2008). Insect viruses diversity, biology, and use as bioinsecticides, Tropical biology and conservation management, 5, 1-10.
- Ince, I.A., Boeren, S.A., van Oers, M.M., Vervoort, J.J. ve Vlak, J.M. (2010). Proteomic analysis of Chilo iridescent virus, Virology, 405, 253–258.
- Ince, I.A. (2012). Functional genomics of chilo iridescent virus: a transcriptoproteomic approach, Wageningen University and Research.
- İnce, İ.A., Boeren, S., Vlak, J.M. ve van Oers, M.M. (2013). Proteomic analysis and label-free quantitation of an invertebrate iridovirus virion proteins in infected cells, In FEMS2013-5th Congress of European Microbiologists.
- İnce, İ.A., Özcan, O., İlter-Akulke, A.Z., Scully, E.D. ve Özgen, A. (2018). Invertebrate iridoviruses: a glance over the last decade, Viruses, 10, 161.
- Jakob N.J., Muller K., Bahr U. ve Darai G. (2001). Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virüs, Virology, 286, 182–196.
- Jancovich, J.K., Bremont, M., Touchman, J.W. ve Jacobs, B. L. (2010). Evidence for multiple recent host species shifts among the ranaviruses (family Iridoviridae), Journal of virology, 84, 2636-2647.
- Johnson SJ. (1987). Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere, Insect Science and its Applications 8, 543-549.
- Just, F., Essbauer, S., Ahne, W. ve Blahak, S. (2001). Occurrence of an invertebrate iridescent-like virus (Iridoviridae) in reptiles, J. Vet. Med. B., 48, 685–694.
- Karasawa, S., Takatsuka, J. ve Kato, J. (2012). Report on iridovirus IIV31 (Iridoviridae, Iridovirus) infecting terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea) in Japan, Crustaceana, 85, 1269–1278.
- Kim, Y.S., Ke, F., Lei, X.Y., Zhu, R. ve Zhang, Q.Y. (2010). Viral envelope protein 53R gene highly specific silencing and iridovirus resistance in fish Cells by AmiRNA, PLoS One, 5, 4.
- King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J. ve Carstens, E. B. (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9.
- Kleespies, R.G., Tidona, C.A. ve Darai, G. (1999). Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range, Journal of Invertebrate Pathology, 73, 84–90.

- Kondratowicz, A.S., Lennemann, N.J., Sinn, P.L., Davey, R.A., Hunt, C.L. ve Moller-Tank, S. (2011). T-cell immuno-globulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for ZaireEbola virus and Lake Victoria Marburg virus, Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A., 108,8426–8431.
- Li, Y. ve Chen, X. (2012). Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications, Applied microbiology and biotechnology, 94, 887-905.
- Li, Y., Hu, L., Chen, T., Chang, M., Deng, F., Hu, Z. ve Wang, M. (2020). Host AAA+ ATPase TER94 plays critical roles in building the baculovirus viral replication factory and virion morphogenesis, Journal of Virology, 94.
- Li, Y., Liu, T. ve Zhang, J. (2019). The ATPase TER94 regulates Notch signaling during *Drosophila* wing development, Biology Open, 8.
- Lupetti, P., Montesanto, G., Ciolfi, S., Marri, L., Gentile, M., Paccagnini, E. ve Lombardo, B.M. (2013). Iridovirus infection in terrestrial isopods from Sicily in Italy, Tissue Cell, 45, 321–327.
- Lyupina, Y.V., Erokhov, P.A., Kravchuk, O.I., Finoshin, A.D., Abaturova, S.B., Orlova, O.V. ve Mikhailov, V.S. (2018). Essential function of VCP/p97 in infection cycle of the nucleopolyhedrovirus AcMNPV in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells, Virus research, 253, 68-76.
- Maginnis, M.S. (2018). Virus–receptor interactions: the key to cellular invasion, Journal of molecular biology, 430, 2590-2611.
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., ve Akashi, H. (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus, Journal of virology, 80, 4482-4490
- Marschang, R.E. (2011). Viruses infecting reptiles, Viruses, 3, 2087-2126.
- Marsh, M. ve Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame, Cell, 124, 729-740.
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E. ve Amara, A. (2012). The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry, Cell host and microbe, 12, 544-557.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L. ve Amara, A. (2017). Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses, Cell reports, 18, 324-333.
- Mercer, J. ve Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells, Science, 320, 531–535.

- Miller, E.H., Obernosterer, G., Raaben, M., Herbert, A.S., Deffieu, M.S., Krishnan, A. ve Chandran, K. (2012). Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor, The EMBO journal, 31, 1947-1960.
- Moller-Tank, S. ve Maury, W. (2014). Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection, Virology, 468, 565-580.
- Montezano, D. G., A. Specht, D.R., Sosa-Gomez, V.F., Roque-Specht, J.C., Sousa-Silva, S.V, Paula-Moraes, Peterson J.A., ve T.E. Hunt. (2018). Host plants of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas, Afr. Entomol, 26, 268–300.
- Morizono, K., Xie, Y., Olafsen, T., Lee, B., Dasgupta, A., Wu, A.M. ve Chen, I.S. (2011). The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry, Cell host and microbe, 9, 286-298.
- Moscardi, F., De Souza, M.L., De Castro, M.E.B., Lara Moscardi, M. ve Szewczyk, B. (2011). Baculovirus pesticides: present state and future perspectives, Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications, 415-445.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., ve Summers, M.D. (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, Springer Science ve Business Media.
- Neu, U., Allen, S.A.A., Blaum, B.S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A. S.ve Stehle, T. (2013). A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus, PLoS pathogens, 9.
- O'Hara, S. D. ve Garcea, R.L. (2016). Murine polyomavirus cell surface receptors activate distinct signaling pathways required for infection, MBio, 7.
- Ozsahin, E., Sezen, K. ve Demirbag, Z. (2015). Amsacta moorei Entomopoxvirus Encodes a Functional Esterase (AMV133) with Protease Activity, Intervirology, 58, 41-48.
- Ozsahin, E., van Oers, M.M., Nalcacioglu, R. ve Demirbag, Z. (2018). Protein–protein interactions among the structural proteins of Chilo iridescent virüs, Journal of General Virology, 99, 851-859.
- Papp, T., Spann, D. ve Marschang, R.E. (2014). Development and use of a real-time polymerase chain reaction for the detection of group II invertebrate iridoviruses in pet lizards and prey insects, J. Zoo Wildl. Med., 45, 219–227.
- Papp, T., ve Marschang, R.E. (2019). Detection and characterization of invertebrate iridoviruses found in reptiles and prey insects in Europe over the past two decades, Viruses, 11, 600.

- Piraino, F. (1967). The mechanism of genetic resistance of chick embryo cells to infection by Rous sarcoma virus-Bryan strain (BS-RSV), Virology, 32, 700-707.
- Ros, V.I. (2021). Baculoviruses: General Features (Baculoviridae), In Encyclopedia of Virology, 739-746.
- Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions, Current opinion in structural biology, 19, 507-514.
- Schneider-Schaulies, J. (2000). Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis, Journal of General Virology, 81.
- Schnitzler P., Soltau J.B., Fischer M., Reisner H., Scholz J., Delius H. ve Darai G. (1987). Molecular cloning and physical mapping of the genome of insect iridescent virus type 6: further evidence for circular permutation of the viral genome, Virology, 160, 66–74.
- Smith, K.M., 1976. Virus-insect relationships.
- Stehle, T. ve Khan, Z.M. (2014). Rules and exceptions: sialic acid variants and their role in determining viral tropism, Journal of virology, 88, 7696-7699.
- Stencel-Baerenwald, J.E., Reiss, K., Reiter, D.M., Stehle, T. ve Dermody, T.S. (2014). The sweet spot: defining virus–sialic acid interactions, Nature Reviews Microbiology, 12, 739-749.
- Stöhr, A.C., Papp, T. ve Marschang, R.E. (2016). Repeated detection of an invertebrate iridovirus in amphibians, J. Herpetol. Med. Surg., 26, 54–58.
- Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K.G., Whitt, M. A. ve Kawaoka, Y. (1997). A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein, Proceedings of the National Academy of Sciences, 94, 14764-14769.
- Tomko, R.P., Xu, R. ve Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses, Proceedings of the National Academy of Sciences, 94, 3352-3356.
- Van Den Bosch, R., Messenger, P.S. ve Gutierrez, A.P. (1982). An introduction to biological control (No. SB 975. V36 1982), New York: Plenum Press.
- Webby, R. ve Kalkmakoff, J. (1998). Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses, Archives of Virology, 143, 1949-1966.
- Webster, C.L., Longdon, B., Lewis, S.H. ve Obbard, D.J. (2016). Twenty-five new viruses associated with the Drosophilidae (Diptera), Evol. Bioinform. Online, 12, 13–25.

- Weinmann, N., Papp, T., Pedro Alves de Matos, A., Teifke, J.P. ve Marschang, R.E. (2007). Experimental infection of crickets (*Gryllus bimaculatus*) with an invertebrate iridovirus isolated from a high-casqued chameleon (*Chamaeleo hoehnelii*), J. Vet. Diagn. Investig., 19, 674–679.
- Whitley D.S., Yu K., Sample R.C., Sinning A. ve Henegar J. (2010). Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro, Virology, 405:448–4.
- Williams, T. (2008). Natural invertebrate hosts of iridoviruses (Iridoviridae), Neotrop. Entomol., 37, 615–632.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V. ve Chinchar, V.G. (2005). A decade of advances in iridovirus research, Advances in virus research, 65, 173-248.
- Wong H.H., Kumar P., Tay F.P., Moreau D., Liu D.X. ve Bard F. (2015). Genome-wide screen reveals valosin-containing protein requirement for coronavirus exit from endosomes, J Virol, 89, 11116–11128.
- Wool-Lewis, R.J. ve Bates, P. (1998). Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines, Journal of virology, 72, 3155-3160.
- Wrigley, N.G. (1969). An electron microscope study of the structure of *Sericesthis* iridescent virus. Journal of General Virology, 5, 123-134
- Yamauchi, Y. ve Helenius, A. (2013). Virus entry at a glance, Journal of cell science, 126, 1289-1295.
- Yan, X., Olson, N.H., Van Etten, J.L., Bergoin, M., Rossmann, M.G. ve Baker, T.S. (2000). Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses, Nat. Struct. Mol. Biol., 7, 101–103.
- Yan, X., Yu, Z., Zhang, P., Battisti, A.J., Holdaway, H.A., Chipman, P.R., Bajaj, C., Bergoin, M., Rossmann, M.G. ve Baker, T.S. (2009). The capsid proteins of a large, icosahedral dsDNA virus. J. Mol. Biol., 385, 1287–1299.
- Zhao Z., Ke F., Huang Y.H., Zhao J.G. ve Gui J.F. (2008). Identification and characterization of a novel envelope protein in *Rana grylio* virus, J Gen Virol, 89, 1866–1.
- Zhou S., Wan Q., Huang Y., Huang X. ve Cao J. (2011). Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088, Proteomics, 11, 2236–2.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra ZENGİN, ilkokulu 2003-2011 yılları arasında Cumapazarı İlköğretim Okulu'nda, liseyi ise 2011-2015 yılları arasında Of Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2015-2019 Eğitim-Öğretim yılları arasında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans öğrenimi aldı. 2020 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine kayıt oldu. 2020-2021 Eğitim-Öğretim yılları arasında Bilimsel Hazırlık Programını tamamladı. Bilimsel hazırlığın ardından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji bilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve halen burada öğrencidir. Yabancı dili İngilizcedir.