

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



**ALPHAHERPESVIRINAE ALT AİLESİNE
MENSUP VİRUSLARDA CRISPR/CAS9
ARACILI EŞ ZAMANLI VİRÜLENS GEN
SİLİNMESİ VE HETEROLOG GEN
EKLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Mustafa Ozan ATASOY

2020

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Şükrü TONBAK
Viroloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Şükrü TONBAK _____

Dr. Öğr. Üyesi Hakan IŞIDAN _____

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Şükrü TONBAK _____

Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA _____

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR _____

Prof. Dr. Kezban CAN ŞAHNA _____

Dr. Öğr. Üyesi Turhan TURAN _____

ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Mustafa Ozan ATASOY

Tarih:

İmza:

Prof. Dr. şükrü TONBAK

Viroloji Anabilim Dalı

Elazığ - 2020

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora öğrenimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda desteğini ve tecrübesini esirgemeyen, bu alanda yetişmemde büyük emeği bulunan tez danışmanlarım

Prof. Dr. Şükrü TONBAK ve Dr. Hakan IŞIDAN'a;

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım,

Dr. Turhan Turan, Dr. Muhammad Munir ve Dr. Mohammad Roahim'e;

Yetiştirip emek vererek bugünlere ulaşmamı sağlayan

Değerli Aileme;

Sevgili eşim **Uzm. Dr. Dilara ATASOY'a**

Tez çalışmaları sırasında burs desteğinde bulunan **YUDAB** birimine;
çalışmalardaki maddi desteği sağlayan **British Council'e** ve

Lancaster Üniversitesine

Teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma **Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)**

(BB/M008681/1 ve BBS/E/I/00001852) ve British Council (172710323 ve

332228521) projelerden sağlanan maddi desteklerle yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	xi
1. ÖZET.....	xiv
2. ABSTRACT.....	xvi
3. GİRİŞ	1
3.1. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Aşı Üretimi	2
3.1.1. Rekombinant Subunit Aşılar.....	3
3.1.2 Rekombinant DNA Aşıları	4
3.1.3 Rekombinant Konjuge Aşılar	6
3.2. Rekombinant Viral Vektörler ve Vektör Aşılar	7
3.2.1 Herpesviral Vektör Temelli Aşılar.....	9
3.3 CRISPR/Cas9 Teknolojisi.....	14
3.3.1 CRISPR Aracılı Bağışıklığın Mekanizması.....	14
3.3.2 Tip II CRISPR/Cas Sistemi	16
3.3.3 DNA Tamir Mekanizmaları.....	17
3.4. Bovine Herpesvirüs 1 Enfeksiyonları ve Aşı Stratejileri	19
3.5. Gallid herpesvirüs 1 Enfeksiyonları ve Aşı Stratejileri.....	25

4. MATERYAL VE METOT	32
4.1. Hücre Kültürü ve Virüs.....	32
4.2. Donör Plazmidinin ve gRNA Oligolarının <i>in silico</i> Tasarımı	33
4.3. gRNA oligolarının Plazmide Klonlanması ve Transformasyon	35
4.4. Donör Plazmidin Oluşturulması.....	38
4.4.1. DsRed'in Klonlanması.....	38
4.4.2. NDV füzyon (F) geninin Klonlanması	42
4.5. Rekombinant ILTV ve BHV-1' in Oluşturulması	47
4.5.1 BHV-1 Rekombinasyonunun Oluşturulması	47
4.5.2. ILTV Rekombinasyonunun Oluşturulması.....	49
4.5.3. Pozitif Olan Plakların Saflaştırılması ve Kültivasyonu	51
4.6. Reporter Genin Cre Rekombinazı Aracılığıyla Virüs Omurgasından Çıkarılması.....	52
4.7. Virüs Klonlarının Doğrulanması.....	53
4.8. Gen Ekspresyonunun Doğrulanması.....	54
4.9. İndirekt İmmunofloresan Analizi.....	57
4.10. Rekombinant Virüsün Stabilitésinin Saptanması.....	58
4.11. <i>In vitro</i> Çoğalma Karakteristiğı ve Plak Testi	58
5. BULGULAR.....	61
5.1. NHEJ-CRISPR/Cas9 Yaklaşımı ile Eşzamanlı Genlerin Silinmesi ve Ekspresyon Kasedinin Virüs Omurgasına Yerleştirilmesi.....	61

5.2. Ekspresyon Kasedi Olarak Eklenen DsRed'in Δ TK-GFP& Δ UL50-DsRed+F ILTV' den Cre-Lox Rekombinaz Aracılı Olarak Çıkarılması.....	66
5.3. ILTV Üzerinde NDV Füzyon Proteininin Stabil Açıklanması	69
5.4. Rekombinant ILTV' nin <i>In vitro</i> Replikasyonu ve Stabilitesi	70
6. TARTIŞMA	73
7. SONUÇ	83
8. KAYNAKLAR	85
9. ÖZGEÇMİŞ	98

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Aşıların genel sınıflandırılmasını gösteren şema. Üretilen tüm aşıların ortak prensibi: attenüasyon, inaktivasyon ve rekombinasyon.....	3
Tablo 2: Aşı çalışmalarında kullanılan bazı viral vektörlerin özellikleri ve örnekleri.	10
Tablo 3: Çalışmada kullanılan kılavuz RNA çiftleri ve genom üzerindeki PAM sekansları.....	34
Tablo 4: DsRed ve NDV-F genlerinin amplifikasyonunda ve amplifikasyonun doğrulanmasında kullanılan primer setleri.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: <i>S. pyogenes</i> için gRNA-Cas9 yapısının hedef DNA'ya tutunma ve kesme işleminin şematik gösterimi	16
Şekil 2: CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme ve tamir mekanizması.....	18
Şekil 3: gE geni silinen bir BHV-1 markır aşısının enfekte ya da attenüe canlı aşı ile aşılanan sığırlardan ayırt edilmesi (DIVA)	22
Şekil 4: NDV F geni ve DsRed reporter gen kasetlerini içeren pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS1-F/MCS2-DsRed plazmid haritası.	47
Şekil 5: Homoloji-bağımsız olarak GaHV-1 U _L 50 ve BHV-1 TK genlerinin silinerek yerlerine eşzamanlı, ILTV için DsRed ve NDV füzyon, IBR için sadece DsRed geninin insersiyonu	63
Şekil 6: Δ TK& Δ UL50-dsRED ILTV ile enfekte hücrelerin 3 gün içindeki farklı zamanlarda her iki reporter gen için immünfloresan mikroskop altında görüntülenmesi.....	65
Şekil 7: LMH hücre hatlarına Δ TK& Δ UL50-F(Cre) ILTV, Δ TK& Δ UL50-dsRED ILTV ve Δ TK-GFP inokulasyonu gerçekleştirilerek, enfekte hücreler çeşitli zaman dilimlerinde toplanıp her bir örnekten DNA eldesi sağlandı. <i>In vitro</i> çoğalma kinetiği <i>gB</i> genine yönelik gerçek zamanlı PZR metodu ile araştırıldı.	66
Şekil 8: LMH hücre hattı Cre-Rekombinaz ekspresyon plazmidi ile transfeke edilerek, post-transfeksiyon 24. saatte Δ TK& Δ UL50-DsRed'in inokulasyonu gerçekleştirildi. Yetmişikinci saatin sonunda Cre rekombinazı aracılığıyla DsRed kasedi çıkarılarak Δ TK& Δ UL50-F(Cre) suşunun eldesi sağlandı.....	67
Şekil 9: LMH hücre hattına Δ TK& Δ UL50-F(Cre) inokulasyonu gerçekleştirilmesinin ardından anti-FLAG antikoru kullanılarak indirekt	

immünofloresan antikor tekniği ile boyandı. Boyanan preparat konfokal mikroskop ile görüntülendi.	68
Şekil 10: 6 kuyucuklu pleytte üretilen monolayer LMH hücre hatları.....	68
Şekil 11. CRISPR/Cas9 ve Cre-Lox ile oluşturulan rekombinant ILTV suşlarının karakterizasyonu	70
Şekil 12: F geninin ILTV genomu üzerindeki entegrasyonunun iki farklı nesil için ortaya konulması.	71



KISALTMALAR

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

bç: Baz çifti

BEI: binary ethylenimine (ikili etilenimin)

BHV-1: Bovine alfaherpesvirus 1

BuDR: Bromodeoxyuridine (Bromodeoksiüridin)

BYK: Bakteri Yapay Kromozomu

cDNA: Complementary DNA (Komplementer DNA)

CEF: Chicken embryo fibroblast (Tavuk embriyo fibroblast)

CEO: Cell culture origin (Hücre kültürü orjinli)

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DEV: Duck Enteritis Virus (ördek enterit virüsü)

DIVA: Differentiation of infected from vaccinated animals (enfekte-aşılanmış hayvanların ayrımı)

dUMP: Deoksiüridin monofosfat

dUTP: Deoksiüridin trifosfat

dUTPaz: Deoksiüridin trifosfataz

dTMP: Timidin monofosfat

DSB: Double stranded break (Çift iplikte kırılma)

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EBTr: Embriyonik sığır trachea hücresi

FBS: Fetal bovine serum (Fötal sığır serumu)

GaHV-1: Gallid alfaherpesvirüs 1

Gfp: Green fluorescent protein (Yeşil floresan proteini)

gr: Gram

gRNA: guide RNA (kılavuz RNA)

HBV: Hepatit B Virüsü

HDR: Homology dependent repair (Homoloji bağımlı tamir)

HR: Homolog Rekombinasyon

HVT: Herpesvirus of Turkeys (Hindilerin herpesvirüsü)

IBR: Infectious Bovine Rhinotracheitis (Sığırların enfeksiyöz rinotrakeitisi)

ILTV: Enfeksiyöz laringotrakeitis virüsü

Indel: İnsersiyon/delesyon

kbç: Kilo baz çifti

LMH: Leghorn Male Hepatoma (Erkek Leghorn hepatoma)

mg: Miligram

ml: Mililitre

MDBK: Madin-Darby bovine kidney (Madin-Darby sığır böbrek hücreleri)

MHC: Major histocompatibility complex (Majör histokompatibilite kompleksi)

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

NDV: Newcastle disease virus (Newcastle hastalığı virüsü)

NHEJ: Non-homologous end-joining (Homolog olmayan uç birleştirme)

nt: Nükleotit

OmpA: Dış membran proteini A

Ori: Replikasyon orijini

PAM: Protospacer adjacent motif (Protospacer bitişindeki motif)

PBS: Phosphate-buffered Saline (Fosfat tampon solüsyonu)

PFU: Plaque Forming Unit (Plak oluşturan ünite)

pH: Power of Hydrogen (Hidrojen gücü)

rfp: Red fluorescent protein (kırmızı floresan proteini)

RGEN: RNA-guided endonuclease (RNA-kılavuzlu endonükleaz)

RPM: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)

sa: Saat

TCO: Tissue Culture Origin (Doku kültürü orjinli)

Tn: Transpozon

vt: Vahşi tip

1. ÖZET

CRISPR aracılı hassas gen düzenleme, prokaryotik konakçı-virüs ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar neticesinde keşfedilmiş, devrim niteliği taşıyan, önemli bir teknoloji olarak kabul edilmiştir. Biyoloji biliminin birçok alanında olduğu üzere günümüzde viroloji ve antiviral terapide sıklıkla başvurulmuş, güvenilir ve etkin bir araç haline gelmiş, özellikle viral gen *knockout* ve *knock-in* çalışmalarında kullanım alanı bulmasıyla öne çıkmıştır. Bu tez çalışmasında, *Alphaherpesvirinae* familyasına mensup *Bovine alphaherpesvirus 1* (BHV-1) ve *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1) model olarak alınmış, bu virüsler için sırasıyla timidin kinaz (*tk*) ve *dUTPaz* genleri CRISPR hedef bölgesi olarak seçilmiştir. Söz konusu bölgelere BHV-1 için bir kırmızı floresan protein geni (*rfp*) olan *DsRed*, GaHV-1 için ise *DsRed* ve Newcastle hastalığı virüsüne ait füzyon (*F*) geninin insersiyonu hedeflenmiş, bu amaçla insersiyon kasetleri donör plazmid üzerine yerleştirilen tuzak sekansları üzerinden aynı yöntem ile kesilerek serbest bırakılmıştır. Neticede GaHV-1 için *DsRed* ve *F* insersiyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından Cre-Lox Rekombinasyon metodu kullanılarak reporter geni çıkarılmış, geriye kalan heterolog *F* gen kasedinin başarılı bir biçimde eksprese olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca son ürün rekombinant virüsün, *tk* defektif ve çift heterolog gen taşıyan virüslere göre plak oluşturma ve zamana bağlı çoğalma kapasitesinde azalmanın olmadığı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak çalışmada CRISPR-Cre-Lox metodolojisi birlikte kullanılarak, GaHV-1 üzerinde eşzamanlı gen delesyon ve insersiyon gerçekleştirilmiş, böylelikle virüsün virülens faktörü silinerek attenüe edilirken aynı zamanda heterolog gen (*F* geni) taşıyan bir multivalan viral vektör elde edilmiştir. Bununla beraber BHV-1’de CRISPR aracılı gen düzenlemenin

gerçekleştirilebilmesi için yöntemin geliştirilerek uyarlanacağı yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: aşı, BHV-1, bivalan aşı, Cre-Lox, CRISPR, gen düzenleme, ILTV



2. ABSTRACT

Simultaneous Deletion of Virulence Genes and Heterologous Gene Insertions into the Viruses Belonging to *Alphaherpesvirinae* Subfamily Using CRISPR/Cas9 System

CRISPR-mediated precision genome editing is considered as a revolutionary technology, which was discovered as a result of intensive studies on prokaryotic host-bacteriophage interactions. Along with other branches in biology science, CRISPR comes forward a highly efficient, versatile tool frequently implementing in virology and antiviral therapy, especially in gene knock-out and knock-in studies. The main goal of this thesis study was to modify two members of *alphaherpesvirinae* subfamily, *Bovine alphaherpesvirus 1* (BHV-1) and *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1). For this purpose, thymidine kinase (*tk*) and *dUTPase* genes were targeted for BHV-1 and GaHV-1, respectively. A red fluorescent protein (*rfp*) gene, *DsRed* was aimed to insert in *tk* position of BHV-1, while *DsRed* and fusion (*F*) gene of Newcastle disease virus were chosen for the insertion of GaHV-1. A donor plasmid construction carrying desired gene sequences was excised via CRISPR bait sequences to release linear expression cassettes. As a result, both *DsRed* and *F* genes were successfully inserted into desired position of GaHV-1 genome. Next, *DsRed* reporter gene was erased from the viral genome with using Cre-Lox recombination system, and the *F* gene expression was proven to remain intact and functional. Finally, obtained recombinant virus possessed insignificant features in the aspects of plaque forming capacity and growth properties than *tk* deleted and double heterologous gene

carrying versions of GaHV-1. As a result, an attenuated, recombinant multivalent virus vector was successfully obtained by using CRISPR and Cre-Lox-directed simultaneous deletion of virulence factor and heterologous gene insertion (*F* gene) methodology. On the other hand, this methodology needs to be improved for optimally editing BHV-1 strain by further extensive studies on the methodology.

Keywords: bivalent vaccine, BHV-1, Cre-Lox, CRISPR, ILTV, gene editing, vaccine.



3. GİRİŞ

Çiçek hastalığına karşı ilk kez 1796 yılında Edward Jenner tarafından geliştirilen aşından bu yana aşı teknolojisi oldukça yavaş ilerlemiş, ancak bilimsel çalışmalardaki artış ve buna paralel olarak yeni teknolojilerin bulunması, virolojide, moleküler biyolojide ve aşı bilminde yeni yaklaşımların ortaya çıkmasını sağlamıştır. İlk olarak Louis Pasteur tarafından tanımlanan, etken mikrobun zayıflatılarak immun yanıtı tetiklemek üzere canlıya uygulanması prensibi, kuduz, kolera, antraks, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) tüberkülozu gibi hastalıklara karşı üretilen aşılardan temeli oluşturmuştur. Bu aşılardan günümüzde “birinci nesil” aşılardan olarak adlandırılmış olup bu gün hala kullanılan aşı kaynağının %95’ini kapsamaktadır (1, 2, 3). Gerek canlı-attenüe aşılardan tekrar doğal enfeksiyöz formuna dönmesi sorununa çözüm arayışı, gerekse tersine genetik çalışmaları ile genlerin fonksiyonlarının anlaşılması “ikinci nesil” aşılardan geliştirilmesine ön ayak olmuştur. Bu aşılardan subunit elementler, rekombinant ya da sentetik proteinler; protein olmayan antijenler ve çeşitli türlere ve suşlara ait molekül ve epitoplardan oluşan bakteriyel ya da viral immunojenlerin açıklatılması temeline dayanmaktadır. Subunit aşılardan, konjuge aşılardan ve DNA aşılardan bu ikinci nesil aşılardan dahil edilmektedir (2, 4, 5).

Viroloji disiplininde “rekombinant aşı teknolojisi”, viral vektöre ait proteinler ile birlikte istenilen bir proteinin rekombinant ekspresyonuna dayanan bir aşı geliştirme yöntemidir. Bu sayede hücre kültürü çalışması sınırlı olan ya da yapılamayan virüslere karşı aşı geliştirmeyi mümkün kılmaktadır. Ayrıca yapılacak biyoişlemin türüne göre değişiklik gösteren güvenlik risklerini en alt seviyeye

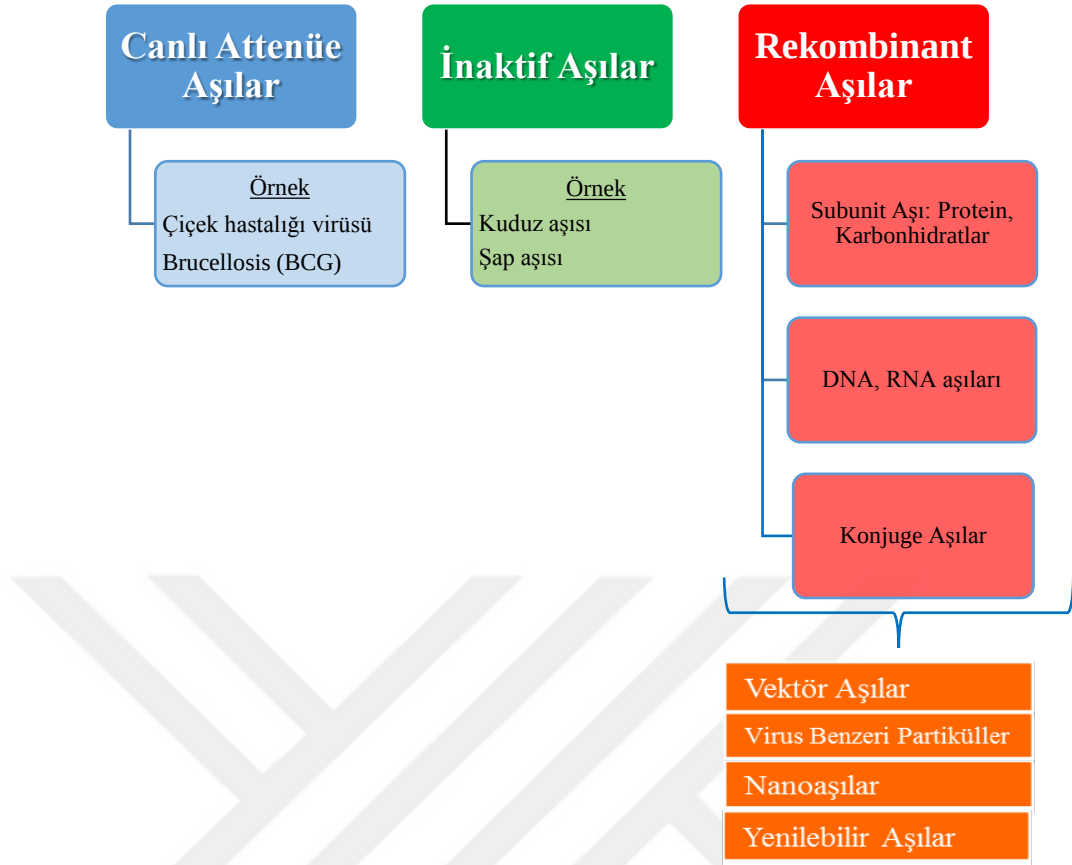
indirerek özellikle pandemi durumlarında acil bir ihtiyaca karşılık olarak aşı üretim süresini azaltmaktadır (6, 7).

3.1. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Aşı Üretimi

Rekombinant aşı, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen aşılar için kullanılan genel bir tanımdır. Rekombinant DNA'nın üretimi şu adımları takip etmektedir (8):

- İlgilenilen DNA (klonlanmış DNA, insert DNA, hedef DNA ya da yabancı DNA) ekstrakt olarak elde edilir, enzimatik olarak ayrıştırılır (kesim ya da dijesyon) ve başka bir DNA yapısı ile (klonlama vektörü) birleştirilmesi (ligasyon) sağlanır. Böylece yeni, rekombinant DNA molekülü (klonlama vektörü, insert DNA yapısı ya da DNA yapısı) elde edilir.
- Bu klonlama vektörü-insert DNA yapısı bir konak hücreye transfer edilerek burada çoğaltılması sağlanmaktadır. DNA yapısının bakteri konak hücresi içine aktarılması işlemine “transformasyon” adı verilir.
- Bu konakçı hücreler içerisinde istenilen geni taşıyan DNA yapısını bulunduranlar tespit edilerek seleksiyon ile (seperasyon ya da izolasyon) bulundurmayan hücrelerden ayrıştırılır.
- Bazı durumlarda vektör DNA'lar, konakçı hücrelerinde istenilen geni direkt olarak açıklayabilecek şekilde düzenlenebilmektedir.

Rekombinant aşılar DNA aşıları, subunit aşılar ve konjuge aşılar olarak gruplandırılmakta ve bunların her biri canlı ya da cansız aşı özelliğinde olabilmektedir (Tablo 1) (9).



Tablo 1: Aşıların genel sınıflandırılmasını gösteren şema. Üretilen tüm aşıların ortak prensibi: attenüasyon, inaktivasyon ve rekombinasyon (9).

3.1.1. Rekombinant Subunit Aşılar

Bakteri yüzey proteini ya da viral yapı proteini gibi vücutta immun yanıt oluşturabilen bir antijeni kodlayan DNA sekansının memeli hücresine ya da bakteriye aktarılması, bu bakteride genin açıklatılarak proteine dönüştürülmesi ve bu proteinin yüksek saflıkla saflaştırılması esasına dayanan aşılar “rekombinant subunit” aşılarıdır (5). Bu teknoloji ile 1984 yılında üretilen ilk lisanslı aşı olan Hepatitis B (HBV) aşısı, virüsün yüzey antijen geni (HBsAg), alkol dehidrojenaz I enzimi promotoruna bağlı plazmide aktarılması, daha sonra *Saccharomyces cerevisiae*’nin bu plazmid ile transfekte edilerek genin açıklatılması ile üretilmiştir.

Bu aşı, hasta bireylerin kan serumundan saflaştırılan virüse ait S proteininin kullanıldığı aşılarından sonra önemli başarı sağlamıştır (10, 11). Daha sonra Fikrig ve ark. (1990) tarafından Lyme hastalığı etkeni *Borrelia burgdorferi*'ye ait dış yüzey proteinini kodlayan *OspA* genini *Escherichia coli*'de açıklatarak elde edilen protein ile aşı üretimi gerçekleştirmiştir (12).

İnsan sitomegalovirüsü (HCMV) için oluşan nötralizan antikor yanıtın %70'i glikoprotein B (gB) yüzey proteinine karşı şekillenmektedir (13). HCMV için geliştirilen subunit aşı, yapılan bir dizi modifikasyon ile salgılanabilir forma kavuşturulan gB antijeninin Çin hamsteri ovaryumu (CHO) hücre hattında açıklatılması ile rekombinant olarak elde edilmiştir (14).

Subunit aşılar genel itibariyle hastalık oluşturmaz, pürifiye antijen içeriği dolayısıyla yan etkisi sınırlıdır ve immunsupresif canlılarda da kullanımı güvenli olarak kabul edilmektedir. Öte yandan subunit aşılar canlı attenüe aşılarla göre daha az immunojeniktir. Bu nedenle subunit aşıların geliştirilmesinde immunojenitesi yüksek ve nötralizan antikor oluşturma yeteneği olan antijen(ler)in seçilmesi aşı başarısını direkt etkileyen önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır (9, 15).

3.1.2. Rekombinant DNA Aşıları

Rekombinant DNA aşıları, antijenik niteliği olan bir proteinin genetik kodunu taşıyan ökaryotik ekspresyon vektörünün *E. coli* gibi bir vektörde çoğaltılıp kromatografik metotlar ile saflaştırıldıktan sonra doğrudan (*in situ*) canlıya uygulanması esasına dayanır (9). Rekombinant aşılarında vektör DNA'nın bazı biyolojik bariyerleri aşarak mRNA'ya transkripte olabilmesi gerekmektedir. Bu

amaçla vektörlerin lipozom ile kaplanması ya da dendrimerlere bağlanması gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (16).

Veteriner hekimlikte ilk rekombinant DNA aşı örnekleri, atlarda West Nile virüsü (WNV) ve atların arteritis virüsüne (EAV) karşı geliştirilen aşılardır. Davis ve ark. (2001), sitomegalovirüs promotoruna bağlanmış WNV'ye ait premembrane (*prM*) ve zarf (*E*) genleri klonlanmış CVBN plazmidi tek doz halinde elektroporasyon yöntemi ile deri yoluyla atlara uygulamış ve aşının etkinliğini serolojik ve klinik olarak kanıtlamıştır (17). Aynı yöntem ile EAV'ye ait glikoprotein ve nükleokapsid genlerini taşıyan ekspresyon plazmidleri, at interleükin 2 (*hIL-2*) taşıyan başka bir ekspresyon plazmidi ile kombine edilerek aynı yöntem ile altı adet ata uygulanmış ve sonuçta uzun süreli koruyucu humoral bağışıklığın meydana geldiği gösterilmiştir (18). Son olarak yine *flaviviridae* ailesine mensup, son yıllarda önem kazanan bir hastalık etkeni olan Zika virüs için de WNV ile aynı vektör platformunun kullanıldığı DNA aşı çalışması mevcuttur (19).

DNA aşılarının temel avantajı, canlı vektör ya da karmaşık biyokimyasal teknik gerektirmeksizin hem humoral hem de hücresel seviyede bağışıklığı uyandırabilmesidir. Ayrıca yüksek özgünlükte, orjinal konformasyona sahip (aynı glikozilasyon ve post translasyonel modifikasyonu sağlayan) antijeni üretme imkanı sunabilmesidir. Öte yandan plazmid DNA'nın sadece %1'i fagositoz ve pinositoz yoluyla hücreye alınmakta, bunun da ancak onda biri nükleus por membranından geçebilmektedir. Ayrıca ender de olsa DNA aşıları onkogenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. DNA aşıları immunizasyon etkinliği düşük olduğundan adjuvantlar ile birlikte kullanılmaktadır (9, 20).

3.1.3. Rekombinant Konjuge Aşılar

Konjuge aşılar, temelde zayıf antijenik özellikteki bir antijen ile kuvvetli bir antijenin birleştirilerek zayıf antijene karşı immun yanıtın oluşturulması esasına dayanmaktadır. Protein alt üniteler fagosit olduktan sonra endozomal olarak yıkımlanır ve MHC II aracılığıyla antijenik peptid olarak sunulur. Ancak glikoprotein yapısındaki antijenler T hücresinden bağımsız B hücre yanıtını tetiklemektedir. Dolayısıyla güçlü bir immun yanıtın oluşabilmesi için bir proteine bağlanmaktadır (konjugasyon) (21).

İlk konjuge aşı, Ward ve ark. (1984) tarafından *Haemophilus influenza* tip b (Hib)'e ait kapsüler polisakkaritin (poliribozilribitol fosfat) difteri toksoidine (D) kimyasal metot ile kovalent olarak bağlanması neticesinde oluşturulmuştur (22). Konjugasyon kimyası oldukça karmaşık olup bazen kontrol dışı sebeplerden dolayı üretilen partilerde farklılıklar meydana gelebilmekte, ya da oluşturulan glikoproteinde beklenilenden farklı formasyonlar oluşabilmektedir (9, 15)

Campylobacter jejuni'nin ökaryotlar dışında N-bağlı glikozile proteinlere sahip olduğunun keşfi (23) ile birlikte glikozilasyon mekanizmasını oluşturan gen kümesi *E. coli*'de fonksiyonel olarak eksprese edilmiş, dolayısıyla asıl organizmasında glikozile olmayan proteinlerin *E. coli* aracılığıyla N-bağlı glikoprotein şeklini üretmek mümkün olmuştur (24). Örnek olarak, Pore ve ark. (2011), *Shigella flexneri*'ye ait "dış membran proteini A" (OmpA)'yı *E. coli*'de üretmiş, daha sonra farelerde sistemik çelinç denemesiyle koruyuculuğunu ispatlamışlardır (25). Aynı şekilde Martinez-Becerra ve ark. (2013) tip 3 sekresyon sistemini (T3SS) kontrol eden IpaB ve IpaD proteinlerini rekombinant füzyon proteini olarak üreterek farelerde letal doz pulmoner enjeksiyon denemelerinde S.

flexneri ve *S. sonnei*' ye karşı koruma sağladığını bildirmiştir. Shigella alt türlerinde bu sistem, bakterinin apoptozis indükleyici unsurlarının makrofajlara enjekte edilerek fagositlerden kaçmasını sağlamaktadır (26).

Konjuge aşılar hastalık oluşturmama özelliğine sahip olmasından dolayı immunsuprese hastalarda kullanılabilmekte, yan etki oluşturmamaktadır. Ancak bu aşılarda seri üretimi diğer aşılara göre daha maliyetlidir. Ayrıca taşıyıcı proteinin seçimi de aşının immunojenitesi açısından önemli bir yer teşkil etmektedir (15).

3.2. Rekombinant Viral Vektörler ve Vektör Aşılar

Son yıllarda viral vektör temelli rekombinant aşı teknolojisi araştırmaları dünya genelinde popülerliği giderek artan bir çalışma alanı haline gelmiştir. Bu durum özellikle biyoloji alanında geliştirilen yeni teknolojilerin moleküler viroloji disiplinine uyarlanması ile kayda değer biçimde ortaya çıkmıştır. “Canlı” rekombinant aşı vektörleri istenilen etkinlikte ve yenilikçi aşılarda üretilmesinde kilit rol oynamaktadır. Özellikle DNA virüs aileleri; *poxviridae*, *herpesviridae*, *adenoviridae*, *parvoviridae* ve *asfarviridae* viral vektör olarak sıklıkla tercih edilmektedir (27).

Viral vektörler, hücreleri enfekte edebilme özellikleri sayesinde gen terapisi ya da aşılama amacıyla bir genetik materyalin canlıya aktarılmasını sağlayan elementlerdir. Viral vektörler etkin bir şekilde gen transdüksiyonunu sağlayabilmektedir, hedef hücreye yüksek özgünlüktedir ve hücre aracılı immünitinin de dâhil olduğu geniş kapsamlı bir immün yanıtı ortaya çıkarabilmektedir (28).

Viral vektörler üzerine yürütülen çalışmalar virüsün replikasyon kompetanlığı ile virülensi ve bağışıklığı uyarıcı etkisi arasında direk ilişkinin olmadığını ortaya koymuştur (29). Dolayısıyla, viral vektör olarak sıklıkla düşük patojeniteli ya da apatojenik virüs suşları tercih edilmektedir (28). Örneğin; Ankara Modifiye çiçek aşı virüsü (MVA) embriyolu tavuk yumurtasında yapılan birkaç yüz nesil pasajdan sonra memeli hücrelerinde üretken enfeksiyon oluşturma yeteneğini kaybetmiş bir suş olup, aşı vektörü olmaya uygun olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (30, 31).

İlk viral vektör, her ikisi de *EcoRI* ile digeste edilerek linear hale getirilen Simian virüs 40 (SV40) genomunun 5' ucuna adenilat ve λ dvgal 120 genomunun 3' ucuna timidinilat kuyruklarının eklenmesi ve birbirine eşlenik bu uçlar aracılığıyla iki materyalin birbirine bağlanması ile (SV40- λ dvgal 120 kimerik DNA) oluşturulmuştur (32). Vaccinia virüse ait esansiyel olmayan timidin kinaz (*tk*) gen pozisyonuna adenovirüs tip 18 E fragmanı eklenerek bromodeoksiüridin (BUdR) seleksiyonu ile rekombinant vektör eldesi sağlanmış; aynı çalışmada *tk* vaccinia virüs genomuna herpesvirüse ait *tk* geni eklenerek antiviral aracılı seleksiyon prensibi kanıtlanmıştır (33). Bu prensip ile üretilen ilk vektör aşı Hepatitis B aşısıdır: Hepatitis B yüzey antijen (HBsAg) proteinini kodlayan açık okuma penceresi, *tk* sentezini başlatıcı promotora bağlanarak rekombinant virüs üretilmiş, sonra *tk* virüs BUdR seleksiyonu ile saflaştırılarak karakterizasyonu yapılmıştır (34).

Vektör olarak kullanılacak her bir virüs, doğası gereği taşıdığı özelliklere göre birtakım avantajlara ya da dezavantajlara sahiptir. Örneğin; vaccinia virüs attenüe olmasının yanında kuvvetli bir immün uyarıcı olması, özellikle sitotoksik T

lenfositleri harekete geçirebilmesi özelliği ile vektör olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca viral vektörler adjuvanta gerek duymaksızın yüksek immünojenite gösterirken viral yapısal elementler doğal bağışıklığı uyarak interferon ve yangı sitokinlerini aktif hale getirmektedir (28). Günümüzde kullanılan bazı viral vektörlerin özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

3.2.1. Herpesviral Vektör Temelli Aşılar

Herpesvirüsler omurgalı hayvanların çift iplikli DNA virüsü olup 150-240 kbç. uzunluğunda bir genoma sahiptir. Herpesvirüslerin ortak özellikleri konakçıya karşı sıkı bir özgüllükte olmaları, enfekte ettikleri konakçıda ömür boyu latent kalabilmeleri ve litik çoğalma göstermeden konakçıda varlığını sürdürebilmeleridir. Öte yandan tüm herpesvirüsler nükleik asit metabolizmasını düzenleyici, nükleik asit sentezletici ve protein işleyici bir dizi enzimi barındırmaktadır (35, 36).

Herpesvirüsler kullanım alanlarına göre üç temel gruba ayrılabilir: (i) onkolitik virüsler, (ii) rekombinant aşı vektörleri ve (iii) yüksek kapasiteli gen taşıyıcı vektörler (37).

3.2.1.1 Herpesviral Vektörlerin Gen Mühendisliği

Herpesviral vektörlerin rekombine edilmesi temelde mutasyon ve fonksiyonel analizler ile belirlendikten sonra alt-klonlanmış genlerin viral genom ile buluşturulmasına dayanmaktadır. Herpes Simplex virüs (HSV) genomu bu noktada rekombine edilen ilk viral genomdur. Kısaca, HSV genomu *BamHI* enzimi ile kesilerek tk genini de içeren parça pd2 plazmidine klonlanmış, daha sonra bu gen üzerinde bulunan *PstIC* parçası çıkarılarak tk geni üzerinde delesyon mutasyonu oluşturulmuştur.

Virüs	Avantaj	Dezavantaj	Heterolog Gen İnseriyon Örneği	Referans
Retrovirüs	✓ Uzun süreli gen ekspresyonu.	✗ Replikasyon kompetan bir virüsün üretilmesi risklidir. ✗ Tümörögenез riski vardır. ✗ Sadece bölünen hücreleri enfekte edebilir.	Hantavirüs zarf glikoproteini	(38)
Poxvirüs	✓ Güvenli, Yüksek, ✓ İmmunojenite, ✓ Yüksek miktarda üretilebilir.	✗ Canlıda önceden gelişen immün yanıt olma ihtimali vardır. ✗ Potansiyel sitotoksiktir. ✗ Transgenik ekspresyonu kısa sürelidir	Mavdil virüsü VP2, NS1 ve VP7 genleri	(39)
Adenovirüs	✓ Güvenli, ✓ Yüksek Titrede üretim, ✓ Hemen hemen tüm hücreleri her fazda enfekte edebilir.	✗ Canlıda önceden gelişen immün yanıt olma ihtimali çok yüksektir. ✗ Transgen ekspresyonu kısa sürelidir.	Küçük Kuminant Vebası virüsü H geni	(40)
Adeno-associated virüs	✓ Uzun süreli gen ekspresyonu, ✓ Non-patojenik, ✓ Sitotoksik T hücre yanıtını indükleyebilir.	✗ İnseriyon kapasitesi düşüktür ✗ Entegrasyon özelliği tam olarak anlaşılamamıştır.	Hepatitis C virüsü genotype 1b' ye ait NS3 ya da NS3/4	(41)
Herpesvirüs	✓ Büyük miktarda yabancı antijeni taşıyabilir. ✓ Hemen hemen tüm hücreleri her fazda enfekte edebilir. ✓ Nörotropik özelliği sayesinde nöronlara gen taşınabilir.	✗ Canlıda önceden gelişen immün yanıt olma ihtimali çok yüksektir. ✗ Latent enfeksiyon oluşturmaktadır.	Bovine Viral Diyare Virüs glikoprotein E2 ve Bovine Alfaerpesvirüs 1 glikoprotein D	(42)

Tablo 2: Aşı çalışmalarında kullanılan bazı viral vektörlerin özellikleri ve örnekleri.

Daha sonra plazmid ve *tk* geni taşıyan HSV ile Vero hücre hattı kotransfekte edilmiş ve 5-bromodeoksiüridin içeren vasat ile inkübe edilerek virüs-plazmid arasında parça değişimi (Crossover) meydana getirilmiş, böylelikle ilk *tk* HSV üretilmiştir (43). *Herpesviridae* ailesine dahil sitomegalovirüs ile yapılan başka bir çalışmada *LacZ* geni, β -gen promotoru ve SV40 poliadenilasyon bölgesinden oluşan gen kasedi viral genomun majör β gen bölgesine aktarılmıştır (44). Rekombinasyon temelli bu metotlarda *LacZ* ya da *tk* gibi seleksiyon markırların kullanılması zorunludur. Bu metotoloji oldukça fazla laboratuvar pratiği gerektirmekte, ayrıca progeni virüsün seleksiyon baskısı nedeniyle rekombinant virüste eş zamanlı mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir (45).

Bakteri yapay kromozomunun (Bacterial Artificial Chromosome; BYK) keşfi ile birlikte herpesvirüs genomu gibi büyük DNA genomlarında modifikasyon meydana getirilmesi oldukça kolaylaşmıştır. BYK, temel olarak genom haritalandırma ya da analiz amacıyla plazmid F (fertilite) faktöründen üretilen, 300 kbç.' den fazla bir DNA genomunu stabil olarak bulundurabilen bir yapıdır (46). Herpesviral BYK'ye ilişkin ilk çalışma Messerle ve ark. (1997) tarafından fare sitomegalovirüsünde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada viral genom ile birlikte BYK'yi ve rekombine edilecek noktanın homolog uçlarını taşıyan plazmid, ökaryotik hücreye aktararak hücrede rekombinasyon ile mini-F sekansını ve seleksiyon markırını (guanin fosforibozil transferaz) taşıyan sirküler ara form (CMV-BYK-vt) haline gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra CMV-Bac-vt için istenen mutasyonu sağlayacak (çalışmada *IE-1* geni) taşıyıcı plazmid, elektroporasyon yoluyla *E.coli*'ye aktararak *IE-1* mutasyonu taşıyan BYK (CMV-Bac-Mut) elde edilmiştir. En son mutant BYK tekrar ökaryot hücreye aktararak buradan *IE-1*

geni silinmiş CMV virionlarının salınması sağlanmıştır (47). BYK'nin virüs üzerindeki istenmeyen etkisinin giderilmesi için BYK üzerine LoxP bölgeleri bulundurulmaktadır. Virüsün hücredeki enfeksiyonunun izlenmesi için yeşil floresan proteini (gfp) ve memeli hücresindeki seleksiyonu kolaylaştırmak için higromisin direnç geni yine BYK'ye ayrı ayrı ya da kombine olarak dahil edilebilmektedir (48). BYK'nin en önemli avantajı *E.coli* kullanılarak herpesvirüs genomu üzerinde istenilen bir noktada ya da rastgele mutasyonların oluşturulmasına olanak sağlamasıdır.

Rastgele mutasyon oluşturmada “transpozon aracılı mutagenesis” metodu sıklıkla kullanılmaktadır. Yer değiştirebilen genetik elementlerin (transpozonlar; Tn) örneğin bir antibiyotik direnç geni ile beraber transpozaz (tnpA) ve resolvaz (tnpR) aracılı olarak BYK üzerine rastgele entegrasyonu sayesinde viral genlerde veya sekans elementlerinde insersiyon mutagenesi meydana getirilebilmektedir (45). Brune ve ark. (1999) fare sitomegalovirüsü üzerindeki esansiyel ve esansiyel olmayan genlerin tespiti için viral genomu sirküler BYK haline getirerek sirküler genoma affiniteli Tn1721 transpozonu derivelerini taşıyan plazmid ile birlikte *E.coli*'ye transforme etmiş, ardından transformantların kloramfenikol ve ampicillin seleksiyonunu gerçekleştirmiştir. Transpozisyonun olduğu BYK'ler, Tn ile taşınan kanamisin ve BYK'de bulunan kloramfenikol direnç kasetleri aracılığıyla 42°C'de tekrar selekte edilerek rastgele mutasyon taşıyan viral varyantları elde edilmiştir (49).

“RecA temelli mutagenesis” ya da “mekik vektör mutagenesi”; *E.coli*'de meydana getirilen konvansiyonel homolog rekombinasyonun taşıyıcı RecA rekombinazı aracılığıyla kolaylaştırılması esasına dayanmaktadır. RecA, donör

olarak kullanılmakta, içerisinde pozitif ve negatif seleksiyon markırları, hedef gen bölgesinin homolog uçları ve sıcaklığa duyarlı replikasyon orijini (ori) taşıyan bir mekik vektör aracılığıyla bakteriye aktarılmaktadır. Bakteri içerisinde homolog rekombinasyon (HR) gerçekleştirilerek pozitif seleksiyon markırı ve ori aracılığıyla seleksiyona tabi tutulmaktadır. Böylelikle tüm BYK kasedi viral genoma yerleşmiştir. Daha sonra ikinci bir HR işlemi ile bu sefer negatif seleksiyon markırı ve ori seleksiyonu ile birlikte eklenen BYK yapısının çıkarılarak geriye sadece mutasyonun kalması sağlanmaktadır (45).

“E/T Rekombinasyon sistemi” λ bakteriyofajından derive alternatif bir yöntem olup sadece 30-50 bç. homolog uç ile rekombinasyon oluşturabilmektedir. Örneğin, Schumacher ve ark. (2000) tarafından *Gallid alphaherpesvirus 2*'nin (Marek hastalığı virüsü) US2 lokusu üzerine tavuk embriyo fibroblast (CEF) hücreleri aracılığıyla kloramfenikol ve gpt eklenerek BYK'ye çevrilmiş daha sonra kloramfenikol markırı ile *E. coli*'de seleksiyonu sağlanmıştır. Daha sonra *gB* geni RecE ve RecT ile katalizlenen HR ile silinerek yerine kanamisin eklenmiştir (45, 50).

“Cre/LoxP aracılı rekombinasyon sistemi” ilk kez Hamilton (1981) tarafından P1 bakteriyofajında tanımlanmıştır (51). Sistem, adını rekombinasyon oluşturan, integras süperailisine dahil 38 kDa-Cre enzimi ve bu enzimin tanıdığı bağlanma bölgesi olan LoxP motifinden almaktadır. LoxP motifi ise P1 fajı için 13 bç. uzunluğunda iki adet simetrik tanıma bölgesi ve ikisinin arasında 8 bç.'lik ara (spacer) sekanstan ibarettir. Eğer bir DNA ipliğinin üzerinde aynı oryantasyonda bir çift LoxP motifi mevcut ise, bu iplik Cre ile rekombine edildiğinde iki LoxP arasındaki gen parçası kesilerek çıkarılmış olur (52, 53).

3.3. CRISPR/Cas9 Teknolojisi

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR), "Düzenli Aralıklarla Dizilmiş Palindromik Tekrarlar Kümesi" ve CRISPR ilişkili protein olan "Cas" (CRISPR Associated) birlikte prokaryotların yabancı genomlara (faj, plazmid ya da diğer mobil genetik elementler) karşı edinilmiş bağışıklık sistemini oluşturan bir RGEN (RNA-guided endonuclease; RNA kılavuzlu endonükleaz)'dir (54). RGEN'in keşfi genom düzenlemede devrim niteliği taşıyan bir gelişme olup gen müdahalesinde yeni ufukların açılmasını sağlamıştır.

3.3.1. CRISPR Aracılı Bağışıklığın Mekanizması

CRISPR-Cas aracılı immünite üç basamakta incelenmekte olup bunlar sırasıyla "adaptasyon", "ekspresyon" ve "interferens" olarak adlandırılmaktadır. Adaptasyon, konakçıya bulaşan, söz gelimi bir fajın genomundan bir sekansın (protospacer) Cas proteini tarafından CRISPR genomuna yeni bir "spacer" olarak eklenmesidir. Eklenen bu spacer sayesinde yabancı DNA'nın gelecekteki olası enfeksiyonuna karşı bağışıklık edinilmiş olur. Protospacerlerin birçoğu genellikle değişkenlik göstermeyen kısa bir sekans ile sonlanmaktadır. Protospacerin yakınında başlayan bu motif sekansa "Protospacer Bitişindeki Motif" (Protospacer Adjacent Motif: PAM) adı verilmekte ve muhtemelen CRISPR genetik düzeni üzerinde yeni spacerin eklenirken tanınmasını sağlamaktadır (55, 56).

İkinci aşama CRISPR ekspresyonu olarak isimlendirilir. Bu aşamada CRISPR gen bölgesi küçük CRISPR RNA'sı (crRNA) oluşturmak üzere

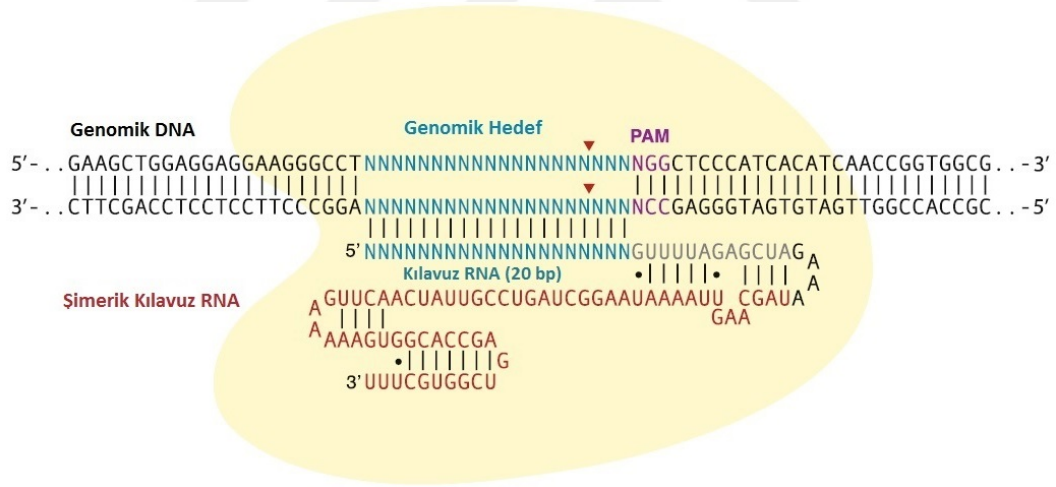
transkripte olur. crRNA'nın ilk transkripsiyon haline primer transkript crRNA (pre-crRNA) adı verilir. Daha sonra pre-crRNA özel endonükleaz enzimleri ile kesilerek küçük CRISPR RNA'larına dönüştürür. Hedeflendirme ya da interferens aşaması adı verilen son aşamada ise işlenmiş crRNA Cas nükleazı ile etkileşime girerek ribonükleoprotein (RNP) yapısı haline gelir ve istilacı genom üzerindeki hedef sekansa yönelir. Bu yapıya CASCADE (CRISPR-ilişkili Antiviral Savunma Mekanizması) adı verilmektedir (55, 56).

Organizmaların birçoğunda yabancı genomik DNA ya da RNA ile cr-RNA neredeyse mükemmel bir şekilde eşleşerek kesim işlemini başlatır. Yabancı genom ile CRISPR genomu üzerinde birbiri ile eşleşmeyen nükleotidler varsa, ya da PAM motifi üzerinde bir mutasyon mevcutsa kesim gerçekleşmemektedir (55, 56).

Günümüzde beş çeşit CRISPR mekanizması (I-V) tanımlanmış olup bunlar içerisinde Tip I ve Tip III'ün örtüşen bazı özellikleri mevcuttur: Öncül crRNA'lar özelleşmiş bir dizi Cas endonükleazı aracılığıyla olgunlaştırılır. Daha sonra her bir crRNA büyük bir multi-Cas yapısıyla birleşerek genom üzerindeki crRNA komplementlerini tanıyıp kesebilecek forma dönüşür. Ancak Tip II sistemi öncül crRNA'ları olgunlaştırmak için farklı bir yol izler: pre-crRNA'nın 3' ucundaki tekrar sekansına komplementer bir "trans-etkinleştirici" crRNA (tracrRNA), Cas9 (Csn1)'un bulunduğu ortamda çift iplikli RNA işleyebilen RNAz III'ü tetikleyerek olgun crRNA'ların oluşmasını sağlamaktadır. Cas9, Tip II CRISPR sisteminde yabancı DNA susturucu tek enzim özelliği göstermektedir (57).

3.3.2. Tip II CRISPR/Cas Sistemi

Cas9'un efektör protein olarak kullanıldığı Tip II CRISPR sistemi, günümüzde en sık kullanılan ve en iyi anlaşılan sistem olup yapıtaşları *Streptococcus pyogenes*'den izole edilen Cas9 enzimi (spCas9) ve onu yönlendiren bir kılavuz RNA (gRNA)'dan ibarettir. gRNA hedef genom üzerindeki 20 bp. uzunluğundaki bir gen bölgesini tanıırken Cas9 enzimi kılavuzun 3' ucundaki NGG motifini tanıma özelliğine sahiptir. Bu iki unsur beraber çalışarak bağlandığı motif üzerinde DSB (Double Stranded Break; Çift iplikte kırılma) meydana getirmekte (Şekil 1) ve daha sonra bu bölge canlının onarım mekanizmaları aracılığıyla tamir edilmektedir (57, 58).



Şekil 1: S. pyogenes için gRNA-Cas9 yapısının hedef DNA'ya tutunma ve kesme işleminin şematik gösterimi. Cas9 proteini PAM sekansını bulurken, kılavuz RNA ile genomik DNA arasında baz eşleşmesi (hibritleşme) meydana gelmektedir. Daha sonra Cas9 tarafından çift iplikte kırılma oluşmaktadır (59).

Cas9 proteini biyolojik olarak hedefi tanıma ve nükleaz bölgeleri olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Hedefi tanıma bölgesi RNA DNA heterodupleks

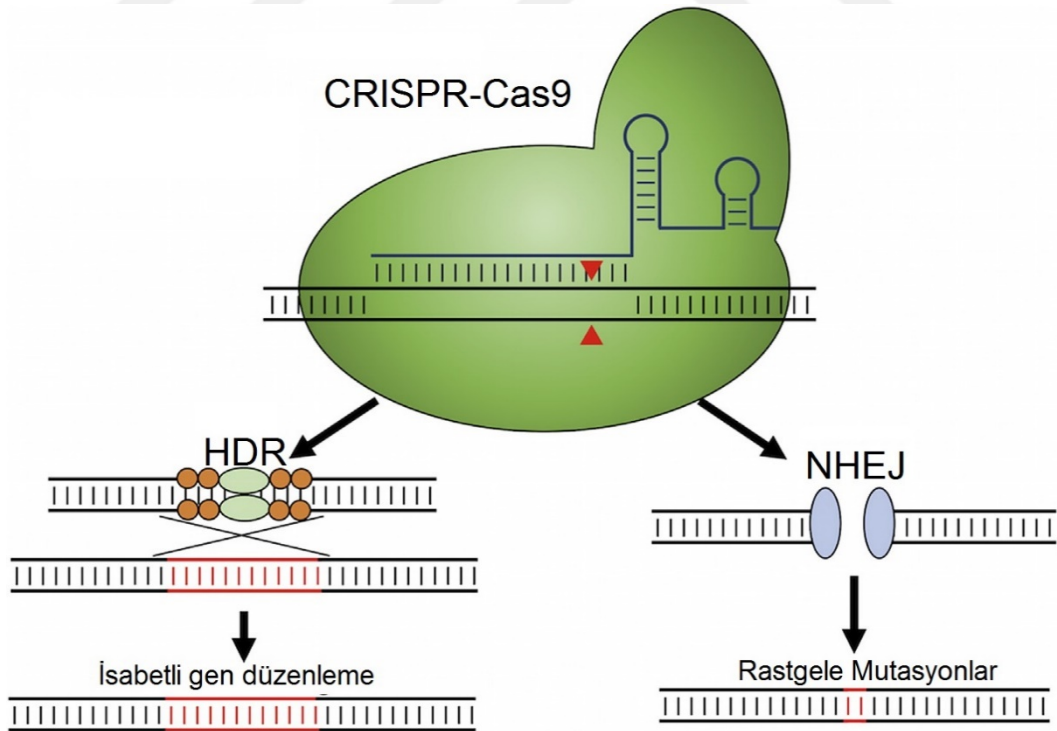
yapısının oluşması için gereklidir. Nükleaz bölgesi ise HNH ve RuvC alt ünitelerinden oluşmakta ve yabancı DNA ile eşleşme sırasında HNH komplementer, RuvC komplementer olmayan sekansa tutunmaktadır. Ayrıca nükleaz bölgesinin PAM motifini tanımaktan sorumlu bir alt ünitesi daha mevcuttur. Her bir alt ünite bulunduğu bir ipliği keserek DSB meydana getirir. Böylelikle PAM sekansının 5' ucuna doğru yaklaşık 3-4 nükleotid önünden kesim gerçekleşmektedir (60).

3.3.3. DNA Tamir Mekanizmaları

Kırılan çift iplikli DNA'nın onarımı homoloji aracılı tamir (homology dependent repair; HDR) ve homolog olmayan uç birleştirme (Non-Homologous End-Joining; NHEJ) olmak üzere iki temel mekanizma ile gerçekleşir (Şekil 2). HDR mekanizmasının işlevi için kalıp DNA gerekliken NHEJ DNA uçlarını bir protein aracılığıyla bir araya getirerek homoloji olmaksızın birleştirir. Hangi tamir mekanizmasının aktif hale geleceği DSB'nin karakterine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin HDR'nin temel enzimi Rad52 uzun, tek iplikli DNA ipliğine bağlanma eğilimindeyken NHEJ temel enzimi Ku70/80 tüm DSB'lerde görülebilmektedir (61).

Ku70/80 heterodimer proteini kırılan bölgeyi algılamakta ve o bölgede bir dizi kinazın (DNA-PKc'leri) ve DNA ligazın iki alt ünitesinin (Ligaz IV: XRCC4 enzimi), eklenti faktörlerinin (PAXX ve XLF) ve polimeraz μ ve λ 'nın toplanmasına aracılık eden bir çatı görevi görmektedir. Bu yapı iki DNA parçasını bir arada tutarak tamirini sağlamaktadır (62).

HDR mekanizması ile tamir ise kırılan DNA parçasının 5' ucundan MRX/MRN ve Sae2 aracılı baz eksiltilmesi ile 3' yapışkan ucun açığa çıkması ile başlamaktadır. Açığındaki bu parça, DNA'yı tamir etme reaksiyonuna primer görevi görürken ipliğin kalıp DNA'ya invaze olmasını sağlayacak enzimler için substrat vazifesi görmektedir. İnvaziv iplik ayrılarak kalıp DNA'ya bağlanmakta, hibrit DNA oluşturmakta ve böylece D-ılmeği oluşmasıyla tamir mekanizması başlamaktadır. Tamir mekanizması; korumasız tek ipliği tavlama (single-strand annealing; SSA) metodu, korumalı çift iplik kırılma tamiri (double-strand break repair; DSBR) sentez bağımlı iplik tavlama (synthesis-dependent strand annealing; SDSA) ya da kırılmayla indüklenen tamir (break-induced replication; BIR) metotları ile oluşmaktadır (63).



Şekil 2: CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme ve tamir mekanizması. CRISPR-Cas9 ribonükleoprotein yapısının DNA üzerinde DSB oluşturmasını takiben HDR

ya da NHEJ tamir mekanizması devreye girmektedir. HDR daha yüksek doğrulukta tamiri sağlarken NHEJ yolağı insersiyon veya delesyon mutasyonu (indel) meydana getirebilmektedir (64).

Çift iplikte meydana gelen kırılmanın hataya meyilli NHEJ yolağını tetiklediği bilinmektedir. Genom üzerindeki iki farklı bölgenin hedeflendirilmiş nükleazlar aracılığıyla eş zamanlı olarak kesilmesi NHEJ yolağını tetikleyeceği için bu bölgede devasa delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlar meydana gelebilir. Ayrıca, hedef bölgenin ve bir plazmidin eş zamanlı olarak kesilmesi, NHEJ aracılı vektör entegrasyonunu mümkün kılar (65). Öte yandan, HDR aracılı gen düzenleme mekanizması daha karmaşık işlese de kaybın daha az olduğu güvenli bir metottur. Bu metotta, düzenlenecek noktanın 5' ve 3' ucundaki ~1 kbç. uzunluğundaki homoloji kollarına ihtiyaç vardır. Ayrıca tek iplikteki kırılmalar HDR'yi tetiklemekte, dolayısıyla katalitik bölgelerin düzenlenmesiyle nikaz özelliği kazandırılan programlanmış nükleaz HDR yolağını aktif hale getirdiği bilinmektedir (65, 66).

3.4. Bovine Herpesvirüs 1 Enfeksiyonları ve Aşı Stratejileri

Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV-1) enfeksiyonları, sığırlarda solunum sistemi hastalığı (Infectious Bovine Rhinotracheitis), genital bozukluklar (Infectious Pustular Vulvovaginitis ya da Infectious Pustular Balanoposthitis), geçici infertilite ve abort gibi klinik belirtiler ile karakterize, bulaşıcı, akut ve latent seyredebilen bir viral hastalıktır. BHV-1'in oluşturduğu semptomlar genç sığırlarda yemden yararlanma gücünün azalması ve ölümler, erişkinlerde ise ağırlık kaybı, süt veriminde azalma, fetal ölümler ve abortlar ile birlikte seyretmektedir (67).

Hastalık etkeni *Herpesviridae* ailesine ait *Alphaherpesvirinae* alt ailesinde bulunan *Varicellovirus* genusunda bulunmaktadır. BHV-1 çift iplikli bir DNA virüsü olup 135-140 kbç. uzunluğunda linear genoma sahiptir. Virüsün 70 adet proteini kodladığı bilinmektedir. Genom, sekans analizine göre kendi içerisinde 102-104 kbç. uzunluğunda unique long (U_L), 10,5-11 kbç. uzunluğunda unique short (U_S) ve 24 kbç. uzunluğunda invert tekrar bölgesi olarak segmentlere ayrılmaktadır (68). BHV-1'in toplam 33 adet yapısal proteini mevcut olup bunlardan 13 tanesi zarfla ilişkili, 10 tanesi ise glikoprotein kodlamaktadır. Glikoproteinlerden 6 adedi U_L segmentinde olup gK (U_L53), gC (U_L44), gB (U_L27), gH (U_L22), gM (U_L10) ve gL (U_L1) olarak, kalan 4 tanesi ise U_S segmentinde olup gG (U_S4), gD (U_S6), gI (U_S7) ve gE (U_S8) olarak adlandırılır. Glikoproteinler virionun hücre içerisine girmesinden, füzzyondan, hücreler arası saçılmalardan sorumludur (69). Tüm bu glikoproteinler içerisinde 5 zarf glikoproteini (gB, gD, gH, gL ve gK) hücre kültürü içerisinde çoğalmak için gerekliken, kalan 5 tanesi (gC, gE, gG, gI ve gM) esansiyel değildir (70). Ayrıca timidin kinaz (tk), ribonükleotid redüktaz (RnR) ve Deoksiuridin 5'-trifosfat nükleotidhidrolaz (dUTPaz) enzimleri de virüs için esansiyel değildir (71).

Günümüzde BHV-1'e karşı canlı-modifiye aşı, inaktif aşı, subunit aşı ve markır aşı gibi farklı aşı çeşitleri geliştirilmiştir. Modifiye canlı aşılar sığır ya da tavşan doku kültüründe seri pasajlanarak elde edilen mutant virüsler aracılığıyla elde edilmiştir (68). Örneğin, Zygraich ve ark. (1988) sıcaklık permisif RLB 106 suşunu nitroz asit (HNO₂) ile seleksiyona tabii tutarak canlı attenüe-mutant virüs eldesi sağlamıştır (72). Canlı modifiye aşılardan ticari kas içi ve nazal uygulanabilen çeşitleri mevcut olup 40-96 saat içerisinde bölgesel interferon üretimi ile

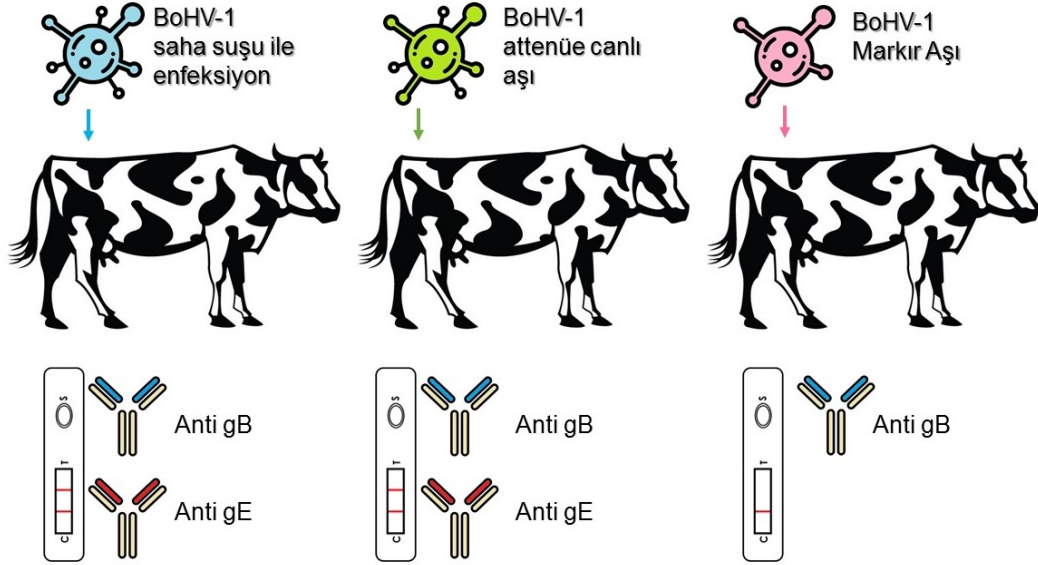
koruyuculuğu sağladığı bilinmektedir (73). Nazal yol ile uygulanan aşılar IgA salgılanmasını sağlar ve hücre aracılı immüniteyi uyarır. Ayrıca gebe ineklerde abort oluşma riski olmadığı için güvenlidir (74). Bu aşıların en önemli dezavantajları sahadaki vahşi tip suşlardan ayırımının zor olması, genetik rekombinasyon aracılığıyla virülensinin yükselebilmesi ve uygulamayı takiben latent hale gelebilmesidir (68, 75, 76).

Ölü ya da inaktif aşılar modifiye canlı aşıların dezavantajları dolayısıyla geliştirilmiştir. Bu aşılar abort veya latentlik oluşturmamakta, ancak saha suşlarının latentliğini önlememektedirler (74). Ölü aşılar hücre kültüründe çoğaltılan BHV-1'in fiziksel yöntemler ile inaktif edilmesiyle elde edilmektedir. Örneğin, Ruiz-Sáenz ve ark. (2013), BHV-1 saha izolatını (Córdoba-2) MDBK hücre hattında çoğaltarak BEI (binary ethylenimine; ikili etilenimin) ile inaktif hale getirmiştir (77). Öte yandan subunit aşılar BHV-1 için gB, gC ve gD gibi immünojenik viral yapı taşlarının sentezlenmesiyle üretilen aşılardır. Serum antikor titresi ve deneysel olarak saha suşlarına karşı koruma oranı karşılaştırıldığında gB, gD veya gE glikoproteinlerinin yalnız birisinin subunit olarak uygulanması, inaktif aşılardan daha yüksek koruma sağlamaktadır (78). Örneğin, *gD* geninin transmembran çapa parçasının kesilmiş versiyonu, sığır ısı şok proteini (hsp70) kontrolü altında 43°C'de MDBK hücre hattında açıklatılarak VSA-3 ile birlikte subunit aşı olarak kullanıldığında mukozal immüniteyi uyardığı ve nötralizan antikor oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir (79).

BHV-1 markır aşıları, sürülerde aşıli-enfekte ayırımını yapabilmek için (DIVA; Differentiation of Infected and Vaccinated Animals) virüse ait bazı genlerin silinerek attenüe edilmesi yoluyla elde edilmektedir (Şekil 3). Bazı yapısal

protein genlerinin (örn; *gC*, *gE*) ya da nükleik asit metabolizmasında rol oynayan yapısal olmayan protein genlerinin (örn; *tk*, *dTPUaz*) silinmesi virülensi azaltırken *in vitro* viral replikasyona kayda değer bir etki göstermemektedir (74, 75).

Kaashoek ve ark. (1998) vahşi tip Lam suşundan HR aracılığıyla *gC*⁻, *gE*⁻, *gG*⁻, *gI*⁻, *gI/gE*⁻ ve *gE*^f (frameshift mutan) varyantlarını oluşturabilmek için virüsün her bir geninin homoloji kollarını taşıyan plazmid ile birlikte transfeke etmişlerdir. Daha sonra tüm mutant varyantlar sığırlarda patojenik Iowa suşuna karşı denenmiş, *gC*⁻ mutantının yüksek virulent gösterdiği, *gI/gE*⁻ mutantının immünojenik olmadığı, *gG*⁻'nin güvenli olmadığı ve reaktif olabileceği ve *gE*⁻ ve *gG*⁻'nin en uygun aşı adayı olduğu sonucuna varılmıştır (80).



Şekil 3: *gE* geni silinen bir BHV-1 markır aşısının enfekte ya da attenüe canlı aşı ile aşılanan sığırlardan ayırt edilmesi (DIVA). Saha suşu ve attenüe canlı aşı suşu inokule edilen sığırlarda virüs *gE* geni taşıdığından gB ve gE proteini pozitifdir. Ancak gE “markır” bir aşıda gE proteini bulunmadığından negatif olarak saptanmaktadır.

BHV-1 *tk* geni virölens belirleyici genlerden birisi olup viral replikasyon için gerekli değildir; dolayısıyla gen silme yoluyla üretilen attenüe canlı aşılarında sıklıkla hedef gen vazifesi görmektedir (81). Yapılan çalışmalar oluşturulan mutasyonların virüsün virölensini azalttığı, virüsün reaktif olma ihtimalini düşürdüğü, virulent *tk*⁺ suşlara karşı koruyuculuk sağladığı ve bu suşların sensörük gangliya yerleşmesine engel olduğu fare, gine domuzu ve tavşanlarda yapılan model çalışmalar ile gösterilmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalar, *tk*⁻ virüs mutantının yüksek düzeyde attenüe ve hücre kültüründe stabil olduğunu göstermiştir (82).

Öte yandan *tk/gC*⁻ çift delesyonlu mutant virüsün üretimi için saha suşu (Los Angeles) önce 1-β-D arabinofuranoziltimin ve 5-bromodeoksiüridin içeren ortamda çoğaltılan tavşan hücre kültüründe pasajlanarak attenüe edilmiş, sonra da *tk* geninden 343 bç. uzunluğunda bir parça silinerek gen nakavtı sağlanmıştır. Elde edilen bu suşun *gC* geni üzerine 1535 bazlık markır kasedi eklenerek bu gen de inaktif hale getirilmiştir (83). Mutant *tk/gC*⁻ çift delesyonlu aşının etkinliği (IBRV(NG)dltk), virulensi yüksek Cooper suşu karşısında denenmiş, aşılı gruplarda sistemik hastalık oluşturmadağı bildirilmiştir. Ayrıca anti *gC* spesifik blok ELISA çalışması ile aşılı ve hasta hayvanların ayırımı başarılı bir şekilde ortaya konulmuştur (84).

Glikoprotein *E*⁻, *tk*⁻ ve *gE/tk*⁻ çift delesyonlu mutant virüsün üretimi için saha suşu (Lam) genomunun *tk* ve *gE* geninin 5' ve 3' homoloji kolları pUC18 plazmidine klonlanmıştır. Bu plazmid ile birlikte embriyonik sığır trachea (EBTr) hücrelerine birlikte transfeke edilerek rekombinasyon yolu ile istenilen genlerin delesyonu sağlanmıştır. Sığırlarda yapılan çalışmalar *tk* nakavt suşun rezidüel virülense sahip olduğunu, ancak *gE/tk*⁻ mutant varyantın avirulent olduğunu

göstermiştir. Ayrıca *gE* delesyonunun immünojeniteyi koruyarak virülensi oldukça düşürdüğü, dolayısıyla önemli bir BHV-1 markır aşısı adayı olabileceğini ortaya koymuştur (85). Ancak *tk* nakavtının virülens reversiyonunu ihmal edilebilir seviyeye indirdiği bilinmektedir (86). Günümüzde *gE/tk* çift nakavt markır aşısı başta İngiltere olmak üzere birçok ülkede lisanslı olarak kullanılmaktadır. *gE*⁻ aşılarda ise ihracatı yapılacak sığırlarda kullanılmamaktadır (87).

BHV-1 DNA aşılı, güvenli olması, koruma süresinin daha uzun olması ve sığırlarda çoğu zaman maternal anti-BHV-1 antikorlarının bulunması gibi sorunların üstesinden gelmek için geliştirilmiş alternatif bir yol olup ekspresyon plazmidinin konak canlıya direk enjeksiyonu şeklinde uygulanmaktadır (75). Örneğin, *gD* ekspresyon plazmidinin BALB/c farelerde yüksek titrede *gD* antikor yanıtı oluşturabildiği ve sığırlarda virülensi yüksek vahşi tip (strain 108) suşa karşı kayda değer koruma sağladığı bildirilmiştir (88).

BHV-1 multivalan aşılı, farklı ailelere mensup virüslerin antijenik genlerinin herpesvirüs genomuna eklenerek açıklanması yoluyla elde edilir. Örneğin, Taylor ve ark. (1998) BHV-1 genomu üzerindeki *gE* geni pUC18 orjinli bir donör plazmidi (p531) aracılığıyla bovine respiratory syncytial virüse (BRSV) ait *G* (glikoprotein) geni ile değiştirilmiş, *gE* promoteri bu genin ifadesi için kullanılmıştır. Üretilen rekombinant virüs intranasal ve intratracheal olarak uygulanarak vahşi tip BRSV ile karşılaştırıldığında nazofarengeal ekskret birikimi ve pulmonik lezyonların görülmesini kayda değer miktarda azalttığı gözlemlenmiştir (89). Aynı şekilde, bovine viral diare virüsü (BVDV)'ye ait E2 glikoproteini ve domuz yalancı kuduz virüsü (PRV) *gC* glikoproteini taşıyan rekombinant BHV-1 çalışmaları da mevcuttur (90, 91).

3.5. Gallid herpesvirüs 1 Enfeksiyonları ve Aşı Stratejileri

Enfeksiyöz laringotrakeitis (ILT), enfekte piliç ve yetişkin tavuk sürülerinde yüksek mortalite ile seyreden, aynı zamanda karkas ağırlığı ve yumurta kaybına yol açan viral solunum sistemi hastalığıdır. ILT'nin şiddetli enzootik formu ağır solunum güçlüğü ve solunum yetmezliği, kanlı mukus ekspektorasyonu ve yüksek mortalite ile seyrederken hafif ve bazen “enzootik” olarak adlandırılan formu mukoid trakeitis, sinüzitis, sağlıklı ve zayıf postür ve düşük mortalite ile karakterizedir (67).

Taksonomik olarak enfeksiyöz laringotrakeitis virüsü (ILTV) *Herpesviridae* ailesinin *Alphaherpesvirinae* alt ailesine mensup, *Iltovirus* genusu içerisinde, *Psittacid alphaherpesvirus 1* ile birlikte, *Gallid alphaherpesvirus 1* (GaHV-1) olarak sınıflandırılmıştır. ILTV, ortalama 80-100 nm boyutundaki ikozahedral nükleokapsid ve üzerinde çiviye benzer glikoproteinleri barındıran, toplamda 195-250 nm boyutunda viral zarf partikülünden ibaret bir yapıdır (36). Ortalama 155 kbç. uzunluğundaki DNA genomunun 76 adet proteini kodladığı bilinmekte ve diğer herpesvirüslerde olduğu üzere bazıları DNA replikasyonunu düzenleyici enzimler bazıları da viral yapı proteinleridir. Bu genlerin 63 adedinin gerek bulunduğu pozisyonun benzerliği, gerekse translasyon ürününün karakteri bakımından prototipik alfaherpesvirüs, herpes simpleks virüs 1 (HSV-1)'e benzemektedir. gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL ve gM glikoproteinleri HSV-1'in homologudur. Öte yandan ORF A-E, UL0 ve UL(-1) genleri yalnızca *iltovirus* genusuna ait virüslerde bulunmaktadır (92).

Yapılan gen mutasyon çalışmaları virüste esansiyel olmayan genleri ortaya çıkarmış, bu mutant virüslerin virülensi *in vivo* ve *in vitro* olarak test edilmiştir.

Örneğin, *gG* (*US4*) sekresyon protein genleri; *gJ* (*US5*), *gN* (*UL49.5*), *gM* (*UL10*) zarf protein genleri, *UL47* majör tegüment protein geni, *dUTPaz*, *tk* gibi düzenleyici genler, *ORF A-E* ve *UL0* gibi fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamış genler esansiyel olmayan genler olarak kabul edilmektedir (92).

Hastalığa karşı koruma ve kontrol amacıyla iki farklı aşı tipi tanımlanarak ticarileştirilmiştir. Bunlar “Birinci nesil” canlı attenüe aşılar ve “ikinci nesil” rekombinant viral vektör aşılarıdır. İlk canlı attenüe aşılar virüsün embriyolu tavuk yumurtasında (Chicken Embryo Oorigin: CEO) ya da hücre kültüründe seri pasajlanarak (Tissue Culture Oorigin; TCO) attenüe edilmesi yoluyla elde edilmiştir (93, 94). Virüsün izolasyonunun ardından, koryoallantoyik zara aktararak pasajlanması ilk olarak Brandy ve ark. (1935) tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra özellikle ellili ve altmışlı yıllarda üzerinde çalışılan seri pasajlanmalar sonrasında virüste kayda değer miktarda virülens kaybı elde edilmiş, dolayısıyla güvenli ve etkin bir aşı eldesi sağlanmıştır (93, 95). Örneğin, Hudson suşu, saha izolatinin embriyolu tavuk yumurtasında 191 nesil pasajlanarak attenüasyonu ile elde edilerek intranasal, intratrakeal ve oküler uygulanabilirliği tanımlanmıştır (96). Öte yandan Cover ve Benton (1958) ilk kez sahadan izole edilen bir virüsün (virus-146, sonraları “CEO Cover aşı suşu” olarak adlandırılacak) düşük virülens özellik gösterdiğini ve intratrakeal uygulamalarda 19 güne kadar koruyuculuğunun olduğunu bildirmiştir (97). Gelenczei ve Marty (1964) L-6 suşunu hindi ve tavuk kökenli, böbrek veya karaciğer primer hücre hatlarına adapte etmiş en az elli nesil pasajlayarak atipik lezyon oluşturan varyant ortaya çıkarmıştır. Bu attenüe virüsün oküler ve intranasal yol ile uygulandığında minimum 22 hafta bağışıklık oluşturabildiği aynı çalışmada bildirilmiştir (94). Kanatlı endüstrisinin büyümesi,

hızla uygulanacak ve ucuz canlı aşı talebini doğurmuş, bu noktada CEO aşılar sprey ya da oral forma kavuşurken TCO aşılar ise oküler kullanım ile sınırlı kalmıştır. Uzun süre hayvan besleme gerektiren yumurta tavukçuluğunda ILT'ye karşı aşılama standart hale gelmiş, broiler sürülerinde ise ancak salgın durumlarında örtü (blanket) aşılama uygulanmıştır (98).

Saha koşullarında CEO temelli aşının özellikle oral yol ile uygulandığında hayvanlarda solunum yetmezliği ve ölümlere neden olduğu, bir aşı başarısızlığı olarak ortaya konulmuştur (99). Daha sonra, Guy ve ark. (1990) TCO ve CEO canlı attenüe aşıları embriyolu tavuk yumurtasında 20 nesil pasajladıktan sonra virüsleri tavuktan tavuğa pasajlayarak CEO tipi canlı attenüe aşının tekrar yüksek virülens özellik kazanarak mortaliteye ve şiddetli solunum sendromuna yol açabildiğini bildirmiştir (100). Günümüzde gerek TCO gerekse CEO aşı suşları aşıları canlılardan aşısız canlılara temas yoluyla bulaşma göstermekte ve özellikle CEO aşının gerek oküler yolla aşılanan gerekse aşılanmamış canlılarda konjunktiva ve trakeada hızlı bir şekilde çoğalabildiği bilinmektedir (101). Öte yandan Avusturalya'da salgın meydana getiren ILTV sınıf 8 ve 9 olarak sınıflandırılmış virüsün aslında sınıf 1 olarak kabul edilen, SA2 ve A20 aşı suşları ve Avrupa kökenli sınıf 7 Serva aşı suşu arasında meydana gelen rekombinasyonun bir ürünü olduğu yapılan tam genom analizi ve RFLP haritalandırma ile ortaya konulmuştur (102).

"İkinci nesil" olarak adlandırılan rekombinant aşılar canlıdan canlıya bulaşmaması, virülens özelliği tekrar kazanmaması, latent enfeksiyon oluşturmaması veya rekombine olmaması gibi özelliklerinden dolayı daha güvenilir olduğu bilinmektedir (103). Ayrıca rekombinant aşılar *in ovo* olarak emniyetle uygulama imkanı sunmaktadır (98). Rekombinant aşının üretimi amacıyla

kanatlılarda bağışıklık sistemini uyardığı bilinen bazı virüsler vektör omurgası olarak kullanılmıştır. Örneğin, ILTV'ye ait *gB* geninin kanatlı çiçek virüsü (FPV) üzerinde açıklatılması denenmiş, bu amaçla *gB* polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak FPV'ye ait erken-geç promotoruna (EP2-LP2), LacZ geni ise FPV p11 promotoruna bağlanarak "EP2-LP2-ILTVgB-p11-LacZ" şeklinde uzun bir kaset oluşturulmuştur. Bu kaset taşıyıcı plazmid vektör aracılığı ile FPV 017 suşu ile enfekte edilmiş, primer tavuk fibroblast hücrelerine transfeke edilerek rekombinant virüs elde edilmiştir. Rekombinant virüsler LacZ markırı kullanılarak pürifiye edilmiştir. Daha sonra 35 günlük piliçlerde vahşi tip ILTV, ticari kanatlı çiçek virüsü ve ILTV aşısı ile denenmiş, virüs saçılımı, klinik hastalık tablosu, mortalite ve antikor yanıtı bakımından değerlendirilmiştir. Sonuçta ILTV-gB'nin canlı aşıya göre daha uzun süre antikor yanıtı oluşturabildiği, ancak trakeadaki viral çoğalmayı azaltmadığı ortaya çıkarılmıştır (104). Benzer şekilde *Meleagrid alphaherpesvirus 1* (hindilerin herpesvirüsü) vektör olarak kullanılmış, ILTV'ye ait *Us6 (gD)* ve *Us7 (gI)* genleri bu vektörde açıklatılmıştır. Vagnozzi ve ark. (2012) her iki rekombinant aşısı TCO ve CEO canlı aşılar ile beraber 35 ve 57 günlük broilerlerde ILT vahşi tip suş ile (strain 63140) karşılaştırmalı enfeksiyon denemeleriyle test etmiştir. Çalışmada hindi herpesvirüs tabanlı aşılardan akut klinik tablo oluşumunu engellediği, ancak immün yanıt oluşumunun geciktiği; ayrıca 35 günlük broiler sürülerinde TCO aşısına göre trakeal viral yükü azaltmakta daha etkisiz olduğu bildirilmiştir (105).

In vitro ve *in vivo* ortamda stabil, gen silinmiş, canlı attenüe GaHV-1'in oluşturulabilmesi için bugüne değin virülens ilişkili 20 farklı gen tanımlanmış, bunlardan bazılarının nakavtının potansiyel aşı suşu olabileceği düşünülmüştür

(98). Örneğin, konakçı adaptif bağışıklığını düzenleyen kimokin bağlayıcı protein (gG) nakavt ILTV suşu (ILTVΔgG) SA2 ve A20 aşı suşları ile beraber saha suşuyla karşılaştırmalı olarak 28 günlük tavuklarda test edilmiş, gG negatif suşun klinik enfeksiyon tablosu ya da trakeal patolojiye neden olmadığı ve saha suşunun trakeal mukozadaki yükünü kayda değer miktarda azalttığı tespit edilmiştir (106). Aynı şekilde ORFC nakavt oluşturulmak üzere *yfp* ve kanamisin direnç gen kaseti HR aracılığı ile ORFC pozisyonuna yerleştirmiş, daha sonra *yfp* ikinci bir HR işlemi ile çıkarılmıştır. ILTVΔORFC suşu tavuklara farklı metotlar ile uygulanarak virulent saha suşuna karşı test edildiğinde *in vitro* zararlı etkisinin olmadığı, trakeal/oküler yol ile uygulandığında önemsiz düzeyde trakeal lezyon oluşturduğu, ayrıca oküler yol ile uygulandığında saha suşuna karşı TCO tip aşı düzeyinde koruyabildiği sonucuna varılmıştır (107).

GaHV-1 genomu üzerinden silinen gen yerine yabancı bir viral antijenin eklenerek açıklatılması prensibi de başarıyla uygulanagelmıştır. Örneğin, Pavlova ve ark. (2009) ILTV genomu *UL50 (dUTPaz)* gen pozisyonuna kuş gribi (H5N1) hemagglutinin ve nöroaminidaz genleri yine HR aracılı olarak ayrı ayrı eklenerek rekombinant bivalan aşı denemesi gerçekleştirmiştir. Altı haftalık leghorn tavuklarında yüksek patojeniteli H5N1 (Vietnam05 ve İtalya 98) suşları ile yapılan aşı denemelerinde Δ*UL50*-H5 ve Δ*UL50*-N1'in birlikte uygulanmasının hastalığa karşı koruduğu ancak sadece *UL50* nakavtının yeterli attenüasyonu sağlamadığını göstermiştir (108). Aynı şekilde, Newcastle hastalığı virüsüne ait *F* geni *US9* gen pozisyonuna yerleştirilmiş, yapılan *in vitro* ve *in vivo* testlerde *US9* nakavtının yeterli attenüasyonu sağladığı, ILTVΔ*US9*-F suşunun da düşük dozlarda tek

uygulamada zayıf humoral yanıtı rağmen her iki hastalığa karşı yeterli klinik korumayı sağlayan bir bivalan aşı olma potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir (109).

Rekombinant gen nakavt tipi aşılarda oluşturulmasında aşının güvenliği ile etkin koruyuculuğu arasındaki dengenin sağlanması son derece kritik bir öneme sahiptir. Virülens ilişkili genler çoğu virüs ailesi için birden fazla gene bağlı olmakla beraber dengeli aşının sağlanması için doğru kombinasyonlar gerekebilmektedir (98). Öte yandan rekombinant aşı adayını üretecek metotlar çok uzun zaman alan ve fazlaca laboratuvar pratiği gerektiren metotlar olup transfer vektörüne ihtiyaç duymakta ve birçok kere plak saflaştırması gerektirmektedir. Bu bakımdan yeni nesil genom düzenleme yaklaşımları bazı kanatlı hastalıkları (örn; Newcastle hastalığı, kuş gribi ve enfeksiyöz bronşitis virüsleri) ya da sığır hastalıkları (örn; parainfluenza 3 ve bovine viral diyare virüsleri) koruma programları için kullanılacak güvenli ve etkili aşı vektörü üretimini mümkün kılmaktadır. Bu noktada CRISPR–Cas9 mekanizmasının keşfi genetik seviyede müdahale üzerinde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu yaklaşım, memeli hücrelerinde genom düzenlemede (110), model hayvanların genetik modifikasyon çalışmalarında ve herpes simpleks virüs tip 1, adenovirüs, yalancı kuduz virüsü, vaccinia virüs, Epstein–Barr virüs, gine domuzu sitomegalovirüsü, hindi herpesvirüsü (HVT) ve ördek enteritis virüsü (DEV) gibi çeşitli DNA virüslerinin genomik müdahalesinde kullanılmaktadır (111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119). CRISPR/Cas9 metodu ile birlikte Cre-Lox rekombinasyon sistemi daha önceden tanımlanmış LoxP bölgesinin (34 bazlık DNA sekansı) kesilmesi için kullanılabilmekte, dolayısıyla her iki tarafında LoxP motifi bulunan genin çıkarılması mümkün olabilmektedir (120).

Yürütülen bu çalışmada yüksek verimli, güvenilir ve hızlı NHEJ-CRISPR/Cas9 ve Cre- Lox aracılı genom düzenleme teknikleri kullanılarak belirlenmiş virülens faktörü silinirken aynı anda istenilen bir viral antijen yerleştirilerek rekombinant, multivalan ve güvenli aşı vektörünün üretimi amaçlanmıştır. Bu yaklaşım için *Alphaherpesvirinae* alt ailesi içerisinde bulunan, hayvan yetiştiriciliğinde önemli sayılan iki hastalığın etkeni olan *Bovine alphaherpesvirus 1* ve *Gallid alphaherpesvirus 1* ajanları model olarak alınmıştır. Bovine alfaherpesvirüs için öncelikle *tk* nakavt edilerek bu pozisyona eklenecek bir floresan gen aracılığı ile reporter virüs üretilmesi üzerinde çalışılmıştır. Aynı zamanda *tk* nakavt *gfp* gen kasedi taşıyan *Gallid alphaherpesvirus 1* suşu için ikinci bir virülens faktörü olan *UL50* geni yerine Newcastle Hastalığı virüsüne ait füzyon geni (*F*) eklenmiştir. Reporter markır gen Cre-Lox sistemi ile virüsün ekspresyon kapasitesine veya stabilitesine zarar vermeksizin çıkarılmıştır. Bu potansiyel aşı adayı suş, eklenen gen proteininin stabil ekspresyonu, replikasyon kinetiği ve *in vitro* karakteristiği yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda NHEJ-CRISPR/Cas9 ve Cre-Lox sistemi birlikte ILTV temelli rekombinant aşı üretmede oldukça verimli bir yöntem olduğu, geleneksel rekombinasyon tekniklere göre avantajlı yönlerinin bulunduğu kanıtlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hücre Kültürü ve Virüs

Gallid Alphaherpesvirus 1 A489 suşu Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC; American Type Culture Collection) elde edilmiştir. Virüsün çoğaltılabilmesi için Leghorn Male Hepatoma (LMH) hücreleri (ATCC® CRL-2117™), %10 fetal sığır serumu (Katalog no: 26140079, ThermoFisher, MA, ABD), GlutaMAX (Katalog no: A1286001, ThermoFisher, MA, ABD) ve 100 u/mL penicillin-streptomycin (Katalog no: 15070063, ThermoFisher, MA, ABD) içeren Dulbecco's Modifiye Eagle Medyum (D6546, Sigma-Aldrich, MO, USA) kullanılarak 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ altında çoğaltılmıştır.

Bovine Alphaherpesvirus 1 Cooper suşu Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilimdalı laboratuvarına ait virüs koleksiyonundan temin edilmiştir. Virüsün çoğaltılacağı VERO E6 hücre hattı (ATCC® CRL-1586™) LMH hücre hattı için hazırlanan vasat formülasyonu kullanılarak, aynı şartlar altında çoğaltılmıştır.

Her iki virüs de üretilen hücre kültürlerinde çoğaltılmış, titresi belirlenmiş ve çalışmanın gerçekleştirileceği güne kadar – 80°C dondurucuya kaldırılmıştır. Bu amaçla, her iki hücre kültürü de T25 flasklarda üretilmiş, ortalama ~ %90 yoğunluğa ulaştığında PBS solüsyonu ile 2 kere yıkanmış, 900 µl %2 FBS'li medyum ile her birine 100 µl virüs süspansiyonu inokule edilmiştir. Hücreler 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ şartlarında 3 saat inkübasyon sonunda 1 ml inokulum dökülerek yerine 5 ml %2 FBS içeren DMEM ilave edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerde 72 saatin sonunda karakteristik olarak görülen yuvarlaklaşma, sinsitya

oluşumu ve BHV-1 için karakteristik olan “üzüm salkımı görünümü” gözlemlenmiştir.

Her iki virüsün konsantre miktar tayini plak test ile gerçekleştirilmiş ve “plak forming unit” (pfu) olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla Baer ve Kehn-Hall (2014) tarafından tarif edilen geleneksel agaroz kaplama metodu mevcut iki herpesvirüs için uygulanmıştır (121). Kısaca, standard morfoloji gösteren hücre hatları 6 kuyucuklu pleytlere ekilerek ortalama %90 monolayer olması sağlanmış ardından her iki virüs hücre hatlarına inokule edilerek 37°C’de 2 saat inkübe edilmiştir. Hücreler PBS ile yıkanarak %0,6 düşük ısıda eriyen agaroz (Invitrogen, ABD) ve 2X DMEM ile hazırlanan overlay medyumunu ile kaplanarak 37°C’de 5-7 gün inkübe edilmiştir. İnkubasyonun 5-7. gününün sonunda 1 ml. %10 formaldehit solüsyonu ile her bir kuyucuktaki hücreler fiks edilmiş ve %1 kristal violet solüsyonu (%20 etanol ile çözündürülmüş) ile boyanmıştır. Gözlemlenen plak sayısı pfu/ml birimi olarak hesaplanmış ve -80°C’de muhafaza edilmiştir.

4.2. Donör Plazmidinin ve gRNA Oligolarının *in silico* Tasarımı

ILTV A489 suşu *UL50* genine ait 1251 bç. uzunluğundaki genetik kod sekansı hedef sekans olarak seçilerek bu sekansa uygun CRISPR kılavuz RNA’ların tasarımı, çevrimiçi tasarım programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<http://crispr.mit.edu/>). Bu amaçla *UL50* için toplam 128 adet gRNA bağlanma bölgesi tespit edilmiş, bunlar içerisinde hedef dahili skoru ve hedef harici skoru, GC% oranı, dimerizasyon skoru parametrelerine gözetilerek en uygun iki adedi çalışma için belirlenmiştir.

BHV-1 Copper suşu TK genine ait 1080 bç. uzunluğundaki kodlama sekansı hedef sekans olarak seçilmiş, bu sekansa uygun CRISPR kılavuz RNA'ların tasarımı, aynı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hedef olarak göz önünde bulundurulacak toplam 128 adet aday kılavuz bağlanma bölgesi tespit edilerek en uygun üç adedi çalışma için belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen kılavuz RNA adayları Tablo 3'de gösterilmiştir.

#	Virüs	Ad	Sekans	PAM
1	BHV-1	sg142-fwd sg142-rev	CACCGATCGTGCGCCAGTACGCCAT AAACATGGCGTACTGGCGCACGATC	AGG
2		sg179-fwd sg179-rev	CACCGCGCCGCGAGGATCCCACTTA AAACTAAGTGGGATCCTCGCGGCGC	AGG
3		sg435-fwd sg435-rev	CACCGGAGGCAGTAGCGGGCGAAG AAACCTTCGCCCCTACTGCCTCC	GGG
4	ILTV	sgUL50-F1 sgUL50-R1	CACCGTATTCACGCAGGTGACCGAG AAACCTCGGTCACCTGCGTGAATAC	TGG
5		sgUL50-F2 sgUL50-R2	CACCGATGATATGGTGTCGCACCT AAACAGGTGCGACACCATATCATC	GGG

Tablo 3: Çalışmada kullanılan kılavuz RNA çiftleri ve genom üzerindeki PAM sekansları.

Donör plazmidin *in silico* tasarımı için plazmid veri tabanında mevcut plazmidlerin sekansları incelenmiş, gerekli gen ve motiflerin kod sekansları edinilerek uygun çevrimdışı program (Geneious Prime® 2019.0.4) aracılığıyla birleştirilmiştir (122). Plazmid omurgası olarak pcDNA3.1(+) (Addgene #2093) olarak belirlenmiştir. Toplam 810 bç. uzunluğundaki sitomegalovirüs (CMV) promoter ve enhancheri ile 225 bç. uzunluğunda sığır büyüme hormonu poliadenilasyon bölgesi için pcDNA3.1-mCherry plazmid sekansı (Sequence ID: MH325107.1) kaynak olarak kullanılmış, ardından oluşturulan bir polilinker bölgesinin 3' ucuna V5 tag sekansı (GKPIPNNPLLGLDST) eklenmiştir. Bu kaset

“MCS1” olarak adlandırılmıştır. İnsan elongation faktörü EF-1-alfa gen promoteri (943 bç.) ve tavşan beta globülin poliadenilasyon bölgesi (56 bç.) için pEF-GFP sekansı (Addgene #11154) kaynak olarak kullanılmıştır. Bu bölgeye de bir polilinker bölgesi eklenerek 3' ucuna FLAG tagı (DYKDDDDK) ilave edilmiştir. Bu kaset ise “MCS2” olarak adlandırılmıştır.

Daha önceden tanımlanmış 34 bç.'lik LoxP sekansı (123) MCS2 kasedinin 5' ve 3' uçlarına eklenerek bu kasedin gerektiğinde çıkarılabilir olması sağlanmıştır. MCS1 için kılavuz RNA-B adlı tuzak (bait) sekans (124) eklenmiştir. Her iki kasedi içeren parçanın plazmidden serbest kalmasını sağlayacak kılavuz RNA-A (125) ise tüm tasarımın her iki ucuna birden eklenmiştir. Oluşturulan bu tasarımın ucuna ise *BsmBI* restriksiyon enzim motifi eklenerek pcDNA3.1(+) üzerine klonlanmasına olanak sağlanmıştır. *In silico* tasarımı yapılan bu yapı (1444 bç.) sentezletilerek bu işlemi yapan firmaya (Source Bioscience, NH, İngiltere) verilen protokol doğrultusunda pcDNA3.1(+) üzerindeki *MfeI* ve *BbsI* pozisyonuna klonlanması gerçekleştirilmiştir. Sonuçta istenilen genlerin klonlanacağı 6955 bç. uzunluğundaki taşıyıcı vektör plazmidi (pcDNA3-CRISPR-Lox) elde edilmiştir.

4.3. gRNA oligolarının Plazmide Klonlanması ve Transformasyon

Tasarlanan gRNA oligolarının pX459 (Addgene #62988) plazmidine klonlanması için ZhangLab tarafından önerilen standart “Hedef Sekans Klonlama Protokolü” esas alınmıştır.

- a. pX459 plazmidi linearize edilmiş ve defosforilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

1 µg	pX459 plazmidi
1 µl	<i>Bbs</i> I-HF (NEB, MA, ABD)
1 µl	FastDigest <i>Bbs</i> I (NEB, MA, ABD)
1 µl	FastAP Alkali Fosfataz (NEB, MA, ABD)
1 µl	10X FastDigest Buffer (NEB, MA, ABD)
X µl	ddH ₂ O
20 µl	Toplam

37 °C 1 sa. inkübe edilmiştir.

- b.** Linearize plazmid jel elektroforezi ile elde edilerek jel pürifikasyon kiti (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen, Almanya) ile saflaştırılmıştır.

- c.** Her bir çift oligo (bkz. Tablo 3) anneal edilmiştir:

1 µl	Forward gRNA (100 µM)
1 µl	Reverse gRNA (100 µM)
1 µl	10X T4 Ligasyon Buffer (#B0201S, NEB, MA, ABD)
6.5 µl	ddH ₂ O
0.5 µl	T4 Polinükleotid Kinaz (#M0201S, NEB, MA, ABD)
10 µl	Toplam

37 °C 30 dk, 95 °C 5 dk ardından 25 °C'ye düşürülmüştür (saniyede 5 C° azaltılmıştır)

- d.** Anneal edilen oligonükleotid ve linearize plazmid ligasyon reaksiyonu ile klonlanmıştır. Aşağıdaki reaksiyon 25 °C 30 dk inkübe edilmiştir.

50 ng	<i>Bbs</i> I ile kesilerek linearize edilen plazmid
1 µl	Anneal edilen gRNA çifti (1/200 seyreltilmiş)
5 µl	2X Quick Ligation Buffer
X µl	ddH ₂ O
10 µl	Toplam
+1 µl	Quick Ligase (Quick Ligation™ Kit, NEB, İngiltere)
11 µl	Toplam

- e. Ligasyon reaksiyonuna PlasmidSafe ekzonükleaz uygulanarak istenmeyen rekombinasyon ürünlerinden arındırılmıştır.

11 µl	Ligasyon Reaksiyonu
1.5 µl	10X PlasmidSafe Buffer (Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase, Biosearch Technologies, USA)
1.5 µl	10 mM ATP
1 µl	ddH ₂ O
15 µl	Toplam

- f. Ligasyon ürününün *E. coli*'ye transformasyonu gerçekleştirilmiştir: 15 µl Ligasyon reaksiyonu + 50 µl Dh5α kimyasal kompetan *E. coli* hücre hattı (Katalog No: 18258012 ThermoFisher, MA, ABD) buzda 15 dk inkübe edilmiş, ardından 42 °C 45 sn. ısı şokuna maruz bırakılmış ve tekrar buza alınarak 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından 200 µl S.O.C medyumunu eklenerek 37 °C 150 rpm'de 1 sa. inkübe edilmiştir. Ardından 100 µg/ml Ampicillin içeren LB agara yayılarak 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

- g.** Elde edilen kolonilerden 5 adedi seçilerek 100 µg/ml Ampicillin içeren 5 ml. LB broth sıvı besiyerine alınarak 37 °C 150 rpm’de 18 sa. inkübe edilmiştir.
- h.** Elde edilen transforme bakteriler 8000 x g’ de 15 dk santrifüj edilerek Plazmid DNA izolasyon Kiti ile (QIAprep Spin Miniprep, Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın protokolü uyarınca plazmid DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant DNA, nanodrop (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific, ABD) ile ölçülerek değerlendirilmiş, 100 ng/µl olacak şekilde ayarlanarak doğrulama primeri ile birlikte sekanslatılmıştır (Sekanslama Primeri CBh-Fwd: TTTATGGCGAGGCGGCGG).
- i.** Doğrulan koloniler %25 gliserol içeren süspansiyon ile dondurularak – 80 °C’de muhafaza edilmiştir.

4.4. Donör Plazmidin Oluşturulması

4.4.1. DsRed’in Klonlanması

- a.** Kırmızı floresan proteini (rfp) kod sekansı olan *DsRed* geni pcDNA3.1-*DsRed* geninden amplifiye edilmiştir. Bu amaçla proofreading özellikli polimeraz (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, NEB, MA, ABD) kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aşağıdaki parametrelere göre hazırlanmıştır.

5X Q5 Reaksiyon Tamponu (NEB, MA, ABD)	10 µl (1X konsantre)
10 mM dNTP mix (Invitrogen, ABD)	1 µl (200 µM)
10 µM DsRedClon2F	2.5 µl (0.5 µM)
10 µM DsRedClon2R	2.5 µl (0.5 µM)
Plazmid DNA (pcDNA3.1-DsRed)	500 ng
High-Fidelity DNA Polimeraz (NEB, MA, ABD)	0.5 µl (0.02 U/µl)
Nükleaz free ddH ₂ O	50 µl'ye tamamlandı
Toplam	50 µl

- b.** Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere termosiklus cihazı aşağıdaki parametrelere göre ayarlanmıştır.

Ön Denatürasyon	1 siklus	98°C 30 saniye
Denatürasyon		98°C 10 saniye
Annealing	35 siklus	72°C 40 saniye
Uzatma		
Final Uzatma	1 siklus	72°C 2 dakika

- c.** Elde edilen ampikon %1 (v/w) agaroz jele yüklenerek 90 voltta 45 dk yürütülerek 693 bç. ampikonun elde edildiği gözlemlenmiştir. Ardından bistüri yardımıyla ampikon jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Bu amaçla ticari jelden saflaştırma kiti üretici firmanın standart protokolüne uygun olarak yapılmıştır. (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Almanya).

- d. Elde edilen *DsRed* geni ve pcDNA3-CRISPR-Lox plazmidini *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Bu amaçla alttaki karışım ayrı ayrı hazırlanıp 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.

<i>EcoRI</i> -HF (NEB, MA, ABD)	1 µl
<i>XbaI</i> (NEB, MA, ABD)	1 µl
CutSmart® Buffer (10X) (NEB, MA, ABD)	2 µl (1X)
+ <i>DsRed</i> amplicon (20 µg/µl)	~ 400 µg
+ pcDNA3-CRISPR-Lox plazmidini	500 µg
Nükleaz free ddH ₂ O	25 µl’ye tamamlandı
Toplam	25 µl

- e. 6862 bp. uzunluğundaki linearize edilmiş plazmid %1 (v/w) agaroz jele yüklenerek 90 voltta 60 dk yürütülmüş, ardından bistüri yardımıyla amplicon jelden kesilerek aynı ticari kit ile saflaştırılmıştır. Daha sonra yapışkan uçlu *DsRed* ampliconu ve linearize plazmid için ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon 25 °C de 3 saat sürdürülmüş, ardından 65 °C de 10 dk inkübasyonla enzim inaktif hale getirilmiştir.

<i>DsRed</i> ampliconu	~ 3 µl (37.5 ng)
pcDNA3-CRISPR-Lox plazmidini	0.25 µl (50 ng)
T4 DNA Ligaz Tamponu (10X)	2 µl (1X)
T4 DNA Ligaz Enzimi	1 µl (1X)
Nükleaz free ddH ₂ O	20 µl’ye tamamlandı
Toplam	20 µl

f. Elde edilen ligasyon ürünün 10 µl'si 30 µl Dh5α *E. coli*'ye (Katalog No: 18258012 ThermoFisher, MA, ABD) transforme edilmiştir. Transformasyon metodu için **alt başlık 4.3**'teki **f**, **g** ve **h** basamakları takip edilmiştir. Pleytten seçilen kolonilerin doğrulanması için *in silico* tasarımı yapılmış MCS2 doğrulama primer seti kullanılmıştır. Rastgele alınan sekiz koloni elde edilerek bu primerler ile PZR uygulanmıştır. Bunun için önce seçilen her bir koloni 500 µl ampicillinli LB medyumuna içine ekilerek, çalkalamalı inkübatörde ~ 4 saat kadar inkübe edilmiştir.

g. Her bir koloniden 100 µl örnek alınarak 8000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiş, dipte kalan hücre peleti 50 µl TE tamponu ile resüspanse edilerek blok ısıtıcıda 100 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından parçalanan bakteriler derhal buz içine alınarak bir süre inkübe edilmiş, Ardından maksimum +4 °C 'de maksimum hızda 5 dk santrifüj edilerek bakteriyel DNA elde edilmiş ve nanodrop ile iki kere ölçülerek ortalamaları kaydedilmiştir.

h. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aşağıdaki parametrelere göre hazırlanmıştır.

10 µM pEF-MCS2-F	0.5 µl (0.2 µM)
10 µM pEF-MCS2-R	0.5 µl (0.2 µM)
Plazmid DNA (pcDNA3.1-DsRed)	1 µl (300 ng)
Quick-Load Master Mix (2X)	12.5 µl (1X)
(NEB, MA, ABD)	
Nükleaz free ddH ₂ O	25 µl'ye tamamlandı

Toplam

25 µl

- i. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere termosiklus cihazı aşağıdaki parametrelere göre ayarlanmıştır.

Ön Denatürasyon	1 siklus	94°C 1 dakika
Denatürasyon		94°C 30 saniye
Primer Eşleşmesi	35 siklus	56°C 45 saniye
Polimerizasyon		68°C 60 saniye
Final Polimerizasyonu	1 siklus	68°C 5 dakika

- j. Amplikonların her birisi %1 (v/w) agaroz jele yüklenerek 95 voltta 30 dk yürütülerek 991 bç. amplikon veren kolonilerin plazmid DNA'sı pEF-MCS2-F primeri ile sekansa gönderilmiştir. Sekans ile onaylanan koloniler stoklanarak “pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS2-DsRed” adı verilmiştir. *DsRed* geninin klonlanması ve doğrulamasında kullanılan primer setleri **Tablo 3**'de gösterilmiştir.

4.4.2. NDV füzyon (F) geninin Klonlanması

- a. NDV füzyon geni Mısır kökenli serotip VII suşunun viral genomundan proofreading özellikli polimeraz (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, NEB, MA, ABD) ile amplifiye edilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aşağıdaki parametrelere göre hazırlanmıştır.

5X Q5 Reaksiyon Tamponu (NEB, MA, ABD)	10 µl (1X konsantre)
10 mM dNTP mix (Invitrogen, ABD)	1 µl (200 µM)
10 µM FClon1F	2.5 µl (0.5 µM)
10 µM FClon1R	2.5 µl (0.5 µM)
Plazmid DNA (pcDNA3.1-DsRed)	500 ng

High-Fidelity DNA Polimeraz (NEB, MA, ABD)	0.5 µl (0.02 U/µl)
Nükleaz free ddH ₂ O	50 µl'ye tamamlandı
Toplam	50 µl

- b.** Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere termosiklus cihazı aşağıdaki parametrelere göre ayarlanmıştır.

Ön Denatürasyon	1 siklus	98°C 30 saniye
Denatürasyon		98°C 10 saniye
Primer Bağlanması	35 siklus	65°C 30 saniye
Polimerizasyon		72°C 40 saniye
Final Polimerizasyonu	1 siklus	72°C 2 dakika

- c.** Elde edilen amplikon %0.7 (v/w) agaroz jele yüklenerek 90 voltta 45 dk yürütülerek 1693 bç. amplikonun elde edildiği gözlemlenmiştir. Elde edilen amplikon aynı ticari kit ile (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Almanya) jelden pürifiye edilmiştir.

- d.** Elde edilen F gen amplikonu ve pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS2DsRed plazmidi *NheI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Bu amaçla alttaki karışım ayrı ayrı hazırlanıp 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

<i>NheI</i> -HF (NEB, MA, ABD)	1 µl
<i>KpnI</i> -HF (NEB, MA, ABD)	1 µl
CutSmart® Buffer (10X) (NEB, MA, ABD)	2 µl (1X)

+ F amplicon (32 µg/µl)	~ 640 µg
+ pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS2DsRed	500 µg
Nükleaz free ddH ₂ O	25 µl'ye tamamlandı
Toplam	25 µl

- e. 6879 bç. uzunluğundaki linearize edilmiş plazmid %1 (v/w) agaroz jele yüklenerek 90 voltta 60 dk yürütülmüş, ardından bistüri yardımıyla amplicon jelden kesilerek ticari kit ile saflaştırılmıştır. Digeste edilen F ampliconu *KpnI* enzimi ısı inaktive olmadığından aynı kit ile saflaştırılmıştır. Bu işlemde sonra F ampliconu ve linearize pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS2DsRed için aynı parametreler kullanılarak (**alt başlık 4.4.1 – e**) ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.
- f. Ligasyon ürünün 10 µl'si 30 µl Dh5α *E. coli*'ye (Katalog No: 18258012 ThermoFisher, MA, ABD) transforme edilmiştir. Transformasyon metodu için **alt başlık 4.3**'teki **f**, **g** ve **h** basamakları takip edilmiştir.
- g. Pleytten seçilen kolonilerin doğrulanması için *in silico* tasarımı yapılmış MCS1 doğrulama primer seti kullanılmıştır. Bu amaçla petriden beş adet koloni pipet ucu yardımıyla alınmış, steril ddH₂O'da çözündürülmüş ve **alt başlık 4.4.1**'deki **g** ve **h** protokolü uygulanarak DNA eldesi sağlanmıştır.
- h. Elde edilen DNA örneklerinin doğrulanması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) şu parametrelere göre hazırlanmıştır.

10 µM CMV-MCS1-F	0.5 µl (0.2 µM)
10 µM CMV-MCS1-R	0.5 µl (0.2 µM)
Plazmid DNA (pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS2DsRed)	1 µl (300 ng)
Quick-Load Master Mix (2X) (NEB, MA, ABD)	12.5 µl (1X)
Nükleaz free ddH ₂ O	25 µl'ye tamamlandı
Toplam	25 µl

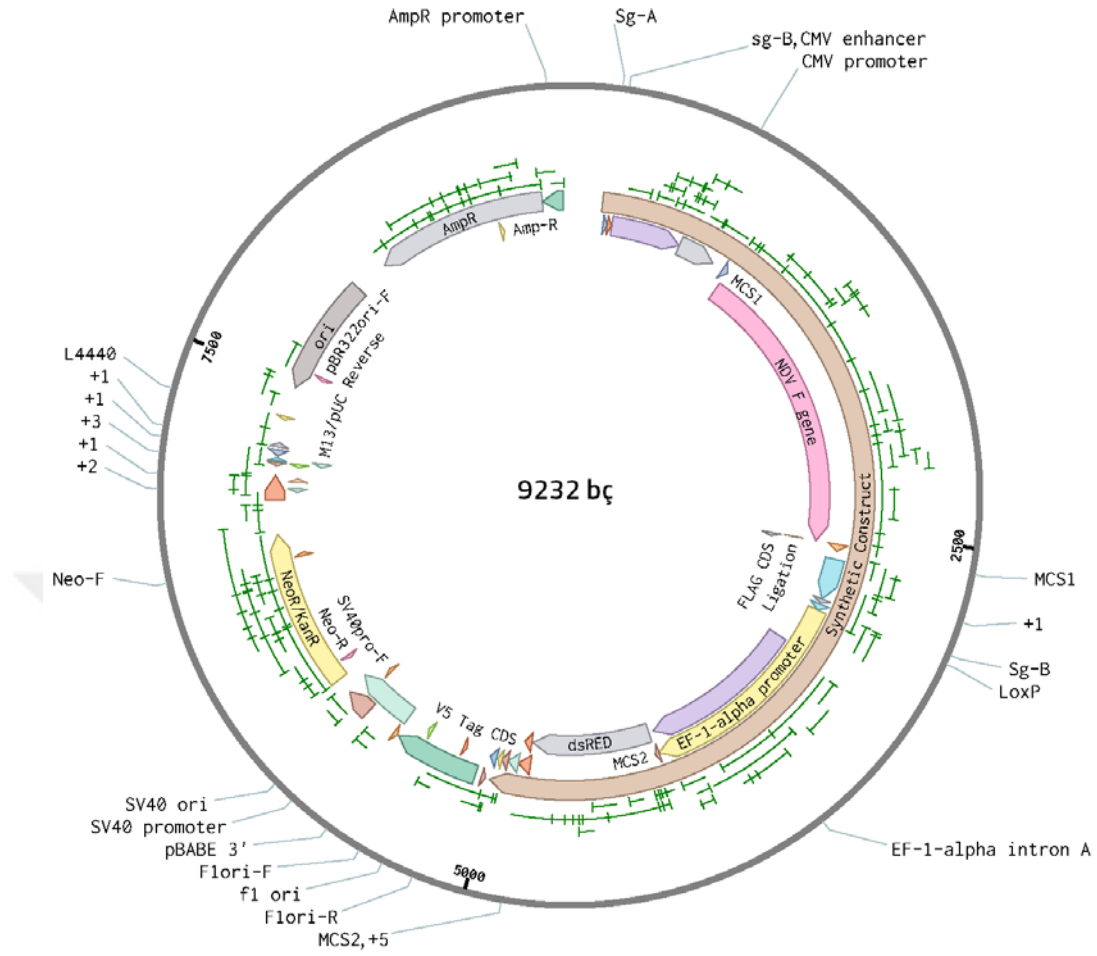
- i. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştirmek üzere termosiklus cihazı şu parametrelere göre ayarlanmıştır.

Ön Denatürasyon	1 siklus	94°C 1 dakika
Denatürasyon		94°C 45 saniye
Primer Bağlanması	35 siklus	56°C 45 saniye
Polimerizasyon		68°C 2 dakika
Final Uzatma	1 siklus	68°C 5 dakika

- j. Amplikonların her birisi %1 (v/w) agaroz jele yüklenerek 95 voltta 45 dk yürütülerek 1847 bç. amplikon veren kolonilerin plazmid DNA'sı CMV-MCS1-F primeri ile sekansa gönderilmiştir. Sekans ile onaylanan kolonilerden birisi stoklanarak "pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS1-F/MCS2-DsRed" adını almıştır. Oluşturulan donör plazmid Haritası Şekil 4'de gösterilmiştir. *F* geninin klonlanması ve doğrulanmasında kullanılan primer setleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Ad	Sekans	Amaç
DsRedClon2F	CCGGAATTCTCCACCATGGCCTCCTCCGAGGACG	Klonlama
DsRedClon2R	GTACTCTAGAGGCGCCGGTGGAGTGGC	
FClon1F	CTAGCTAGCTCCACCATGGGCTCCAAACTTTCTA	
FClon1R	GCCGGTACCTGCTCTTGTAGTGGCTCT	
CMV-MCS1-F	AACTAGAAGGCACAGTCGAGGC	Doğrulama
CMV-MCS1-R	AACTAGAAGGCACAGTCGAGGC	
pEF-MCS2-F	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCA	
pEF-MCS2-R	TTCCGCCTCAGAAGCCATAGAG	

Tablo 4: DsRed ve NDV-F genlerinin amplifikasyonunda ve amplifikasyonun doğrulanmasında kullanılan primer setleri.



Şekil 4: NDV F geni ve DsRed reporter gen kasetlerini içeren pCDNA3-CRISPR-Lox-MCS1-F/MCS2-DsRed plazmid haritası.

4.5. Rekombinant ILTV ve BHV-1' in Oluşturulması

4.5.1. BHV-1 Rekombinasyonunun Oluşturulması

- a. VERO E6 hücre hattı %10 serumlu DMEM kullanılarak T25 flask içerisinde üretilerek stok hücre hatları oluşturulmuştur. Ardından her iki hücre hattı %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak süspanse hale getirilmiş, 6 kuyucuklu pleyte ekilerek 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

- b.** 6 kuyucuklu pleytte yetiştirilen VERO E6 hücrelerinin transfeksiyonu için pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS2-DsRed (donör), pX459sgA, pX459sg142, pX459sg179, pX459sg435 plazmidleri kullanılmıştır. Altı kuyucuklu pleytteki her bir kuyucuk için deney grupları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

- A1 Donör Plazmid + pX459sgA+ pX459sg142 + pX459sg179
- A2 Donör Plazmid + pX459sgA+ pX459sg142 + pX459sg435
- A3 Donör Plazmid + pX459sgA+ pX459sg179 + pX459sg435
- B1 Donör Plazmid + pX459sgA
- B2 Donör Plazmid
- B3 Negatif Kontrol

- c.** Transfeksiyon için her bir kılavuz RNA 500 ng/μl olarak, donör plazmid 1 μg/μl olarak belirlenmiş, miktarınca Opti-MEM™ (Gibco, ABD) medyumunu ile karıştırılarak 125 μl'ye tamamlanmıştır.
- d.** 6 μl Lipofectamine® Ajanı (Katalog No: 11668019 ThermoFisher, MA, ABD) aynı şekilde Opti-MEM™ medyumunu ile 125 μl'ye tamamlanarak vortekslenmiş (1:3 oran), 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından bu iki solüsyon birleştirilerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir.
- e.** Vero hücreleri 1X PBS yıkama solüsyonu (Gibco, ABD) ile 3 kere yıkanarak 500 μl Opti-MEM™ medyumunu ilave edilmiş, inkübe edilen karışım saat yönünde damla damla olarak kuyucuklara bırakılmıştır. Negatif kontrol için sadece 750 μl OptiMEM kullanılmıştır. Ardından 37 °C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırılarak 36 saat inkübe edilmiştir.

- f. Otuzaltı saatin sonunda BHV-1 Cooper suşu 100 pfu değerinde inokule edilmiştir. Bu amaçla OptiMEM medyumunu uzaklaştırılarak hücreler PBS yıkama solüsyonu ile 2 kere yıkanmış, ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Ardından 200 µl BHV-1, negatif dahil tüm kuyucuklara inokule edilmiş ve 300 µl %2 FBS içeren DMEM medyumunu ile tamamlanarak adsorbsiyon için 37 °C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırılarak 2 saat inkübe edilmiştir. Pleyt 20 dakikada bir yavaşça çalkalanarak virüsün ortamda homojen dağılması sağlanmıştır.
- g. İki saatin sonunda inokulum ortamdan uzaklaştırılmış, yıkama işlemi olmaksızın kuyucuk başına 2 ml. olacak şekilde %2 FBS ve %1 agaroz (Gibco, ABD) içeren DMEM hazırlanarak her bir kuyucuğa ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlk inkübasyonun ardından her 12 saatte bir negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırılarak sitopatik etki ve ona paralel ilerleyen rfp sinyali takip edilmiştir.

4.5.2. ILTV Rekombinasyonunun Oluşturulması

- a. LMH hücre hattı %10 serumlu DMEM kullanılarak T25 flask içerisinde yetiştirilerek stok hücre hatları oluşturulmuştur. Ardından her iki hücre hattı %0.25 Trypsin-EDTA solüsyonu kullanılarak süspanse hale getirilmiş, 6 kuyucuklu pleyte ekilerek 37 °C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.
- b. Altı kuyucuklu pleytte yetiştirilen LMH hücrelerinin transfeksiyonu için pcDNA3-CRISPR-Lox-MCS1F/MCS2-DsRed (donör) ve pX459sgA, plazmidleri kullanılmıştır. Toplam 5 kuyucuk için deney grupları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

A1 Donör Plazmid + pX459sgA+ pX459UL501 + pX459UL502

A2 Donör Plazmid + pX459sgA

A3 Donör Plazmid

B1 Negatif Kontrol (+ve)

B2 Negatif Kontrol (-ve)

c. Katyonik lipid temelli transfeksiyon için Vero E6 hücreleri için uygulanan metotoloji takip edilmiştir (bkz. **Alt başlık 4.5.1; c, d ve e**)

d. Otuzaltı saatin sonunda üzerinde yeşil floresan reporter geni bulunan ILTV A489 suşu 100 pfu değerinde inokule edilmiştir. Kolaylaştırılmış adsorbsiyon tekniğiyle ekim için BHV-1 ile aynı metotoloji uygulanmıştır (bkz. **Alt başlık 4.5.1; f ve g**). Transfeksiyon gerçekleştirilmeyen B1 ve B2 kuyucuklarından yalnızca bir tanesine (B1) virüs inokule edilmiştir.

e. Dört saatin sonunda inokulum ortamdan uzaklaştırılmış, yıkama işlemi olmaksızın kuyucuk başına 2 ml. olacak şekilde %2 FBS ve %1 agaroz (Gibco, ABD) içeren DMEM hazırlanarak her bir kuyucuğa ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlk inkübasyonun ardından 7 gün boyunca her 12 saatte bir negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırılarak sitopatik etki takip edilmiş, paralel olarak yayılım gösteren rfp ve gfp sinyalleri takip edilmiştir.

4.5.3. Pozitif Olan Plakların Saflaştırılması ve Kùltivasyonu

- a. T25 flask içerisinde yetiştirilen her iki hücre stoğu %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak süspanse hale getirilerek bekletilmiştir. Hücre süspansiyonu serumsuz DMEM ile oluşturulmuştur.
- b. Pozitif olduğu düşünölen klonlar floresan invert mikroskop (Axio Vert.A1, Zeiss, Almanya) altında teyit edilip bulunduğu noktalar her iki deney için asetatlı kalem ile işaretlenmiştir. On µl'lik pipet ucu yardımıyla işaretlenen her bir koloni ~ 0.5 mm çapında kesilmiş, daha sonra içinde 100 µl serumsuz DMEM bulunan mikrosantrifüj tüpünde resüspanse edilerek jel parçasının mümkün olduğunca dağıtılması sağlanmıştır.
- c. Elde edilen 100 µl süspanse klonlar 24 kuyucuğun her birine ayrı ayrı aktarılmış, ardından klonun konakçısı olduğu bilinen süspanse hücre hattına ortalama 1×10^5 adet olacak şekilde (400 µl) üzerine pasajlanmıştır. BHV-1 ve ILTV klonlarını içeren pasajlar 37 °C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yirmidört saatin sonunda vasatların üzerine ~ 25 µl serum ilave edilerek %5 serumlu hale getirilmiştir.
- d. BHV-1 virüsü için CPE odağı ile rfp sinyal çakışması; ILTV için CPE odağı, rfp ve gfp sinyalinin çakışması ve bu sinyallerin hücreler arasında yayılımı 12 saatte bir invert mikroskop altında takip edilmiştir.
- e. İstenilen yayılımı gösteren her bir virüs klonunun titre artırımı için 6 kuyucuklu pleyte aktarılmıştır. Bunun için stok hücre hatları tripsinize edilerek %5 FBS içeren DMEM ile resüspanse hale getirilmiştir. Seçilen

klonun bulunduğu kuyucuktaki hücreler de pipet yardımıyla resüspanse edilerek inokulum olarak kullanılmıştır. Her bir klon, 6 kuyucuklu pleyte 3×10^5 adet hücre ile beraber pasajlanmış, ilk üç pasaj “sıfırıncı pasaj” (P0) olarak kabul edilmiştir.

- f. ILTV için pozitiflik saptanan klonlar “ Δ TK& Δ UL50-DsRed” olarak isimlendirilmiş ve pasajlanması sürdürülmüştür.

4.6. Reporter Genin Cre Rekombinazı Aracılığıyla Virüs Omurgasından

Çıkarılması

- a. T25 flask içerisinde yetiştirilen LMH hücre hattı tripsinize edilerek süspanse hale getirilmiş, 6 kuyucuklu pleyte 3×10^5 hücre olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM ile ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir.
- b. Ortalama %90 yoğunluğu sağlanan hücreler Lipofectamine® Ajanı (Katalog No: 11668019 ThermoFisher, MA, ABD) kullanılarak 2 μ g pCAG-Cre plazmidiyle (Addgene #13775) standart protokol dahilinde transfekte edilmiştir (bkz. **Alt başlık 4.5.1; c, d ve e**).
- c. Yirmidört saatlik inkübasyonun ardından hücreler 100 pfu ILTV- Δ TK& Δ UL50-DsRed rekombinant virüsü ile enfekte edilmiştir. İnokulasyon için kolaylaştırılmış adsorbsiyon tekniği (**Alt başlık 4.5.1-f**) kullanılmış, ardından yarı katı vasat kullanılarak 37 °C’de %5 CO₂ ortamda 12 saat arayla kontrol edilmek kaydıyla 5 gün inkübasyona bırakılmıştır (**Alt başlık 4.5.1 – g**).
- d. Oluşan klonların plaktan toplanması için rfp’nin kayda değer biçimde azalması beklenmiş, sadece CPE odağı ve gfp sinyali veren, rfp sinyali vermeyen klonlar belirlenmiştir. Bu klonlar plaktan pürifiye edilmiş, stok

LMH hücre hattı ile birlikte ekilerek titre artırımına gidilmiştir (bkz. **Başlık 4.5.3; a – e**). Elde edilen çift nakavt rekombinant suş $\Delta\text{TK}\&\Delta\text{UL50-F(Cre)}$ olarak adlandırılmıştır.

4.7. Virüs Klonlarının Doğrulanması

- a.** $\Delta\text{TK}\&\Delta\text{UL50-F(Cre)}$, $\Delta\text{TK}\&\Delta\text{UL50-DsRed}$ ve $\Delta\text{TK-GFP}$ suşu bu test için kullanılmıştır. Plaktan pürifiye her iki suş için beşer adet 1. pasaj (P1) klon ve negatif kontrol vt suşa ait örnekler (hücre inokulum süspansiyonu) viral DNA izolasyonu ticari kitin (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Almanya) protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Kasetin viral genom oryantasyonlarının belirlenmesi için aşağıdaki pirmer setleri kullanılmıştır.

UL50ext-F: CCGAACCGACAACGTATTGC

UL50ext-R: GATGCGTTCATTGCAGGCTG

Elde edilen viral DNA ile aşağıdaki karışımlar hazırlanmıştır.

10X Taq Tamponu (NEB, MA, ABD)	2.5 µl (1X konsantre)
10 mM dNTP mix (Invitrogen, ABD)	0.5 µl (200 µM)
10 µM Forward Primer	0.5 µl (0.2 µM)
10 µM Reverse Primer	0.5 µl (0.2 µM)
DNA ekstraktı	300 ng
Taq DNA Polimeraz (NEB, MA, ABD)	0.125 µl (0.025 U/µl)
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl (1.5 mM)
Nükleaz free ddH ₂ O	25 µl'ye tamamlandı
Toplam	25 µl

- b. Hazırlanan karışımlar iki virüs için beşer adet klonda ve ILTV-vt suşta aşağıdaki parametreler kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir.

Ön Denatürasyon	1 siklus	95°C 1 dakika
Denatürasyon		95°C 30 saniye
Primer Bağlanması	35 siklus	Alt başlık 4.7 – a
Polimerizasyon		68°C 1 dakika
Final Uzatma	1 siklus	68°C 5 dakika

4.8. Gen Ekspresyonunun Doğrulanması

4.8.1 SDS PAGE Jel Elektroforezi

- a. $\Delta TK\&\Delta UL50-F(Cre)$ ve $\Delta TK\&\Delta UL50-DsRed$ ILTV virüs suşlarının NDV'ye ait heterolog F geni ekspresyonu western blotlama analizi ile gösterilmiştir. Bunun için 6 kuyucuklu pleytte monolayer LMH hücre hattında iki suş ile beraber vt virüs inokule edilmiş, 72 saatlik inkübasyonun ardından hücreler +4 °C'de iki kere yıkanmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 100 µl NP40 hücre lizis solüsyonu (Thermo Fisher, ABD) ilave edilerek rocker üzerinde 60 dakika inkübe edilmiştir.
- b. Kuyucuktaki hücreler hücre kazıyıcı ile kazınarak mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 12.000 x g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiş, süpernatantlar alınmıştır.
- c. 25 µl örnek ile %10 Beta-mercaptoethanol içeren 8 µl LDS Örnek Tamponu (Novex, Life Technologies, USA) ile karıştırılarak

pipetlenmiştir. Bu halde 98 °C’de 5 dakika inkübe edilerek denature edilmiş, ardından derhal buza alınmıştır.

- d. Protein elektroforezi için poliakrilamid jel aşağıdaki oranlara göre hazırlanmıştır. Önce ayırma jeli hazırlanarak cam pleytler arasına eklenmiş, üzerine 1 ml. 2-propanol ilave edilerek 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından yükleme jel karışımı hazırlanarak üzerine eklenmiş ve 1 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır.

Kimyasal	Ayırma jeli (12%)	Yükleme Jeli (4%)
30% Akrilamid/Bis	6 ml.	1.98 ml
1.5M Tris-HCl, pH:8.8	3.75 ml.	-
0.5M Tris-HCl, pH:6.8	-	3.78 ml
10% SDS	150 µl	150 µl
ddH₂O	5.03 ml	9 ml
TEMED	7.5 µl	15 µl
APS 10%	75 µl	75 µl
Kullanılan miktar	7 ml/jel	~ 2 ml/jel

- e. Protein örnekleri ve protein standard ladder (PageRuler™, Thermo Fisher, ABD) Mini-Protean® Jel Elektroforez Sistemi (BIO-RAD, CA, ABD) kullanım prosedürüne uygun olarak jele yüklenmiş, güç kaynağı önce 80V 30 dakika, ardından 110V 1.5 saat olacak şekilde ayarlanarak çalıştırılmıştır.

4.8.2. Western Blotlama

- a. Proteinlerin membrana aktarılmasında yarı-kuru (semidry) blotlama tekniği kullanılmıştır. Poliviniliden diflorid (PVDF) membran 1 dk

metanolde aktive edilmiş, ardından distile su ile yıkanarak transfer tamponunda 5 dk, SDS jel ise 30 sn tutularak eşitlenmiştir.

- b.** Blotlama için Trans-Blot® Turbo (BIO-RAD, CA, ABD) transfer sistemi kullanılmıştır. Kasedin içerisine sırasıyla kalın blotlama kağıdı (BIO-RAD, CA, ABD), PVDF membran, SDS Jel ve tekrar blotlama kağıdı şeklinde yerleştirilerek kapatılmış, karışık MW modunda (2.5A, 25V, 15 min) çalıştırılmıştır.

- c.** Membran alınarak %5 Yağsız Süt tozu içeren TBST bloklama tamponu ile 1 saat süresince muamele edilmiştir. Bloklama tamponu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

TBS Tamponu (10X)	Tris baz	1.51 gr
	NaCl	5.48 gr
	ddH ₂ O	62.5 ml
TBST (1X)	TBS Tamponu (1X)	25 ml
	Tween 20	125 µl
	ddH ₂ O	225 ml
TBST Bloklama Tamponu (1X)	TBST (1X)	10 ml
	Yağsız Süt Tozu	0.5 gr
Toplam		250 ml

- d.** Bloklamadan sonra membran TBST ile bir kere yıkanmış, ardından 1:1000 oranında dilüe edilen anti F monoklonal antikoru (126) ile +4 °C’de bir gece muamele edilmiştir.

- e. Ertesi gün, membran TBST ile yıkanarak peroksidaz konjuge anti-fare antikoru (1:10000 dilüe, %5 yağsız süt tozu içeren TBST) ile oda sıcaklığında iki saat inkübe edilmiştir.
- f. Tekrar TBST ile yıkanarak blotlama substratı ile (Pierce™ ECL, Thermo Fisher, ABD) üretici firmanın protokolü doğrultusunda kullanılarak sonuçlar görüntüleme sisteminde (ChemiDoc™ MP, BIO-RAD, CA, ABD) kaydedilmiştir.

4.9. İndirekt İmmunofloresan Analizi

- a. F proteininin virüs enfekte hücrelerde ekspresyonunun ortaya çıkarılması için immünofloresan boyama tekniği kullanılmış, konfokal mikroskopi (LSM900, Zeiss, Almanya) görüntülemesine başvurulmuştur. LMH hücre hattı stoğu tripsinizasyon ile süspanse edilmiş, tabanında coverslip bulunan 24 kuyucuklu pleytlere ekilmiştir.
- b. ILTV-ΔTK&ΔUL50-F(Cre) ve ILTV ΔTK&ΔUL50-DsRed ve ΔTK-GFP hücrelere standart protokol ile inokule edilmiş, 48 saatlik inkübasyonun ardından protokole geçilmiştir. Hücreler iki kere +4 °C’de PBS ile yıkanmış, ardından paraformaldehit (%4 solüsyon, Thermo Fisher, ABD) ile fikze edilmiştir.
- c. Glisin-PBS solüsyonu (10 mM glisin) ile üç kere yıkanarak %0.1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, MO, ABD) içeren PBS ile 10 dk muamele edilmiştir. Ardından derhal glisin-PBS ile yıkanmıştır.

- d. Fare temelli Anti-FLAG primer antikoru (Sigma-Aldrich, MO, ABD) %0,5 BSA içeren PBS ile dilüe edilmiş halde eklenerek +4 °C’de bir gece inkübe edilmiştir.
- e. Ertesi gün glisin-PBS ile yıkanarak anti-fare ikincil antikoru da eklenmiş, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Hücre çekirdeği boyaması yapmak üzere (1:10000) 40,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, MO, ABD) kullanılmıştır.
- f. Coverslipler mounting medyumunu (Vectashield®, Vector Laboratories, CA, ABD) ile standart mikroskop lamalarına tutturularak hazır hale getirilmiştir. Lamalar immünofloresan invert mikroskop (Axio Vert.A1, Zeiss, Almanya) ve konfokal mikroskop (LSM900, Zeiss, Almanya) ile analiz edilerek fotoğraflanmıştır.

4.10. Rekombinant Virüsün Stabilitesinin Saptanması

- a. Eklenen F geninin Rekombinant ILT virüsü üzerindeki stabilitesinin araştırılabilmesi için ILTV Δ TK& Δ UL50-F(Cre) en az 8 nesil pasajlanarak P1 ve P5’den elde edilen örneklerden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlardan F geni FClon1F/R primer setleri kullanılarak amplifiye edilmiş, ampikonlar agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde (Gel Doc EZ™, BIO-RAD, CA, ABD) görüntülenmiştir.

4.11. *In vitro* Çoğalma Karakteristiği ve Plak Testi

- a. Rekombinant virüsün çoğalma karakteristiğinin ortaya çıkarılması için önce LMH hücre hattı 6 kuyucuklu pleytte çoğaltılmış, daha sonra

kuyucuklara Δ TK-GFP ILTV, Δ TK& Δ UL50-DsRed ILTV, Δ TK& Δ UL50-F(Cre) ILTV 0.2 MOI değerinde inokule edilmiştir. Daha sonra agaroz içeren DMEM ile kaplanarak 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Rastgele seçilen 30 adet plağın çapı floresan mikroskop altında program yardımıyla ölçülmüştür (Zeiss ZEN 3.1 Blue Edition, Almanya).

- b.** Plakların görüntülenmesi için kuyucuklara ntrl tamponlu %10 formalin (Sigma-Aldrich, MO, ABD) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş, ardından formalin ve kuyucuktaki agarlı yarı-katı medyum eşme suyu yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra %20 etanol içeren distile suyla hazırlanmış kristal violet (Sigma-Aldrich, MO, ABD) ile tekrar inkübe edilerek eşme suyu ile tekrar yıkanmış ve kurutulmuştur.
- c.** Tek adımda çoğalma grafiğinin karşılaştırılması için, LMH hücre hattı 24 kuyucuklu pleyte ekilerek monolayer haline getirilmiş, aynı virüsler 0.2 MOI değerinde inokule edilmiştir. Ardından her bir suş için 0, 6, 12, 24, 48 ve 72. saatte örnekler alınarak DNeasy Kit (Qiagen) ile elde edilerek gerçek zamanlı PZR ile ILTV gen kopyasının belirlenen saat başına bulunduğu kopya miktarı ölçülerek virüs kinetiği belirlenmiştir. Bu amaçla 147 bç. uzunluğunda ürün veren gB gen primer seti kullanılmıştır (127). Her bir virüs için PZR rnekleri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

2X SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl (1X konsantre)
10 µM Forward Primer	0.5 µl (0.25 µM)
10 µM Reverse Primer	0.5 µl (0.25 µM)
DNA ekstraktı	100 ng
Nükleaz free ddH ₂ O	20 µl'ye tamamlandı
Toplam	25 µl

PZR parametreleri alttaki gibidir.

Ön Denatürasyon	1 siklus	95°C 2 dakika
Denatürasyon		95°C 10 saniye
Primer Bağlanması	30 siklus	54°C 30 saniye
Polimerizasyon		72°C 30 saniye

- d.** Virüs ile enfekte ve kontrol gruplarının arasındaki ikili karşılaştırma Student's T-Testi ile gerçekleştirilmiş, tüm istatistiki analizler ve şekiller GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ile oluşturulmuştur.

5. BULGULAR

5.1. NHEJ-CRISPR/Cas9 Yaklaşımı ile Eşzamanlı Genlerin Silinmesi ve

Ekspresyon Kasedinin Virüs Omurgasına Yerleştirilmesi

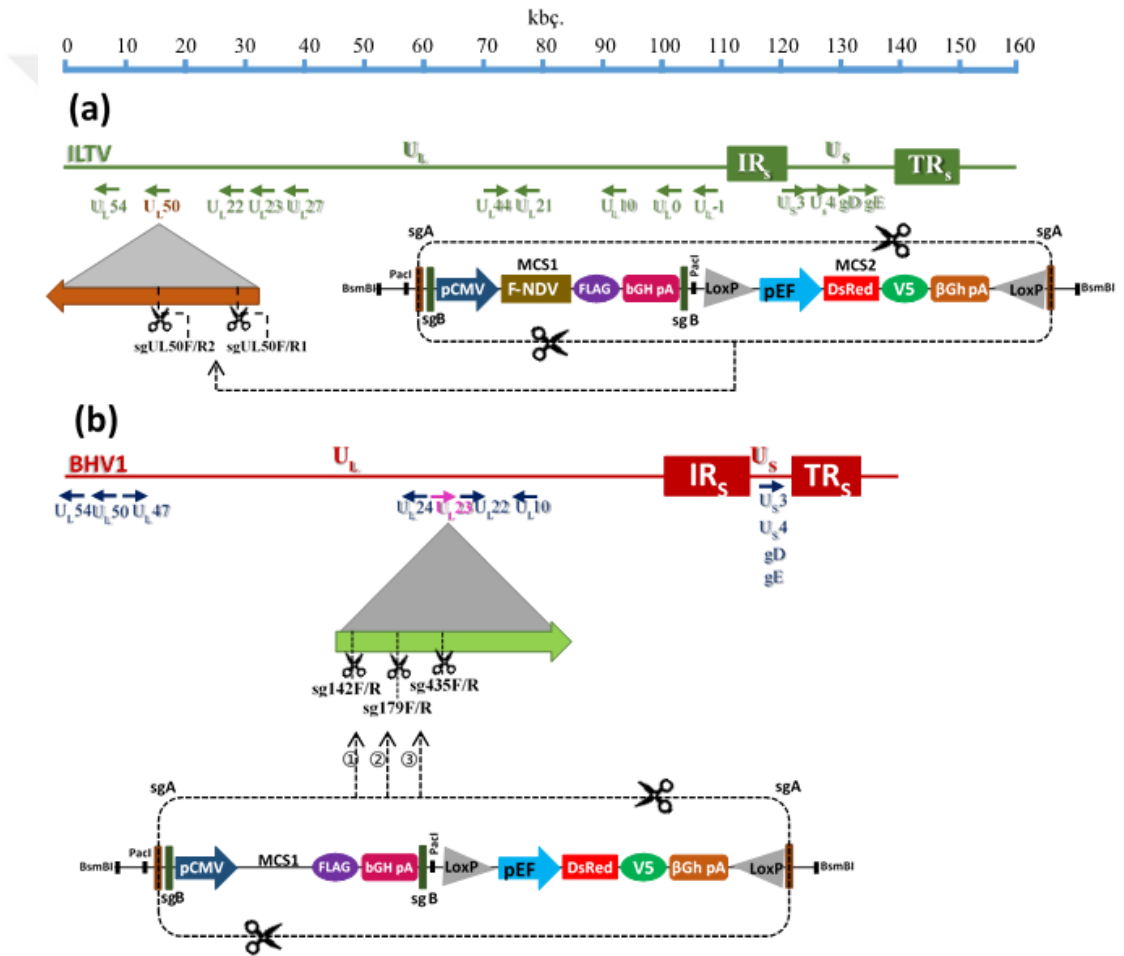
Gerek *UL50* (dUTPaz), gerekse *tk* (timidin kinaz) geni, *alphaherpesviridae* ailesi genelinde viral transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan en önemli yapısal olmayan genlerden ikisidir. *UL50* geninin ILTV patojenitesinde rol oynayan önemli virü lent faktörlerinden birisi olup bu genin silinmesinin hücreler arası yayılımı azalttığı ve *in vitro* attenüasyona neden olduğu bilinmektedir (128). Öte yandan *tk* delesyonunun her iki virüsün *in vitro* ve *in vivo* çoğalmasında esansiyel olmadığı, ayrıca virülensi kayda değer şekilde azalttığı bu güne kadar yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (82, 129).

Genom düzenleme yaklaşımının GaHV-1 ve BHV-1’de uygulanmasının gerçekleştirilebilmesi için paralel olarak iki çalışma yürütülerek IBR ve ILTV suşlarının *tk* gen pozisyonlarına sırasıyla *DsRed* ve *DsRed* ile *F* genlerinin eklenmesi amaçlandı. BHV-1 için üç adet kılavuz RNA tasarlanarak floresan genin *tk* üzerinde üç ayrı pozisyon üzerine insersiyonu çalışılsa da (Şekil 5B) neticelendirilemedi. Öte yandan *gfp* genini taşıyan *tk* defektif GaHV-1 A489 (Δ TK-GFP+ ILTV) ILTV suşunun *UL50* gen pozisyonuna istenilen heterolog genlerin yerleştirilmesi sağlandı. Bu amaçla öncelikle *UL50* geni CRISPR/Cas9 aracılı bölgeye spesifik iki adet kılavuz RNA aracılığıyla üst ve alt bölgelerden kesilerek çıkarıldı (Şekil 5A). İkinci bir nakavta bağlı istenmeyen etkilerin oluşmaması ve eklenen ikinci genin varlığının gözlemlenebilmesi için özel olarak tasarlanmış, virüsten bağımsız bir donör plazmid kullanıldı. Bu Plazmid; (1) Elongasyon faktör

alfa 1 (pEF α) promotoruna bağılı *DsRed* reporter genini ve en uğta poliA kuyruğunu taşıyan kaset ve (2) sitomegalovirüs promotoru (CMV) kontrolündeki Newcastle hastalığı virüsüne ait füzyon (*F*) geni ve poliA kuyruğundan ibaret olan iki kaset taşımaktadır. BHV-1 için aynı donör plazmidin sadece *DsRed* taşıyan versiyonu kullanıldı. Reporter geninin eklendiği kasedin her iki ucuna “LoxP” motifi dahil edilerek Cre-Lox sistemi aracılığıyla reporter genin virüs omurgasından çıkarılması amaçlandı. Ayrıca reporter gen kasedinin muhtelif pozisyonlarında gRNA’ların bağlanabileceği, “tuzak” motifler mevcut olacak biçimde tasarlandı (Şekil 5A ve 5B). Bunlardan sgA tüm kasedin taşıyıcı vektörden serbest kalmasını sağlarken sgB ise gerektiği takdirde çevrelediği kasedin çıkarılmasını sağlamak üzere konuşlandırılmıştır. Bu iki motifin kesilerek ekspresyon kasedinin serbest kalmasını ve her iki kasedin kesilerek çıkarılmasını sağlayacak olan gRNA’lar pX459v2 plazmidine yüklendi. Bu plazmid U6 promotoru aracılığıyla gRNA’ları, sitomegalovirüs promotoru (CMV) aracılığıyla da Cas9 proteinini bisistronik olarak sentezleyebilme özelliğine sahiptir. Donör plazmidin Cas9 ile kesilerek ekspresyon plazmidinin çıkarılması, aynı anda da U_L50 geninin kesilerek yerine *DsRed* ve *F* proteininin yerleştirilmesi Şekil 5 ile özetlenmiştir.

NHEJ, HDR tamir mekanizmasına göre daha önde gelen bir mekanizma olup çeşitli araştırmalar ile ökaryotik hücrelerde (130), hayvanlarda (110) ve DNA virüslerinde (131) gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmada NHEJ mekanizması kullanılarak ekspresyon kasedinin viral genoma eklenmesi sağlandı. BHV-1 ve GaHV-1 için bu sürecin, yani CRISPR/Cas9 sisteminin donör plazmidi ve virüs omurgasını kesecek şekilde çalışmasının gösterilebilmesi için LMH hücre hattı tüm plazmidler kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelere

Δ TK-GFP+ ILTV ve vahşi tip BHV-1 ile (MOI, 1.0) inokulasyonu gerçekleştirildi. Bu transfekte ve daha sonra enfekte edilmiş hücreler üç gün inkübe edilerek plaklarının tespiti için yapılması sağlandı. BHV-1 için plak formunda reporter sinyali elde edilemedi. Ancak ILTV için takribi 72. saat itibarıyla rfp reporter sinyali başarıyla tespit edildi. *Gfp* ve *DsRed* sinyali beraberce alınan progeni virüsler toplanarak tekrar sağlıklı hücrelere seri pasajlandı ve elde edilen bu varyant “ Δ TK/UL50-DsRed+ ILTV” olarak tanımlandı.

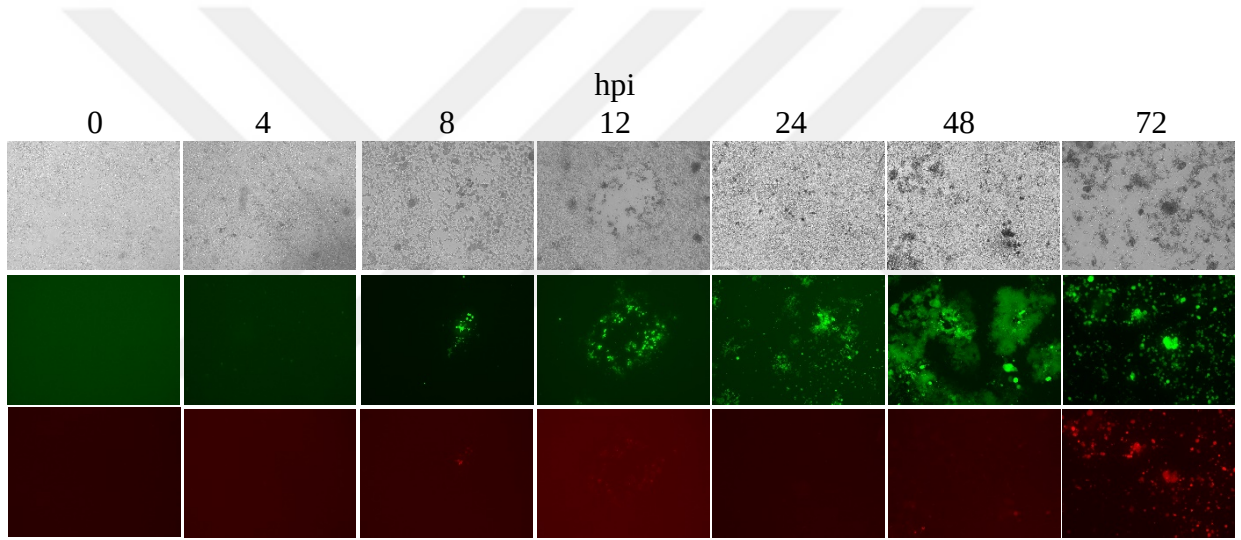


Şekil 5: Homoloji-bağımsız olarak GaHV-1 UL50 ve BHV-1 TK genlerinin silinerek yerlerine eşzamanlı, ILTV için DsRed ve NDV füzyon, IBR için sadece DsRed geninin insersiyonu. **(A)** ILTV genomunun linear grafiği ve donör plazmidin oluşturulma şeması. Donör plazmid 5' ucu promotor, 3' ucu poliadenilasyon

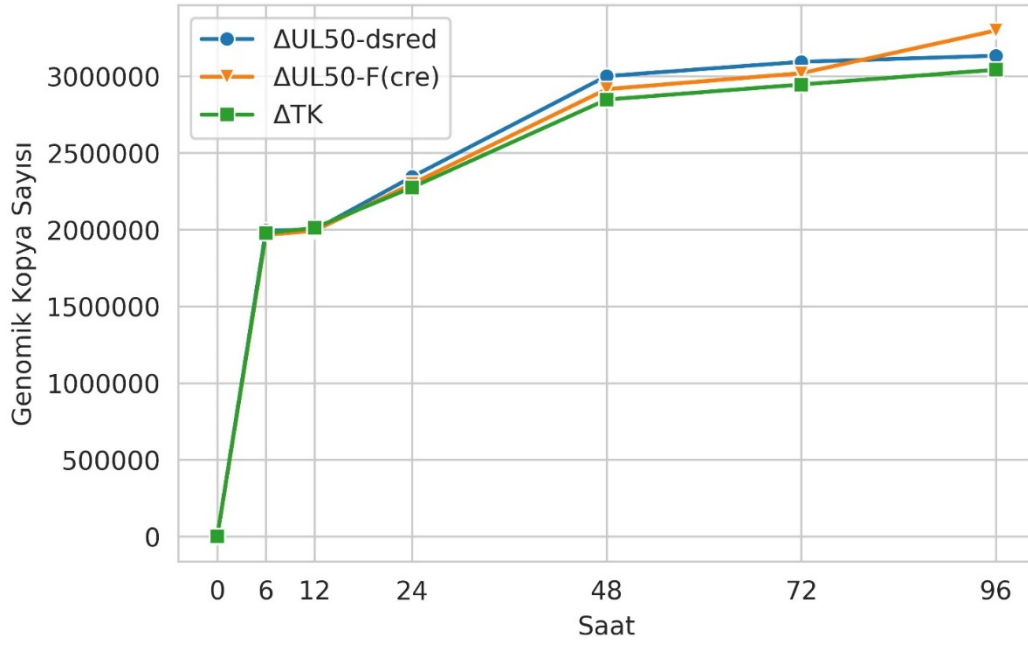
bölgesi bulunan iki adet klonlama bölgesi (MCS1 ve MCS2) içermektedir. İnsersiyon kasetlerinin oluşturulması için NDV-F geni MCS1'e, DsRed geni ise MCS2 pozisyonuna klonlanmıştır. DsRed ekspresyon kasedi LoxP ile çevrili olup Cre-Rekombinaz ile çıkarılabilir nitelik taşımaktadır. Kasetlerin dışına yerleştirilen Cas9'un keseceği hedef sekanslar (sgA ve sgB) yerleştirilmiş, böylece istenilen kaset(ler)in serbest bırakılabilmesi sağlanmıştır. Bütün bu düzen, tüm DNA parçasının pcDNA3.1 plazmidine klonlayacak BsmBI parçasını içermektedir. Donör plazmidin sgA noktasını ve virüsün UL50 hedefleyen gRNA çiftlerinin ekspresyonunu yapacak plazmidler ve donör plazmid ile LMH hücre hatları birlikte transfekte edilmiş, 24 saat inkübasyonun ardından daha önce tanımlanmış Δ TK-GFP+ ILTV inokulasyonu gerçekleştirilmiştir. **(B)** Aynı prensip, yalnızca DsRed taşıyan donör plazmid aracılığıyla BHV-1 için de uygulanmış olup TK geni için üç adet gRNA seçilmiş ve deney grupları bunların ikili kombinasyonları şeklinde uygulanmıştır.

DsRed ve *F* hedef geninin UL50 lokusuna yerleştiğinin doğrulanması *in silico* tasarlanmış, UL50 geninin her iki ucundaki bölgelere spesifik primer setleri kullanılarak (UL50ext-F/R) yapılmıştır. Bu amaçla üretilen rekombinant virüs, orijinal Δ TK-GFP+ ILTV'de mevcut olmayan, fakat istenilen noktada *F* ve *DsRed* insersiyonunu taşıdığı ortaya konulmuştur. Ancak bu noktada tasarlanan gRNA'ların etkinliğine bağlı olarak UL50 içerisinden bir parçanın çıkarılması yerine DSB'nin tek bir noktada gerçekleşerek ekspresyon kasedinin bu bölgeye yerleşme ihtimali mevcuttu. Bu nedenle kasedin yerleşeceği noktalar dışında 5' ve 3' uçlara spesifik primer setleri ile PZR amplifikasyonu gerçekleştirilerek ürün uzunluğuna göre UL50 delesyonunu ve ~5 kbç. uzunluğundaki insersiyonun

istenilen bölgede gerçekleştiği bant uzunluğuna bağlı olarak gözlemlendi. Ardından PZR ürünü aynı primer setleri ile çift yönlü olarak sekanslanarak çalışmada amaçlanan insersiyon/delesyon (indel) reaksiyonunun eşzamanlı meydana gelerek ve NHEJ aracılı DNA onarım mekanizmalarının gerçekleştiği, bölgelerden U_L50 geninin silindiği ve yerine *DsRed* reporter ve *F* genlerinin eklendiği kanıtlandı. Ayrıca eklenen *DsRed* ve *F* genlerinin replikasyon kinetiği üzerinde kayda değer bir fark ortaya çıkarmadığı muhtelif zamanlarda yapılan mikroskop görüntülemesi (Şekil 6) ve gerçek zamanlı PZR (Şekil 7) ile gösterildi.



Şekil 6: Δ TK& Δ UL50-DsRed ILTV ile enfekte hücrelerin 3 gün içindeki farklı zamanlarda her iki reporter gen için immünfloresan mikroskop altında görüntülenmesi.

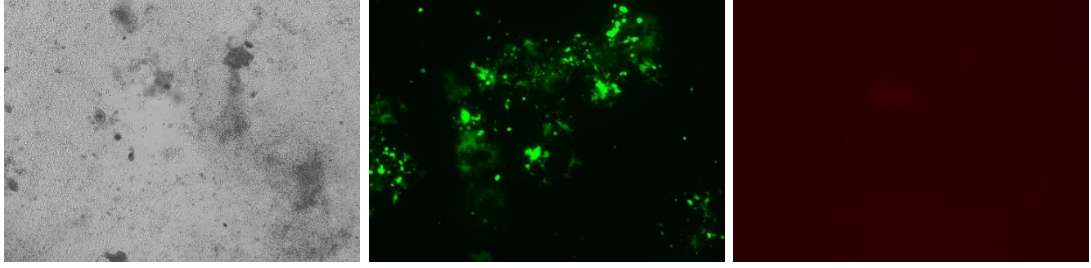


Şekil 7: LMH hücre hatlarına $\Delta TK \& \Delta UL50-F(Cre)$ ILTV, $\Delta TK \& \Delta UL50-dsRED$ ILTV ve ΔTK -GFP inokulasyonu gerçekleştirilerek, enfekte hücreler çeşitli zaman dilimlerinde toplanıp her bir örnekten DNA eldesi sağlandı. *In vitro* çoğalma kinetiği *gB* genine yönelik gerçek zamanlı PZR metodu ile araştırıldı.

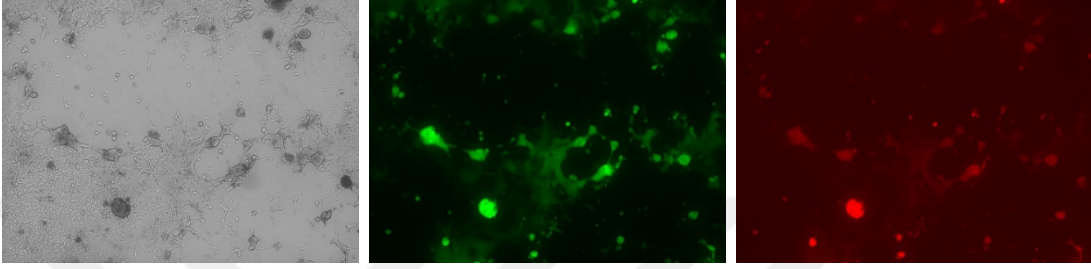
5.2. Ekspresyon Kasedi Olarak Eklenen DsRed'in ΔTK -GFP& $\Delta UL50$ -DsRed+F ILTV' den Cre-Lox Rekombinaz Aracılı Olarak Çıkarılması

DsRed ekspresyon kasedinin $\Delta TK \& \Delta UL50$ -DsRed+ ILTV'den çıkarılabilmesi için LMH hücre hattı rekombinant virüs inokulasyonundan bir gün önce pCAG-Cre plasmidi (Addgene#13775) ile transfekte edildi. *DsRed* sentezinin olmadığı, sadece *gfp* sentezinin meydana geldiği plaklar belirlenerek kurtarıldı (Şekil 8). Kurtarılan bu plaklar pürifiye edilerek " $\Delta TK \& \Delta UL50F(Cre)$ ILTV" olarak isimlendirildi. *DsRed*'in çıkarılması, *DsRed*'e yönelik PZR primerleri (DsRedClon2F/R; bkz. Tablo 4) kullanılarak PZR ile doğrulandı. *DsRed* ekspresyon kasedi sadece $\Delta TK \& \Delta UL50$ -DsRed+ ILTV'de tespit edilirken $\Delta TK \& \Delta UL50$ -F(Cre) ILTV' de bulunamadı.

ILTV Δ TK/UL50-DsRed Cre Rekombinaz Transfekte 72hpi

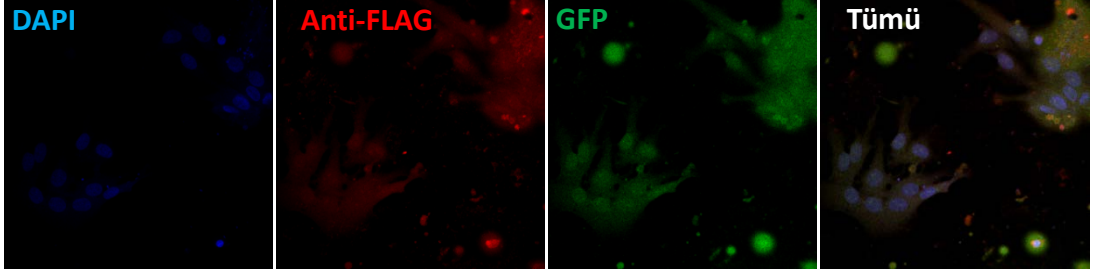


ILTV Δ TK/UL50-DsRed Kontrol 72hpi

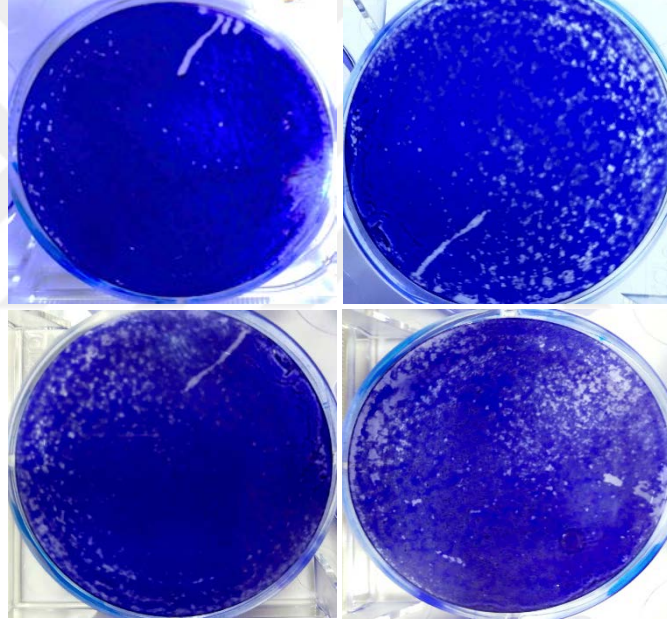


Şekil 8: LMH hücre hattı Cre-Rekombinaz ekspresyon plazmidini ile transfeke edilerek, post-transfeksiyon 24. saatte Δ TK& Δ UL50-dsRED'in inokulasyonu gerçekleştirildi. Yetmişikinci saatin sonunda Cre rekombinazı aracılığıyla dsRED kasedi çıkarılarak Δ TK& Δ UL50-F(Cre) suşunun eldesi sağlandı.

NDV'ye ait F proteinine yönelik immün boyama gerçekleştirildiğinde *DsRed* eksizyonuna rağmen *F* proteinin başarılı bir şekilde eksprese olduğu ortaya çıkarıldı (Şekil 9). *DsRed*'i çıkarılan rekombinant virüs plak test (Şekil 10) ve gerçek zamanlı PZR (Şekil 6) aracılığıyla Δ TK-GFP+ ILTV ve Δ TK& Δ UL50-DsRed+ suşları ile karşılaştırıldı. Tüm bu veriler Cre-Lox sisteminin elde edilen rekombinant virüsün çoğalabilme yetkinliğine zarar vermeksizin reporter genin viral omurgadan başarıyla çıkarıldığını kanıtlamaktadır.



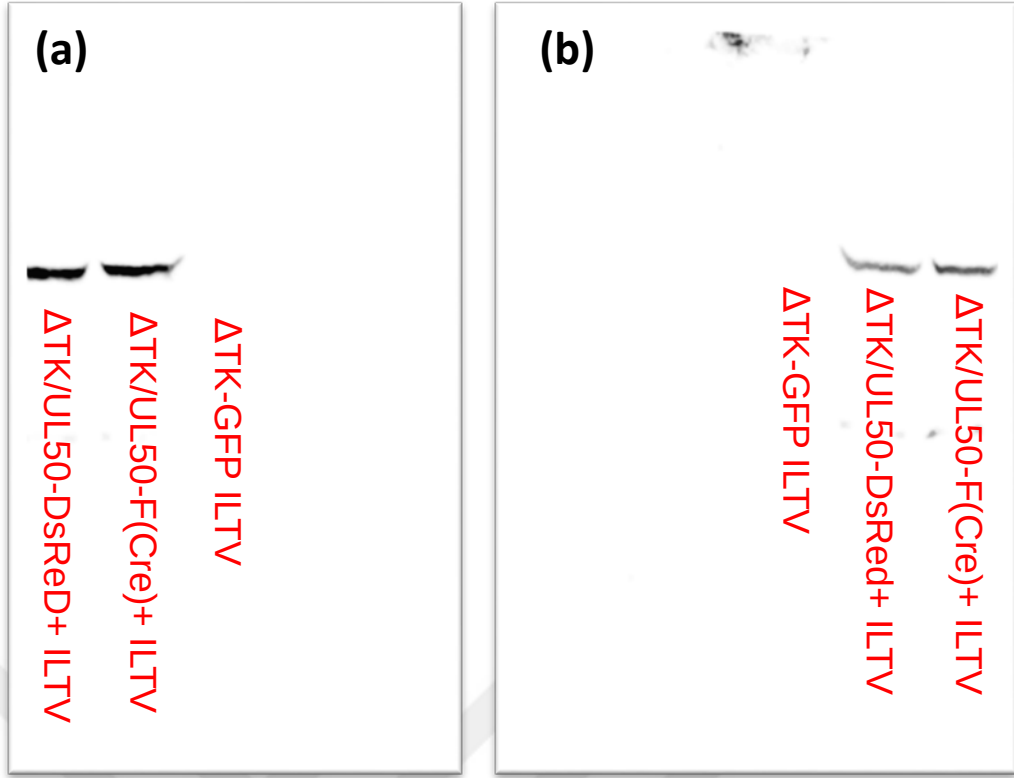
Şekil 9: LMH hücre hattına $\Delta\text{TK}\&\Delta\text{UL50-F(Cre)}$ inokulasyonu gerçekleştirilmesinin ardından anti-FLAG antikorunu kullanılarak indirekt immüno Floresan antikor tekniği ile boyandı. Boyanan preparat konfokal mikroskop ile görüntülendi.



Şekil 10: 6 kuyucuklu pleytte üretilen monolayer LMH hücre hatları: Negatif kontrol (sol üst), $\Delta\text{TK-GFP ILTV}$ (sağ üst), $\Delta\text{TK}\&\Delta\text{UL50-dsRED+ve ILTV}$ (sol alt) ve $\Delta\text{TK}\&\Delta\text{UL50-F(Cre) ILTV}$ (pasaj 8) (sağ alt) ile enfekte edilerek, 2 saat inkübasyonun ardından agaroz içeren medyum ile kaplandı. On günün sonunda plaklar kristal viyole ile boyanarak gözlemlendi.

5.3. ILTV Üzerinde NDV Füzyon Proteininin Stabil Açıklanması

CRISPR/Cas9 ve Cre-Lox sistemlerini kullanarak etkin, güvenilir ve hızlı bir biçimde rekombinant aşı adayının üretimini takiben *F* geninin rekombinant ILTV aracılı olarak açıklanması araştırıldı. Bu amaçla LMH hücre hattı negatif kontrollü olarak vt ILTV, Δ TK-GFP+ ILTV ya da Δ TK& Δ UL50-DsRed+ ILTV ile inokule edildi, ve daha sonra alınan hücre lizatu *F* proteinin açıklanmasının kanıtlanmasında kullanıldı. Anti-NDV *F* antikorunu kullanılarak blotlama yapılmış, yükleme kontrolü olarak alfa tubulin kullanılmıştır. Beklenildiği gibi Δ TK& Δ UL50-DsRed+ ILTV enfekte hücreler *F* proteinini açıklamış (Şekil 11) olup bu vahşi tip ILTV ve Δ TK-GFP+ enfekte hücrelerde gözlemlenmemiştir. Daha sonra Cre-Lox aracılı olarak DsRed geni çıkarılan virüste bu işlemin *F* geninin açıklanmasına olan etkisi araştırılmış, bu amaçla hücreler aynı şekilde Δ TK& Δ UL50-Cre ILTV ile enfekte edilerek 5 nesil pasajlanmıştır. Beklenildiği gibi *F* proteinin stabil olarak viral genom üzerinde mevcut olduğu ve pasajlar içerisinde değişim göstermediği gözlemlenmiştir (Şekil 12). Bu sonuçlar Cre-Lox sisteminin ILTV virüs omurgasından geni istenmeyen bir etki olmaksızın silebildiğini göstermektedir.



Şekil 11. CRISPR/Cas9 ve Cre-Lox ile oluşturulan rekombinant ILTV suşlarının karakterizasyonu **(A)** LMH hücre hatları birinci pasaj sırasıyla vt ILTV Δ TK-GFP ILTV, Δ TK-GFP/UL50-DsRed+ ILTV ve Δ TK-GFP/UL50-F(Cre) ILTV ile inokule edildi, ardından 48 saat inkübe edildi. Ardından hücreler lize edilerek F proteininin ekspresyonu western blotlama ile doğrulandı. Alfa tubulin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. **(B)** Aynı işlem 8. pasaj virüsler için tekrar uygulanarak F proteinin stabil ekspresyonu ortaya konuldu.

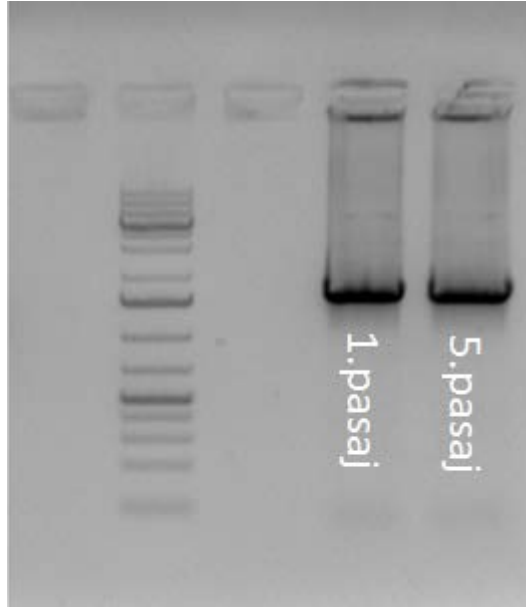
5.4. Rekombinant ILTV' nin *In vitro* Replikasyonu ve Stabilitesi

F proteinin başarılı bir şekilde eksprese olduğunun gösterilmesini takiben viral gen eklemenin virüs çoğalma kinetiğine olan etkisi araştırıldı. Bu noktada LMH hücre hattı parenteral A489 suşu ve rekombinant ILTV varyantları ile enfekte edilerek virüs replikasyonu gerçek zamanlı PZR ve floresan mikroskop altında

takip edildi. Virüsün *in vitro* çoğalma kinetiği için Δ TK-GFP, Δ TK& Δ UL50-DsRed ve Δ TK& Δ UL50-F(Cre) için anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 7).

Ekspresyon kasedinin stabilitesinin tahmini için genom düzenleme ile oluşturulan rekombinant ILTV, LMH hücre hattında 8 nesil pasajlanarak ardından eklenen kaset için *F* genine yönelik PZR analizi yapıldı. Virüsün devamlı pasajlanması *F* gen ürününün kaybına neden olmadığı üzere kasedin ILTV'ye stabil bir biçimde entegre olduğu ortaya çıkarıldı. (Şekil 12). İlaveten parenteral ILTV ve 8 nesilden fazla pasajlanan ILTV'nin plak test sonuçları karşılaştırıldığında ortalama plak boyutları ve şekilleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 10).

Bu iki veri bir arada değerlendirildiğinde ILTV genomuna CRISPR/Cas9 aracılı transgenik müdahalenin güvenilir ve stabil bir yöntem olduğu ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 12: *F* geninin ILTV genomu üzerindeki entegrasyonunun iki farklı nesil için ortaya konulması. Δ TK&UL50-F(Cre) suşu 5 nesil pasajlanarak 1. ve 5. nesil virus

DNA'sı üzerine yerleştirilen *F* geni “FClon1F/R” primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Neticede heterolog genin seri pasajlamalar ile kaybedilmeyip stabil olarak viral genomda mevcut olduğu ortaya konuldu.



6. TARTIŞMA

Yürütülen bu tez çalışmasında NHEJ-CRISPR/Cas9 aracılı eşzamanlı delesyon-insersiyon metodunun seçilen iki alfa herpesvirüs (GaHV-1 ve BHV-1) üzerinde bulunan virülens ilişkili genlere uygulanarak, bu genlerin nakavtının, aynı zamanda gen pozisyonlarına yerleştirilecek heterolog genin başarıyla ekspresyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

Viral gen mühendisliği gerek klinik uygulamalarda gerekse gen çalışmalarında son derece önemli olup bugüne kadar geliştirilen metotlar özellikle büyük genomların klonlanmasında problem teşkil etmekte, ayrıca rekombinasyon etkinliği genelde beklenenden düşük gerçekleşmektedir. Öte yandan *E. coli* temelli homolog rekombinasyonun etkinliği nispeten yüksek olsa da BYK'nın oluşturulması uzun zaman alan ve fazlaca laboratuvar uygulaması gerektiren bir tekniktir (113). Buna karşın “RNA-kılavuzlu endonükleaz” olarak tanımlanan CRISPR/Cas9 sistemi büyük viral DNA genom manüplasyonlarında son yıllarda sıklıkla kullanılan başarılı, çok yönlü ve spesifik bir araç haline gelmiştir. CRISPR aracılı herpesviral DNA düzenlemenin ilk örneği Bi ve ark. (2015) tarafından herpes simpleks 1 virüsüne (HSV-1) uygulanmıştır. Çalışmada enfeksiyonu latent olarak taşıyan nazofarengeal karsinoma hücreleri *UL23* genine yönelik CRISPR plazmid çifti ve her iki ucu HDR'yi indüklemek üzere virüse homolog parçalar ile çevrili GFP ekspresyon kasedi taşıyan vektör plazmid ile transfekte edilerek reporter gen eksprese edebilen recombinant HSV-1'in eldesi sağlanmıştır (111). Ardından bu homolog sekans aracılı, etkinliği artırılmış HDR-CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak başka herpesviral genomlar da başarıyla düzenlenmiştir. *Luc* (ateş böceği lusiferazı) ve *gfp* ekspresyonu taşıyan yalancı kuduz virüsü (*Suid*

*alpha*herpesvirus 1) (132); yüksek patojeniteli H5N1 hemagglutinin geni ve ördeklerin Tembusu virüsü zarf (*E*) proteini insert edilmiş ördek enterit virüsü (*Anatid alpha*herpesvirus 1; AtHV-1) (118); ve *DsRed* insert edilmiş Epstein-Barr virüsü (*Human alpha*herpesvirus 4) (133) bu metodun kullanımına örnek olarak verilebilir. Öte yandan aynı metot vaccinia virüs MVA suşuna ait *N1L* ve *A46R* gen pozisyonuna ayrı ayrı *rfp* reporterinin insersiyonunun gösteriminde de uygulanmıştır (115). Daha sonra çift gen kasetlerin insersiyonunda reporter genlerin çıkarılabilmesi için MVA’da kullanılacak vektör plazmidler geliştirilerek LoxP ve FRT motifleri eklenmiş, böylece reporter genin bölge spesifik rekombinazlar aracılığıyla rekombinant virüs omurgasından çıkarılabileceği ortaya konulmuştur (134).

HDR-CRISPR/Cas9 için tasarlanan bir vektörün oluşturulması fazla miktarda laboratuvar pratiği gerektirmekte, ve bazı hücre tiplerinde homolog rekombinasyonun indüklenmesinin zor olduğu bilinmektedir (135). Ayrıca yürütülen çalışmalar NHEJ’in bir hücre siklusunun her aşamasında meydana gelirken HDR tamirinin yalnızca S ve G1 fazlarında gerçekleşebildiğini, dolayısıyla NHEJ aracılı rekombinasyonun HDR’ye göre daha yüksek etkinliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur (136). Tüm bu araştırmalar, CRISPR aracılı rekombinasyon için alternatif yaklaşımları beraberinde getirmiştir. Homoloji bağımsız CRISPR/Cas9 (NHEJ-CRISPR/Cas9) ilk olarak Xu ve ark. (2015) tarafından yalancı kuduz virüsünde tanımlanmış olup çalışmada düşük transfeksiyon etkinlikli PK-15 hücre hattında virüse ait *EPO* geni kesilmiş, aynı zamanda tuzak sekanslar ile *DsRed* reporter kasedi serbest bırakılmış ve ardından NHEJ aracılı tamir mekanizmasıyla kasedin viral genomun istenilen pozisyonuna insersiyonu gerçekleştirilmiştir (114).

Öte yandan Cre-Lox sistemi NHEJ temelli vektörlerde de kullanım bulmuş, özellikle ökaryotik hücrelerin düzenlenmesinde kullanılabileceği kanıtlanmıştır (137). NHEJ-CRISPR/Cas9 ve Cre-Lox sistemi aracılı viral genomun düzenlenmesi ilk olarak Tang ve ark. (2018) tarafından gösterilmiştir. Çalışmada MeHV-1'e (*Meleagrid alphaherpesvirus 1*) ait *UL45-UL46* intergenik bölge tek bir kılavuz RNA aracılığıyla kesilmiş, bu bölgeye LoxP motifi ile çevrili *DsRed* reporteri ile beraber Newcastle hastalığına ait *VP2* geni insert edilmiş ve son basamakta Cre rekombinazı sentezleyen bir ekspresyon vektörü kullanılarak rekombinant virüs reporter genden arındırılarak heterolog gen kasedi bulunduran bir suşun eldesi sağlanmıştır (119). Çift kılavuz RNA kullanılarak eş zamanlı gen delesyon ve insersiyonu ilk olarak GaHV-1'e uygulanmış, yürütülen çalışmada önce virüse ait *tk* geni çıkarılarak yerine *gfp* reporter geni eklenerek konsept ispatlanmış, ardından ikinci bir uygulamayla virüse ait *US4 (gG)* geninin büyük bir kısmı silinerek yerine newcastle hastalığına ait *F* geni ve *DsRed* reporter geni yerleştirilmiştir. Son basamakta da *DsRed* reporter geni Cre-Lox mekanizması kullanılarak başarıyla omurgadan çıkarılmıştır (138). Çift gRNA kotransfeksiyonu yapılarak viral gen *knockout* ve *knock-in* etkinliğinin kayda değer miktarda artırabildiği bilinmektedir (139). Dolayısıyla yürütülen bu çalışmada çift gRNA ile eş zamanlı delesyon ve tuzak gRNA aracılı ekspresyon kasedi insersiyon metotlarının kullanımı tercih edilerek füzyon geni eksprese edebilen bir rekombinant aşı adayı başarıyla üretilmiştir. Böylece NHEJ/CRISPR-Cas9 ve Cre-Lox sistemlerinin bir arada kullanılarak yeni aşı platformlarının tanımlanmasında son derece etkili, hızlı ve güvenilir metotlar olarak doğrulanması sağlanmıştır. Bu yaklaşım ile yalnızca viral genom düzenleme değil, ayrıca ökaryotik hücre

genomuna da çeşitli amaçlar ile müdahalenin de gerçekleştirilebileceği öngörülmektedir.

Virülensi azaltılmış, aynı zamanda stabil bir GaHV-1 suşunun üretilmesi için ILTV'ye ait bir dizi gen (*tk*, *gG*, *UL47*, *UL0*, *UL50*, *ORFC*) silinerek rekombinant varyant suşların üretimi gerçekleştirilmiş olup bu suşların bazıları çeşitli *in vivo* çoğalma defektleri ortaya çıkardığından aşı adayı olarak göz önünde bulundurulmamıştır. Neticede rekombinant, gen delesyonlu GaHV-1 suşunun oluşturulmasında güvenlik ve koruma etkinliği arasındaki dengenin sağlanması son derece önem arz etmektedir. GaHV-1 virülensine ilişkin genin silinmesinin aşı için birden fazla gene bağlı olan virülens ile immünojenite arasındaki kritik dengenin bozulduğu bilinmektedir. Dolayısıyla bu dengenin başarıyla sağlanabilmesi için GaHV-1 rekombinant canlı-attenüe aşı stratejisinin birden fazla genin silinmesi ya da mutasyona uğratılması üzerine kurulması üzerinde durulmaktadır (98). Dolayısıyla bu çalışmada tek bir gene bağımlı kalmak yerine ikili gen delesyonu için *UL50* hedef gen olarak seçilerek daha öncesinde tanımlanan, aynı yöntem ile halihazırda oluşturulmuş *tk* defektif GaHV-1'e (138) uygulanmış, böylece çift delesyonlu varyantın eldesi sağlanmıştır. Sonrasında bu virüsün karakterizasyonu gerçekleştirilerek virüsün vahşi tip ile kıyaslandığında *in vitro* çoğalma yeteneğinde önemli bir kayba sahip olmadığı gösterilmiştir.

Timidin kinaz geni bakteriyel, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde bulunabilen, nükleozid kurtarma yolağı ilişkili bir gendir. Hücresel *tk*'lar sitozolik *tk1* ve mitokondriyal *tk2*'nin dahil olduğu temel enzimlerden ibaret olup bu yolak içerisinde ATP γ -fosfatının 2' deoksi-timidine (dT) aktarılmasında bir anahtar vazifesi göstermekte, magnezyum iyonları (Mg^{+2}) varlığında timidin monofosfat

(dTMP) oluşturmaktadır. Bazı DNA virüsleri ve herpesvirüslerin büyük bir çoğunluğu viral TK genine sahiptir. *Alphaherpesvirinae* alt ailesinde, özellikle HSV-1 üzerinde yapılan çalışmalar viral TK ekspresyonunun virüsün akut ya da latent faz karakterizasyonunda önemli rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (81). Timidin kinaz delesyonu (*tk*⁻) HSV-1 ile yapılan *in vivo* çalışmalar, sensörük nöron hücreleri de dahil olmak üzere virüsün hücre replikasyonunda esansiyel olmadığı, ancak immünkompetan farelerin trigeminal gangliyon ve beyinde çoğalması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bunun sebebinin nöronların postmitotik dönemde hücresel kinaz üretmeyi bırakması olduğu düşünülmektedir (140, 141). Timidin kinaz protein ekspresyonunun hücrenin G1'den S fazına geçmeden hemen önce artış gösterdiği bilinmekte olup hücrenin aktif olarak G1 döneminde olduğunu gösteren bir indikatördür (142, 143). Ayrıca bazı herpesvirüslere ait viral kinazların DSB durumunda ortaya çıkan H2AX histon proteinini fosforile edebildiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (144).

Timidin kinaz delesyonunun virülensi azalttığı *alphaherpesvirinae* alt ailesine mensup birçok virüste ortaya konulmuştur. Örneğin, yalancı kuduz üzerinde yapılan bir çalışmada, *tk* nakavt virüsün bölünmeyen hücrelerde kolonizasyonunun azaldığını, bununla beraber *gI/gE* kompleksi ile birlikte silinmesi sonucunda virüsün nörotropik özelliğinin kayda değer miktarda düşürülebildiği gösterilmiştir (145). Benzer şekilde HSV-1 ve HSV-2 suşu için *tk* geni nöral dokuda etkili bir virüs replikasyonu ve *in vivo* patobiyolojik potansiyelinin ortaya çıkması için gerekli olduğu bilinmektedir (146). Chowdhury (1996), *tk* delesyonlu BHV-1'in (Gal-TK) tek adımda çoğalma eğrisi parental virüse göre farklılık göstermese de sığırlara yapılan nasol uygulamadan sonra

virüsün daha düşük titrede çoğaldığı ve progeni virüs saçılımının azaldığını ortaya koymuştur (147). Han ve ark. (2002) *gfp* reporter eksprese edebilen *tk* GaHV-1 virüsünün SPF tavuklarda daha düşük virülens özellik gösterdiğini, mortalite oranını yarı yarıya azalttığını ve kısa süreli ve hafif seyirli klinik belirtilere neden olduğunu göstermiştir (129).

Deoksiüridin trifosfataz (*dUTPaz*; *UL50*) geni HSV-1 ve HSV-2, VZV, BHV-1, yalancı kuduz ve EBV gibi herpesvirüs türlerinde mevcut bir diğer nükleotid metabolizması ilişkili enzimi olup DNA sentezi sırasında genoma bağlanma ihtimali olan dUTP'yi dUMP'ye çevirerek yanlış eşleşmeye bağlı mutasyon oluşumuna engel olur (128, 148, 149). Yapılan son çalışmalar bazı insan herpesvirüslerine ait dUTPazların immünmodülatör fonksiyonunu ortaya çıkararak herpesviral enfeksiyonlarda önemli bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir (150). Pyles ve ark. (1992) *UL50* geni silinen HSV-1'in farelerde nöroinvazyon ve nörovirülens özelliğini yüksek miktarda kaybettiğini, latent enfeksiyon oluştursa da reaktivasyon frekansının oldukça azaldığını ortaya koymuştur. Jöns ve ark. (1998), yalancı kuduz virüsüne ait *UL50* delesyonunu gerçekleştirmiş, *UL50* negatif virüsün vahşi tip suşa göre progeni virüs oluşturmada geciktiğini, ancak virüs attenüasyonunun gerçekleştiği, domuzlar üzerinde yapılan denemeler ile ortaya koymuştur (151). Fuchs ve ark. (2000) GaHV-1 *UL50* geninin non-esansiyel bir gen olduğunu, ancak bir virülens faktörü olmadığını bildirmiştir. Yapılan çalışmada ΔU_{L50} , ΔU_{L50} -GFP ve vt ILTV suşlarının *in vivo* çoğalma eğrisinde fark göstermediği, ancak ΔU_{L50} -GFP'nin plak çapının diğerlerine göre küçük olduğu; kanatlılara yapılan intratrakeal uygulamada klinik belirti, mortalite ve solunum sistemi patolojisi bakımından ΔU_{L50} ile vt ILTV arasında kayda değer bir fark

görülmediği ortaya konulmuştur (151). Bir diğer çalışmada ise üretilen ΔU_L50 -GFP suşunun reporter geni, rekombinasyon aracılı olarak kanatlı influenza virüsüne ait hemagglutinin (*H5*) geni ile değiştirilerek farklı uygulama yolları da dahil olmak üzere *in vivo* olarak test edilmiştir. Neticede *H5* insersiyonunun virülensi azaltabildiği, ancak virüsün virülentliğini önemli miktarda koruduğu gözlemlenmiştir (152). Bu çalışmalar ışığında CRISPR/Cas9 hedef bölgesi olarak BHV-1 için *tk* geni reporter gen için makul bir bölge olarak göz önünde bulundurulmuştur. GaHV-1 için ise önceden tanımlanan *tk* defektif suş temel alınarak aynı yöntem ile *U_L50* gen delesyonu gerçekleştirilmiş, böylece iki geni defektif virüs üretilmiştir. Çalışmada *TK/U_L50* çift delesyonlu virüsün yerleştirilen füzyon genini stabil olarak ekspresyonunu sentezleyebildiği ortaya konulmuştur. Ayrıca zamana bağlı çoğalma analizi vt-ILTV, Δ TK-ILTV ve Δ TK/*U_L50* nakavt virüsün çoğalma kinetiği arasında fark olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar elde edilen varyantların *in vitro* karakteristikleri bakımından daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile örtüşmektedir.

BHV-1 üzerinde yapılan çalışmalar virüs adsorbsiyonunun hücredeki kaveolin reseptörü ve viral gB ve gC proteinleri aracılı olarak gerçekleştiğini, dolayısıyla geniş spektrumlu bir hücre affinitesinin olduğunu göstermektedir. BHV-1 sığır böbrek, akciğer, testis, türbinat ve trakeal primer hücre hatları, tavuk embriyo fibroblast (CEF) primer hücreleri; MDBK, BHK-21 gibi devamlı hücre hatlarında çoğalabilmektedir (74, 153, 154). VERO E6 hücre hattı köken aldığı hücrelerden farklı olarak 12. kromozom üzerinde 9 mb gen delesyonu ve delesyon yakınında 59 mb heterozigotluk kaybına bağlı olarak tip I interferonları üretememektedir. Dolayısıyla herpesvirüsler de dahil birçok virüsün üretilmesi için

uygundur (155). Çalışmada BHV-1 VERO hücre hattına kolaylıkla adapte edilmiş, ancak kullanılan katyonik lipid temelli yöntem ile yeterli transfeksiyon etkinliğine ulaşılamamıştır. Dolayısıyla BHV-1 düzenlenmesinde farklı hücre hatları, lentiviral temelli Cas9 plazmidleri veya elektroporasyon metodu ya da VERO için üretilmiş ticari ürünlerin (örn; VERO Transfection Kit, Altogen Biosystems, ABD) alternatif olarak göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Newcastle hastalığı virüsü negatif tek iplikli, segmentsiz bir RNA virüsü olup en az 6 yapısal proteini kodlamaktadır. Füzyon (F) geni, üzerinde viral virülensi belirleyen cleavage motiflerini bulundurmakta olup virüs patojenitesinin belirlenmesinde ve sahaya yönelik epidemiyolojik verinin sağlanmasında sıklıkla göz önünde bulundurulmaktadır. Doksanlardan itibaren bu hastalığa karşı farklı yöntemler kullanılarak oluşturulmuş DNA virüs tabanlı birçok vektör aşı platformu denenmiştir. Kanatlı poxvirüsü (FPV) kullanılan ilk rekombinant aşı platformu olup füzyon ve hemagglutinin genlerini taşıyan bivalan aşı suşları kanatlı deney gruplarında denenmiştir. Çalışmada bir günlük piliçlere hem kas içi hem de intranasal uygulamada hemagglutinine (HA) ve poxviral antijenlere karşı 8 haftaya kadar koruyucu immünitinin oluştuğu, ancak maternal antikor varlığında NDV spesifik immün yanıtın düşük olduğu bildirilmiştir (156, 157). Öte yandan Faulkner ve ark. (2013) maternal influenza A HA antikorlarının NDV-HA eksprese eden rekombinant FPV'ye karşı interferens oluşturarak etkinliğini düşürdüğünü, Bublot ve ark. (2006) ise pasif immüniteden ziyade, önceden FPV'ye karşı aşılamanın aktif bağışıklık oluşturarak recFPV vektör aşılarda uygulamasında sorun arz ettiğini kanatlı influenza örneği ile ortaya koymuştur (158, 159). Yine de günümüzde iki adet ticari

poxvirüs tabanlı rekombinant bivalan aşı bazı ülkelerde lisanslı olarak kanatlı işletmelerinde kullanılmaktadır (160, 161).

Hindi herpesvirüsü (HVT), ya da Marek hastalığı virüsü serotip 3, yine sık kullanılan vektörlerden biri olup füzyon geni eksprese eden rekombinant HVT (recHVT-F) aşı adayı bir günlük piliçlere uygulanmış, 28. günde letal doz velojenik NDV uygulamada %90 koruma sağlanmıştır. HVT oldukça avantajlı bir aşı vektörü olup *in ovo* ya da deri altı uygulanabilmekte ve uzun süreli immünite sağlayabilmektedir. Ancak recHVT-F hücre ilişkili bir suş olup transportu sıvı nitrojen ile sağlanmaktadır. recHVT-F'in tam kapasite immüniteye ulaşabilmesi dört haftayı bulmakta olup bu dönemde işletmeye NDV'nin bulaşmaması gerekmektedir (162). Bu durum Türkiye gibi NDV'nin endemik olduğu ülkelerde (163) neredeyse imkansızdır. Bu nedenle recHVT-F *in ovo* olarak uygulanmakta, çıkımın ardından canlı-attenüe ya da ölü aşı ile ikinci bir destek doz uygulaması tercih edilmektedir (164). Yakın zamanda, NDV F geni rekombine edilmiş ördek enterit virüsü (recDEV-F) deneysel olarak 2 haftalık yaştaki SPF kanatlılara uygulanmış, aşılardan 2 hafta sonra 1000 LD₅₀ NDV titre değerine kadar %100 koruyuculuğunun sağlanabildiği bildirilmiştir (165). Buradan hareketle DEV'in de umut vadeden bir aşı platformu olabileceği düşünülebilir. Yürütülen bu tez çalışmasında yeni bir metodoloji kullanılarak, NDV'ye ait F genini sentezleyebilen bir ILTV suşunun etkin ve hızlı bir biçimde üretimi sağlanmıştır. F geni ekspresyon kasedi stabil olup virüsün replikasyonuna zarar vermemiştir; bu durum en az 5 pasaj sürdürülen bir inokulasyon çalışması ile kanıtlanmıştır. Ancak bu “aşı adayı” suşa eklenen virüsün *in vivo* etkinliğinin ortaya konulacağı bir çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca bu iki geni silinmiş rekombinant ILTV ile başarılı bir şekilde immünize

edilen canlılar ile saha suşu ile enfekte canlıları birbirinden ayıracak markır aş (DIVA) olma özelliğini gösterecektir. Bu noktada tk spesifik serum antikorlarının teşhisini kolaylaştırmak üzere, karşılaştırmalı teşhis yöntemi geliştirmek için ILTV-TK ekspresyon plazmidinin inşası, ve akabinde TK spesifik monoklonal antikorunun üretilmesi son derece önem arz etmektedir.



7. SONUÇ

Geleneksel aşı üretim tekniklerine bir alternatif olarak, viral vektör temelli aşılar kayda değer bir şekilde ilerleme kaydetmiş, hayvancılık endüstrisinde birçok aşı ticari olarak üretilerek kullanım alanı bulmuştur. Ülkemiz gibi birden fazla patojenin sirküle olduğu, ağır mali kayıplara yol açtığı endemik ülkelerde üreticiler için yüksek etkinlikteki aşılardan hızlı bir şekilde üretilmesinin sağlanması son derece önem arz etmektedir. CRISPR/Cas9 gen düzenleme aracı ve Cre-Lox platformu yeni multivalan vektör aşılardan üretilimi bakımından oldukça etkili teknikler olup pazarın ihtiyacına karşılık verecek yeni nesil aşılardan üretilmesine olanak sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında kullanılan eşzamanlı gen delesyon ve insersiyon metodu, aşı platformu olarak belirlenen *Gallid alphaherpesvirus 1*'e başarıyla uygulanarak istenilen heterolog genin insersiyonu sağlanmış, *in vitro* deneyler ile de doğrulanmıştır. Üretilen bu aşı adayının yakın gelecekte ticari aşı niteliğini kazanabileceği düşünülmekte, bu amaçla gelecekte *in vivo* hayvan denemelerinin uygulanması öngörülmektedir. Böylece ülkemiz hayvancılığının geliştirilmesine bilimsel niteliği olan bir katkının sunulması planlanmaktadır.

Çalışmada NHEJ-CRISPR/Cas9 konseptinin *Bovine alphaherpesvirus 1* genomunda indel oluşturmada kullanılabilir nitelikte olduğu ispatlanamamıştır. Bu güne değin sürdürülen çalışmalar bu virüsün aşı antijenleri ya da terapötik proteinlerinin hücre içine taşınmasında kullanılabilecek nitelikte bir vektör olabileceğini göstermiştir. Bu tez çalışması ile sığırlara yönelik verimli ve güvenilir bir viral vektör platformunun oluşturulabilmesi adına daha fazla çalışmanın gerçekleştirilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle farklı taşıyıcı vektör,

gRNA tasarımı ve uygun hücre hatlarının yer alacağı çalışmaların yürütülmesi öngörülmektedir.



8. KAYNAKLAR

1. Finco O, Rappuoli R. Designing Vaccines for the Twenty-First Century Society. *Front Immunol* 2014; 5: 1-6.
2. Davies DH, Schmidt CS, Sheikh NA. Concept and Scope of Modern Vaccines. In: Sheikh NA, Davies DH, Schmidt CS, et al. (Editors). *Vaccinology: Principles and Practice* 1st Edition. Oxford: Wiley-Blackwell 2012: 1-11.
3. Willis NJ. Edward Jenner and the eradication of smallpox. *Scott Med J* 1997; 42: 118-121.
4. Plotkin SA. Vaccines: The fourth century. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 1709-1719.
5. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J Med Biol Res* 2012; 45: 1102-1111.
6. Buckland BC. The process development challenge for a new vaccine. *Nat Med* 2005; 11: S16-S19.
7. Eisenstein M. Vaccines: a moving target. *Nature* 2011 8; 474 (7350): 16-17.
8. Glick BR, Patten CL. Chapter 3: Recombinant DNA Technology. In: Glick BR, Patten CL (Editors) *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. ASM Press, pp. 47-97.
9. Giese M. Types of Recombinant Vaccines. In: Giese M. (Editor). *Introduction to Molecular Vaccinology*. Cham: Springer International Publishing 2016: 199-232.
10. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298: 347-350.
11. Plotkin SA. Vaccines: Past, present and future. *Nat Med* 2005; 11: S5.
12. Fikrig E, Barthold S, Kantor F, et al. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 1990; 250(4980): 553-556.
13. Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, et al. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 1990; 64: 1079-1085.
14. Spaete RR. A recombinant subunit vaccine approach to HCMV vaccine development. *Transplant Proc* 1991; 23: 90-6.
15. Vartak A, Sucheck SJ. Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines* 2016; 4: 1-18.
16. Saffari M, Moghimi HR, Dass CR. Barriers to liposomal gene delivery: From application site to the target. *Iran J Pharm Res* 2016; 15: 3-17.

17. Davis BS, Chang G-JJ, Cropp B, et al. West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J Virol* 2001; 75: 4040-4047.
18. Giese M, Bahr U, Jakob NJ, et al. Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus. *Virus Genes* 2002; 25: 159-167.
19. Dowd KA, Ko SY, Morabito KM, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science* 2016; 354(6309): 237-240.
20. Hasson SSAA, Al-Busaidi JKZ, Sallam TA. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5: 344-353.
21. Goldblatt D. Conjugate vaccines. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 1-3.
22. Ward J, Berkowitz C, Pescetti J, et al. Enhanced Immunogenicity in Young Infants of a New Haemophilus Influenzae Type B (Hib) Capsular Polysaccharide (Prp)-Diphtheria Toxoid (D) Conjugate Vaccine. *Pediatr Res* 1984; 18: 287A-287A.
23. Linton D, Allan E, Karlyshev AV, et al. Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in Campylobacter jejuni. *Mol Microbiol* 2002; 43: 497-508.
24. Wacker M. N-Linked Glycosylation in Campylobacter jejuni and Its Functional Transfer into E. coli. *Science* 2002; 298: 1790-1793.
25. Pore D, Mahata N, Pal A, Chakrabarti MK. Outer membrane protein a (OmpA) of Shigella flexneri 2a, induces protective immune response in a mouse model. *PLoS One* 2011; 6(7): e22663.
26. Martinez-Becerra FJ, Chen X, Dickenson NE, et al. Characterization of a novel fusion protein from IpaB and IpaD of Shigella spp. and its potential as a Pan-Shigella vaccine. *Infect Immun* 2013; 81: 4470-4477.
27. Kamel M, El-Sayed A. Utilization of herpesviridae as recombinant viral vectors in vaccine development against animal pathogens. *Virus Res* 2019; 270: 197648.
28. Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in viral vector-based vaccines. *Vaccines* 2014; 2: 624-641.
29. Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 62-73.
30. Antoine G, Scheifflinger F, Dorner F, et al. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 1998; 244: 365-396.

31. Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 10847-10851.
32. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 1972; 69: 2904-2909.
33. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. 1982. *Biotechnology* 1992; 24: 503-507.
34. Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983; 302: 490-495.
35. Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe MD, Howley MP (editor) *Field's Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Business 2013: 1802-1822.
36. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009; 154: 171-177.
37. Bailer SM, Funk C, Riedl A, et al. Herpesviral vectors and their application in oncolytic therapy, vaccination, and gene transfer. *Virus Genes* 2017; 53: 741-748.
38. Yu L, Bai W, Wu X, et al. A recombinant pseudotyped lentivirus expressing the envelope glycoprotein of Hantaan virus induced protective immunity in mice. *Virol J* 2013; 10: 1.
39. Marín-López A, Ortego J. Generation of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Encoding VP2, NS1, and VP7 Proteins of Bluetongue Virus. In: Brun A. (Editor). *Vaccine Technologies for Veterinary Viral Diseases*. London: Humana Press 2016: 137-150.
40. Qin J, Huang H, Ruan Y, et al. A novel recombinant peste des petits ruminants-canine adenovirus vaccine elicits long-lasting neutralizing antibody response against ppr in goats. *PLoS One* 2012; 7: 1-8.
41. Zhu F, Chen T, Zhang Y, et al. A novel adeno-associated virus-based genetic vaccine encoding the hepatitis c virus NS3/4 protein exhibits immunogenic properties in mice superior to those of an NS3-protein-based vaccine. *PLoS One* 2015; 10: 1-15.
42. Williams LBA, Fry LM, Herndon DR, et al. A recombinant bovine herpesvirus-4 vectored vaccine delivered via intranasal nebulization elicits viral neutralizing antibody titers in cattle. *PLoS One* 2019; 14: 1-16.
43. Smiley JR. Construction in vitro and rescue of a thymidine kinase-deficient deletion mutation of herpes simplex virus. *Nature* 1980; 285: 333-335.

44. Spaete RR, Mocarski ES. Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7213-7217.
45. Tischer BK, Kaufer BB. Viral bacterial artificial chromosomes: Generation, mutagenesis, and removal of mini-F sequences. *J Biomed Biotechnol*; 2012; 472537.
46. Shizuya H, Birren B, Kim U-J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 8794-8797.
47. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, et al. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 14759-14763.
48. Zhou F, Gao SJ. Recent advances in cloning herpesviral genomes as infectious bacterial artificial chromosomes. *Cell Cycle* 2011; 10: 434-440.
49. Brune W, Ménard C, Hobom U, et al. Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 360-364.
50. Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, et al. Reconstitution of Marek' s Disease Virus Serotype 1 (MDV-1) from DNA Cloned as a Bacterial Artificial Chromosome and Characterization of a Glycoprotein B-Negative MDV-1 Mutant. 2000; 74: 11088-11098.
51. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 1981; 150: 467-486.
52. Ray MK, Fagan SP, Brunnicardi FC. The Cre-loxP system: A versatile tool for targeting genes in a cell- and stage-specific manner. *Cell Transplant* 2000; 9: 805-815.
53. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J Mol Biol* 1981; 150: 467-486.
54. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157: 1262-1278.
55. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu Rev Genet* 2011; 45: 273-297.
56. Loureiro A, Da Silva GJ. Crispr-cas: Converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. *Antibiotics*; 8(1): 18.
57. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 2012; 337: 816-821.

58. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 2013; 339: 819-823.
59. Sakuma T, Yamamoto T. CRISPR/Cas9: The Leading Edge of Genome Editing Technology. In: Yamamoto T (Editor). *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases*. Tokyo: Springer Japan 2015: 25-41.
60. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014; 156: 935-949.
61. Weterings E, Van Gent DC. The mechanism of non-homologous end-joining: A synopsis of synopsis. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1425-1435.
62. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA End joining. *J Biol Chem* 2008; 283: 1-5.
63. Jasin M, Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: 1-18.
64. Löbs AK, Schwartz C, Wheeldon I. Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synth Syst Biotechnol* 2017; 2: 198-207.
65. Ochiai H, Yamamoto T. Genome Editing Using Zinc-Finger Nucleases (ZFNs) and Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs). In: Yamamoto T. (Editor). *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases*. Tokyo: Springer 2015: 3-24.
66. Rees HA, Yeh WH, Liu DR. Development of hRad51–Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks. *Nat Commun* 2019; 10(1): 2212.
67. Osterrieder K. Herpesvirales. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ. (Editors). *Fenner's Veterinary Virology 6th Edition*. London: Academic Press 2016: 189-216.
68. Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, et al. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Vet Q* 2013; 33(2): 68-81.
69. Schwyzer M, Ackermann M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 1996; 53: 17-29.
70. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Heal Res Rev* 2007; 8: 187-205.
71. Yokoyama N, Maeda K, Mikami T. Recombinant Viral Vector Vaccines for the Veterinary Use. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 311-322.

72. Zygraich N, Lobmann M, Vascoboinic E, et al. In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res Vet Sci* 1974; 16: 328-335.
73. Endsley JJ, Quade MJ, Terhaar B, Roth JA. BHV-1-specific CD4+, CD8+, and $\gamma\delta$ T cells in calves vaccinated with one dose of a modified live BHV-1 vaccine. *Viral Immunol* 2002; 15: 385-393.
74. Nandi S, Kumar M, Manohar M, et al. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev* 2009; 10: 85-98.
75. Turin L, Russo S, Poli G. BHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread infection. *Mol Med* 1999; 5: 261-284.
76. Whetstone C, Miller J, Bortner D, et al. Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine* 1989; 7: 527-532.
77. Ruiz-Sáenz J, Jaime J, Vera V. An inactivated vaccine from a field strain of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) has high antigenic mass and induces strong efficacy in a rabbit model. *Virology* 2013; 28: 36-42.
78. Babiuk LA, L'Italien J, van Drunen Littel-van den Hurk S, et al. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology* 1987; 159: 57-66.
79. van Drunen Littel-van den Hurk S, Van Donkersgoed J, Kowalski J, et al. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine* 1994; 12: 1295-1302.
80. Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, Ruuls RC, et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine* 1998; 16: 802-809.
81. Xie Y, Wu L, Wang M, et al. Alpha-herpesvirus thymidine kinase genes mediate viral virulence and are potential therapeutic targets. *Front Microbiol* 2019; 8(10):941.
82. Kit S, Qavi H, Gaines JD, et al. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch Virol* 1985; 86: 63-83.
83. Kit S, Kit M, Otsuka H. "Infectious bovine rhinotracheitis virus mutants, vaccines containing same, methods for the production of same and methods for the use of same". <https://patents.google.com/patent/US5601816/> 09.11.2020.

84. Flores EF, Osorio FA, Zanella EL, et al. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. *J Vet Diagnostic Investig* 1993; 5: 534-540.
85. van Engelenburg FAC, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM, et al. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J Gen Virol* 1994; 75: 2311-2318.
86. Zhang M, Fu S, Deng M, et al. Attenuation of bovine herpesvirus type 1 by deletion of its glycoprotein G and tk genes and protection against virulent viral challenge. *Vaccine* 2011; 29: 8943-8950.
87. Caldow G, Geraghty T, Mason C, et al. Bovine herpesvirus 1 infection in cattle: a discussion on vaccination and control. *Livestock* 2018; 23: 110-115.
88. Cox GJ, Zamb TJ, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* 1993; 67: 5664-7.
89. Taylor G, Rijsewijk FAM, Thomas LH, et al. Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV. *J Gen Virol* 1998; 79: 1759-1767.
90. Schmitt J, Becher P, Thiel HJ, et al. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. *J Gen Virol* 1999; 80: 2839-2848.
91. Kit S, Otsuka H, Kit M. Expression of porcine pseudorabies virus genes by a bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus) vector. *Arch Virol* 1992; 124: 1-20.
92. Fuchs W, Veits J, Helferich D, et al. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet Res* 2007; 38: 261-279.
93. Samberg Y, Aronovici I. Development of a Vaccine against Avian Infectious Laryngotracheitis. I. Modification of a Laryngotracheitis Virus. *Refuah Vet* 1969; 26: 54-59.
94. Gelenczei EF, Marty EW. Studies on a Tissue-Culture-Modified Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis* 1964; 8: 105.
95. Brandly CA. Some Studies of Infectious Laryngotracheitis: The Continued Propagation of the Virus upon the Chorioallantoic Membrane of the Hen's Egg. *J Infect Dis* 1935; 57: 201-206.
96. Hudson CB. "Multifunctional Laryngotracheitis Vaccine and Method of Making the Same". <https://patents.google.com/patent/US3444293/> 09.10.2020.

97. Benton WJ, Cover MS, Greene LM. The Clinical and Serological Response of Chickens to Certain Laryngotracheitis Viruses. *Avian Dis* 1958; 2: 383.
98. García M. Current and future vaccines and vaccination strategies against infectious laryngotracheitis (ILT) respiratory disease of poultry. *Vet Microbiol* 2017; 206: 157-162.
99. Samberg Y, Cuperstein E, Bendheim U, et al. The Development of a Vaccine against Avian Infectious Laryngotracheitis IV. Immunization of Chickens with a Modified Laryngotracheitis Vaccine in the Drinking Water. *Avian Dis* 1971; 15: 413.
100. Guy JS, Barnes HJ, Smith L. Increased Virulence of Modified-Live Infectious Laryngotracheitis Vaccine Virus Following Bird-to-Bird Passage. *Avian Dis* 1991; 35: 348.
101. Rodríguez-Avila A, Oldoni I, Riblet S, et al. Replication and Transmission of Live Attenuated Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Vaccines. *Avian Dis* 2007; 51: 905-911.
102. Lee SW, Markham PF, Coppo MJC, et al. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science* 2012; 337: 188.
103. Menendez KR, García M, Spatz S, et al. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. *Avian Pathol* 2014; 43: 108-117.
104. Tong GZ, Zhang SJ, Meng SS, et al. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowl pox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol* 2001; 30: 143-148.
105. Vagnozzi A, Zavala G, Riblet SM, et al. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol* 2012; 41: 21-31.
106. Devlin JM, Browning GF, Hartley CA, et al. Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 3561-3566.
107. Garcia M, Spatz SJ, Cheng Y, et al. Attenuation and protection efficacy of ORF C gene-deleted recombinant of infectious laryngotracheitis virus. *J Gen Virol* 2016; 97: 2352-2362.
108. Pavlova SP, Veits J, Keil GM, et al. Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. *Vaccine* 2009; 27: 773-785.
109. Shao Y, Sun J, Han Z, et al. Recombinant infectious laryngotracheitis virus expressing Newcastle disease virus F protein protects chickens against infectious laryngotracheitis virus and Newcastle disease virus challenge. *Vaccine* 2018; 36: 7975-7986.

110. Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 2014; 24: 122-125.
111. Bi Y, Sun L, Gao D, et al. High-Efficiency Targeted Editing of Large Viral Genomes by RNA-Guided Nucleases. *PLoS Pathog* 2014; 10(5): e1004090.
112. Bierle CJ, Anderholm KM, Wang J Ben, et al. Targeted Mutagenesis of Guinea Pig Cytomegalovirus Using CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *J Virol* 2016; 90: 6989-6998.
113. Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, et al. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol Immunol* 2014; 58: 513-522.
114. Xu A, Qin C, Lang Y, et al. A simple and rapid approach to manipulate pseudorabies virus genome by CRISPR/Cas9 system. *Biotechnol Lett* 2015; 37: 1265-1272.
115. Yuan M, Zhang W, Wang J, et al. Efficiently Editing the Vaccinia Virus Genome by Using the CRISPR-Cas9 System. *J Virol* 2015; 89: 5176-5179.
116. Peng Z, Ouyang T, Pang D, et al. Pseudorabies virus can escape from CRISPR-Cas9-mediated inhibition. *Virus Res* 2016; 223: 197-205.
117. Tang YD, Liu JT, Wang TY, et al. Live attenuated pseudorabies virus developed using the CRISPR/Cas9 system. *Virus Res* 2016; 225: 33-39.
118. Zou Z, Huang K, Wei Y, et al. Construction of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated duck enteritis virus-based vaccine against H5N1 avian influenza virus and duck Tembusu virus infection. *Sci Rep* 2017; 7: 1478.
119. Tang N, Zhang Y, Pedrera M, et al. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system. *Vaccine* 2018; 36: 716-722.
120. Liang X, Sun L, Yu T, et al. A CRISPR/Cas9 and Cre/Lox system-based express vaccine development strategy against re-emerging Pseudorabies virus. *Sci Rep* 2016; 6: 1-10.
121. Baer A, Kehn-Hall K. Viral Concentration Determination through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *J Vis Exp* 2014; 1-10.
122. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647-1649.
123. Van Duyne GD. A Structural View of Cre-loxP Site-Specific Recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 30: 87-104.

124. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 227-229.
125. He X, Tan C, Wang F, et al. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(9):e85.
126. Russell PH, Griffiths PC, Goswami KKA, et al. The Characterization of Monoclonal Antibodies to Newcastle Disease Virus. *J Gen Virol* 1983; 64: 2069-2072.
127. Zhao Y, Kong C, Cui X, et al. Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus by Real-Time PCR in Naturally and Experimentally Infected Chickens. *PLoS One* 2013; 8: e67598.
128. Fuchs W, Ziemann K, Teifke JP, et al. The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase, which is not a virulence factor. *J Gen Virol* 2000; 81: 627-638.
129. Han MG, Kweon CH, Mo IP, et al. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. *Arch Virol* 2002; 147: 1017-1031.
130. Li HL, Hotta A. Editing Cultured Human Cells: From Cell Lines to iPS Cells. In: Yamamoto T. (Editor). *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases*. Tokyo: Springer 2015: 45-69.
131. Bommareddy PK, Peters C, Kaufman HL. Chapter Twelve - Generation and validation of recombinant herpes simplex type 1 viruses (HSV-1) using CRISPR/Cas9 genetic disruption. In: Galluzzi L, Rudqvist NP (Editors). *Tumor Immunology and Immunotherapy – Integrated Methods Part A. Methods in Enzymology Vol. 635*. Academic Press 2020: 167-184.
132. Tang YD, Liu JT, Fang QQ, et al. Recombinant pseudorabies virus (PRV) expressing firefly luciferase effectively screened for crispr/cas9 single guide rnas and antiviral compounds. *Viruses* 2016; 8: 1-11.
133. Yuen K-S, Chan C-P, Wong N-HM, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein–Barr virus in human cells. *J Gen Virol* 2015; 96: 626-636.
134. Yuan M, Gao X, Chard LS, et al. A marker-free system for highly efficient construction of vaccinia virus vectors using CRISPR Cas9. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2015; 2: 15035.
135. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 2014; 5: 1-3.

136. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 7-18.
137. Yang F, Liu C, Chen D, et al. CRISPR/Cas9-loxP-Mediated Gene Editing as a Novel Site-Specific Genetic Manipulation Tool. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017; 7: 378-386.
138. Atasoy MO, Rohaim MA, Munir M. Simultaneous Deletion of Virulence Factors and Insertion of Antigens into the Infectious Laryngotracheitis Virus Using NHEJ-CRISPR/Cas9 and Cre-Lox System for Construction of a Stable Vaccine Vector. *Vaccines* 2019; 7: 207.
139. Tang YD, Guo JC, Wang TY, et al. CRISPR/Cas9-mediated 2-sgRNA cleavage facilitates pseudorabies virus editing. *FASEB J* 2018; 32: 4293-4301.
140. Chen S-H, Cook WJ, Grove KL, et al. Human Thymidine Kinase Can Functionally Replace Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase for Viral Replication in Mouse Sensory Ganglia and Reactivation from Latency upon Explant. *J Virol* 1998; 72: 6710-6715.
141. Huang C-Y, Yao H-W, Wang L-C, et al. Thymidine Kinase-Negative Herpes Simplex Virus 1 Can Efficiently Establish Persistent Infection in Neural Tissues of Nude Mice. *J Virol* 2017; 91: 1-10.
142. Knight GB, Gudas JM, Pardee AB. Cell-cycle-specific interaction of nuclear DNA-binding proteins with a CCAAT sequence from the human thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 8350-8354.
143. Gasparri F, Wang N, Skog S, et al. Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan™ assays. *Eur J Cell Biol* 2009; 88: 779-785.
144. Tarakanova VL, Leung-Pineda V, Hwang S, et al. Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 275-86.
145. Ferrari M, Mettenleiter TC, Romanelli MG, et al. A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *J Comp Pathol* 2000; 123: 152-163.
146. Stroop WG, Careene Banks M, Qavi H, et al. A thymidine kinase deficient HSV-2 strain causes acute keratitis and establishes trigeminal ganglionic latency, but poorly reactivates in vivo. *J Med Virol* 1994; 43: 297-309.
147. Chowdhury SI. Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. *Vet Microbiol* 1996; 52: 13-23.

148. Mocarski ESJ. Comparative analysis of herpesvirus–common proteins. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al. (Editors). *Human Herpesviruses*. Cambridge: Cambridge University Press 2007: 44-58.
149. Vértessy BG, Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res* 2009; 42: 97-106.
150. Ariza ME, Glaser R, Williams MV. Human herpesviruses-1 encoded dUTPases: A family of proteins that modulate dendritic cell function and innate immunity. *Front Microbiol* 2014; 26; 5: 504.
151. Jöns A, Mettenleiter TC. Identification and characterization of pseudorabies virus dUTPase. *J Virol* 1996; 70: 1242-1245.
152. Lüscho D, Werner O, Mettenleiter TC, et al. Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine* 2001; 19: 4249-4259.
153. Samrath D, Shakya S, Rawat N, et al. Isolation and adaptation of bovine herpes virus Type 1 in embryonated chicken eggs and in Madin-Darby bovine kidney cell line. *Vet World* 2016; 9: 222-225.
154. Michalski FJ, Hsiung GD. Persistent infection with bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus) in cultured hamster cells. *In Vitro* 1976; 12: 682-686.
155. Naoki O, Arihiro K, Toshiyuki Y, et al. The genome landscape of the African Green Monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res* 2014; 21: 673-683.
156. Taylor J, Christensen L, Gettig R, et al. Efficacy of a Recombinant Fowl Pox-Based Newcastle Disease Virus Vaccine Candidate against Velogenic and Respiratory Challenge. *Avian Dis* 1996; 40: 173.
157. King DJ. A Comparison of the Onset of Protection Induced by Newcastle Disease Virus Strain B1 and a Fowl Poxvirus Recombinant Newcastle Disease Vaccine to a Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus Challenge. *Avian Dis* 1999; 43: 745.
158. Faulkner OB, Estevez C, Yu Q, et al. Passive antibody transfer in chickens to model maternal antibody after avian influenza vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 152: 341-347.
159. Bublot M, Pritchard N, Swayne DE, et al. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1081: 193-201.
160. Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: An update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11349-11353.

161. Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, et al. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Vet Microbiol* 2017; 206: 126-136.
162. Palya V, Tatár-Kis T, Mató T, et al. Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 158: 105-115.
163. Bayraktar E, Umar S, Yilmaz A, et al. Current scenario of viral diseases in Turkish poultry industry. *Worlds Poult Sci J* 2019; 75: 515-534.
164. Palya V, Kiss I, Tatár-Kis T, et al. Advancement in Vaccination Against Newcastle Disease: Recombinant HVT NDV Provides High Clinical Protection and Reduces Challenge Virus Shedding with the Absence of Vaccine Reactions. *Avian Dis* 2012; 56: 282-287.
165. Ding L, Chen P, Bao X, et al. Recombinant duck enteritis viruses expressing the Newcastle disease virus (NDV) F gene protects chickens from lethal NDV challenge. *Vet Microbiol* 2019; 232: 146-150.

9. ÖZGEÇMİŞ

Mustafa Ozan ATASOY 30.08.1988 tarihinde Manisa'nın Akhisar ilçesinde doğdu. İlk ve Ortaokulu Aydın'ın Kuşadası ilçesindeki Mahmut Esat Bozkurt İlköğretim Okulunda (1994-2002), Lise öğrenimini aynı ilçedeki Derici Mustafa Gürbüz Anadolu Lisesinde (2002-2006) tamamladı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi lisans eğitimine 2008 yılında başladı ve “Veteriner Hekimi” ünvanı ile 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı bünyesinde 2014 yılından bu yana Doktora Araştırma Görevlisi ünvanıyla çalışmalarını sürdürmektedir.