

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

SIĞIR VEBASI VİRÜSÜ NÜKLEOPROTEİN  
GENİNİN KLONLANMASI VE ÖKARYOTİK  
HÜCRELERDE AÇIKLANMASI

118809

DOKTORA TEZİ


118809

Şükrü TONBAK

ELAZIĞ-2002

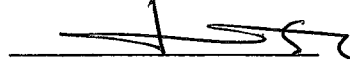
TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## ONAY SAYFASI

.....  
  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Prof. Dr. Filiz OCAK**

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....  


Prof. Dr. Mustafa BULUT



Yüksek Lisans Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Mustafa BULUT

Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZDENEK

Danışman

.....  
  


### Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

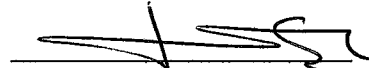
Prof. Dr. Mustafa BULUT

Prof. Dr. Adile MUR

Doç. Dr. Sibel YAVRU

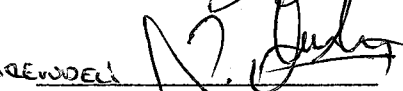
Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZDENEK

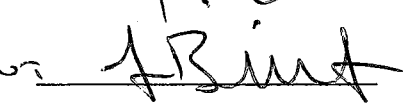
Yrd. Doç. Dr. Hakan BULUT

.....  


.....  


.....  


.....  


.....  


## **İTHAF**

Bu çalışma eğitimimde emeği geçenlere, bilime katkısı olanlara ve   
 lkemin gelişmesi için çalışanlara ithaf edilmiştir.

## TEŐEKKÜR

BaŐta hocalarım Prof. Dr. Yusuf BOLAT ve Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ olmak üzere, devamlı olarak bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Hakan BULUT'a, konuyu çalıŐırken yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşlarım ArŐ. Gör. Ahmet KürŐat AZKUR ile ArŐ. Gör. İrem GÜLAÇTI'ya ayrıca Uzm. Dr. Yasemin BULUT, Dr. Salih KUK ve ArŐ. Gör. Neslihan KELEŐTİMUR'a ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (FÜBAP) sağladığı destekten dolayı teŐekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|   | Sayfa |
|---|-------|
| <b>1. ÖZET</b>                            | 1     |
| <b>2. ABSTRACT</b>                        | 2     |
| <b>3. GİRİŞ</b>                           | 3     |
| 3.1. Sığır Vebası Virüsü (SVV)            | 4     |
| 3.1.1. Virüsün genel özellikleri          | 5     |
| 3.1.2. Sığır vebası virüsünün proteinleri | 9     |
| 3.1.2.1. Fosfoprotein (P)                 | 9     |
| 3.1.2.2. Matriks proteini (M)             | 11    |
| 3.1.2.3. Füzyon proteini (F)              | 12    |
| 3.1.2.4. Hemaglütinin proteini (H)        | 15    |
| 3.1.2.5. C proteini                       | 16    |
| 3.1.2.6. V proteini                       | 17    |
| 3.1.2.7. Large proteini (L)               | 18    |
| 3.1.2.8. Nükleoprotein (NP)               | 19    |
| <b>4. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                 | 26    |
| 4.1. Plazmidler                           | 26    |
| 4.1.1. pGEM-3Zf (-) plazmidi              | 26    |
| 4.1.2. pCI-neo plazmidi                   | 26    |
| 4.2. Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu  | 27    |
| 4.3. Hücre kültürü                        | 27    |
| 4.4. Primer seçimi                        | 27    |
| 4.5. Toplam RNA izolasyonu                | 28    |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.6. Tersine transkripsiyon (Reverse Transkripsiyon)                         | 29        |
| 4.7. Nükleoprotein gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması                       | 29        |
| 4.8. Nükleoprotein geninin agaroz jelden saflaştırılması                     | 30        |
| 4.9. DNA miktarının belirlenmesi   | 31        |
| 4.10. RBOK NP geninin kesim enzimleri ile kesimi                             | 31        |
| 4.11. Kompetan <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin hazırlanması             | 32        |
| 4.12. pGEM-3Zf (-) plazmidinin <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyonu     | 33        |
| 4.13. pGEM-3Zf (-) plazmid DNA'sının izolasyonu                              | 34        |
| 4.14. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin oluşturulması                       | 35        |
| 4.15. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin seçilmesi                           | 36        |
| 4.16. Polimeraz zincir reaksiyonu tarama deneyi (PZR-T)                      | 37        |
| 4.17. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmid DNA'sının izolasyonu                    | 37        |
| 4.18. Rekombinant pSV-NP plazmidinin oluşturulması                           | 38        |
| 4.19. Rekombinant pSV-NP vektörünün Vero hücrelerine transfeksiyonu          | 39        |
| 4.20. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması                              | 39        |
| 4.21. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) deneyi | 40        |
| 4.22. Vestern immunoblotting (Immunblotlama) deneyi                          | 41        |
| <b>5. BULGULAR</b>   | <b>43</b> |
| 5.1. Vero hücrelerinin sığır vebası virüsü ile infeksiyonu                   | 43        |
| 5.2. Tersine transkripsiyon ve PZR   | 45        |

|  |    |
|--|----|
| 5.3. SV-RBOK-NP geninin pGEM-3Zf (-) plazmidinde<br>klonlanması          | 47 |
| 5.4. SV-RBOK-NP geninin pCI-neo vektöründe klonlanması<br>ve açıklanması | 52 |
| <b>6. TARTIŞMA</b>   | 56 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>  | 62 |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>   | 70 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|  | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 1. SV-RBOK aşı suşu ile infekte olmayan kontrol Vero hücrelerinin görünümü.  | 43    |
| Şekil 2. SV-RBOK aşı suşu ile infekte Vero hücrelerinin görünümü.  | 44    |
| Şekil 3. % 1.5'lik agaroz jelde sığır vebası virüsü nükleoproteininin görünümü.  | 45    |
| Şekil 4. Sığır vebası virüsü ile Vero hücrelerinin enfeksiyonu, toplam RNA'ların elde edilmesi, tersine transkripsiyon ve PZR ile NP geninin çoğaltılması. | 46    |
| Şekil 5. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyonundan sonra mavi-beyaz kolonilerin görünümü.                           | 47    |
| Şekil 6. % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin PZR-T sonuçlarının görünümü.  | 48    |
| Şekil 7. % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin enzim kesim deneyleri ve PZR ile gösterilmesi.  | 49    |
| Şekil 8. Rekombinant plazmid pGEM-SV-NP'nin oluşturulması.   | 51    |
| Şekil 9. % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant pSV-NP plazmidinin PZR-T sonuçlarının görünümü.  | 52    |
| Şekil 10. % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant plazmid pSV-NP'nin enzim kesim deneyleri ve PZR ile gösterilmesi.   | 53    |
| Şekil 11. Vero-pSV-NP hücre proteinlerinin Vestern immunoblotlama  |       |

ile gösterilmesi.

54

**Şekil 12.** Rekombinant plazmid pSV-NP'nin oluşturulması, Vero hücrelerine transfeksiyonu ve Vestern immunoblotlama ile gösterilmesi. 55



## KISALTMALAR LİSTESİ

$\mu$ g: Mikrogram

$\mu$ l: Mikrolitre

$\mu$ m: Mikrometre

Akr/Bis: Akrlamid/Bisakrlamid

bç: Baz çifti

cDNA: Kopya deoksiribonükleik asit

CPE: Sitopatik etki

DEPC: Diethyl pyrocarbonate

dH<sub>2</sub>O: Distile su

DKID<sub>50</sub>: Doku kültürü infektif doz 50

DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium

DNA: Deoksiribonükleik asit

*E.coli*: *Escherichia coli*

ELISA: Enzime bağlı immunosorbent deneyi

F: Füzyon

FCS: Fötal buzağı serumu

H: Hemaglutinin

IPTG: Isopropylthio- $\beta$ -D-galaktoside

kb: Kilobaz

kDa: Kilodalton

L: Large

M: Matriks

ml: Mililitre

## 1. ÖZET

Bu çalışmada, sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu (SV-RBOK) nükleoprotein (NP) geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanması amaç edilmiştir. Bu amaçla SV-RBOK ile infekte Vero hücrelerinden elde edilen toplam RNA'lara NP genine spesifik primerlerle tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (TT-PZR) yapıldı. Tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonundan sonra 1575 baz çifti uzunluğunda ürün elde edildi. Sığır vebası RBOK aşısı suşu NP geni pGEM-3Zf (-) klonlama vektörüne klonlandı. Nükleoprotein geninin varlığı enzim kesim ve polimeraz zincir reaksiyonu tarama (PZR-T) deneyleri ile teyit edildi. Nükleoprotein genini elde etmek için rekombinant plazmid *NheI* ve *SalI* enzimleri ile kesildi. Daha sonra NP geni pCI-neo memeli açıklama vektörüne yerleştirildi. pCI-neo vektöründe NP geninin varlığını teyit etmek için PZR-T ve enzim kesim deneyleri yapıldı. Sonuçlanan rekombinant plazmid pSV-NP olarak isimlendirildi. pSV-NP geçici olarak Vero hücrelerine transfekte edildi. Vero hücrelerinin 60 kDa'luk NP proteinini açıklaması anti-NP antikoru kullanılarak Vestern immunblotlama deneyi ile gösterildi.

**Anahtar kelimeler:** Sığır vebası virüsü, nükleoprotein geni, klonlama, protein açıklanması.

## 2. ABSTRACT

In the present study, cloning and expression nucleoprotein (NP) gene of rinderpest virus (RPV) RBOK vaccine strain in eucaryotic cells are reported. For this purpose, total RNA extracted from RPV-RBOK infected Vero cells was subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the NP gene specific primers. After RT-PCR, a 1575 bp amplicon was yielded. The NP gene of RPV-RBOK vaccine strain was cloned into pGEM-3Zf (-) cloning vector. The presence of the NP gene was confirmed by PCR-screening and enzyme digestion assays. The recombinant plasmid was cut with *NheI* and *SalI* enzymes to obtain the NP gene. Then, the NP gene was placed into pCI-neo mammalian expression vector. To confirm the presence of the NP gene in pCI-neo vector, PCR-screening and enzyme digestion assays were performed. So, the resulting recombinant plasmid was named as pSV-NP. Afterwards, pSV-NP was transiently transfected into Vero cells. The presence of the NP proteins was showed by Western Immunoblotting assay demonstrating that Vero cells express a 60 kDa protein reacting with anti-NP antibody.

**Key words:** Rinderpest virus, nucleoprotein gene, cloning, protein expression.

### 3. GİRİŞ

Sığır vebası virüs (SVV) infeksiyonları yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden sığırların akut ve perakut seyirli bir viral hastalığıdır. Hastalık solunum ve sindirim sistemi mukozalarında nekroz ve erozyonlara neden olmaktadır (12, 27, 69, 94).

Sığır vebası; Avrupa, Amerika ve Avustralya kıtalarından tamamen elimine edilmesine rağmen Asya, Afrika ve Orta Doğu' da hastalık hala görülmektedir (69, 95). Hastalık % 95 mortalite ve % 100 morbidite ile seyretmesinden dolayı ekonomik yönden önemli bir hastalıktır (60). Bu hastalığın 2010 yılına kadar bütün dünyadan elimine edilmesi FAO (Foot and Mouth Organization) tarafından amaçlanmaktadır (6, 100). Türkiye'de bu hastalık 1996 yılından beri görülmemekte ve 1998 yılından bu yana hastalıkla savaş için aşılama yapılmamaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi moleküler virolojide ilgilenilen gen dizilimi ve bu genin açıkladığı protein üzerinde çalışma kolaylıkları sağlamıştır. Bu teknoloji genlerin yapılarını, fonksiyonlarını ve regülatör DNA dizilerini çalışma fırsatı vermektedir. Rekombinant DNA teknolojisi ile ilgilenilen gen, açıklama vektörüne yerleştirilmekte ve genin devamlı veya geçici olarak açıklatılması sağlanmaktadır. Geçici süreyle açıklanan gen üzerindeki transkripsiyon kontrol ve RNA işlenimi görevlerini yürüten regülatör elementlerin daha kısa zamanda belirlenmesi kolaylaşmıştır. Genin devamlı açıklatılması ile fazla miktarda protein üretilmesine imkan sağlanmıştır. Bu teknoloji kullanılarak ilgilenilen proteine raportör bir protein ilave edilerek proteinin hücre içerisindeki lokalizasyon bölgesinin belirlenmesi sağlanmıştır. Bu alanda yapılan ilerlemeler ile negatif

anlamli RNA virüslerinde tersine genetik (reverse genetic) sistemi geliştirilmiş ve virüslerin patojenik determinantlarının çalışılması kolaylaşmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ile tanısal kitlerin hazırlanması ve viral infeksiyonlara karşı immunizasyon çalışmalarında kullanılan subünit, protein, DNA aşıları ve genetik olarak işaretli aşıların üretimi kolaylaşmıştır (2, 7, 14, 41, 61, 65, 101, 102).

Sığır vebası virüsüne karşı koruyucu amaçlı olarak buzağı böbrek hücre kültürlerinde hazırlanan zayıflatılmış canlı aşılar (attenüe-canlı) kullanılmaktadır. Ancak bu aşıların ısıya dayanıksız (thermo-labil) olmasından dolayı saklanması ve taşınması zor olmaktadır (12, 48, 94). Günümüzde sığır vebası virüsünün zarında bulunan hemaglutinin ve füzyon glikoproteinlerine karşı aşılar hazırlanmıştır. Bu hazırlanan rekombinant aşılar koruyucu bir immun cevap oluşturmasına rağmen bir endemi halinde aşılı ve infekte hayvanların teşhisi yapılamamaktadır. Virüsün bir internal proteini olan nükleoprotein hücreyel immuniteyi oluşturmasının yanı sıra teşhis amaçlı kitlerin hazırlanmasında da kullanılmaktadır (1, 48, 49).

### **3.1. Sığır Vebası Virüsü (SVV)**

Sığır vebası virüs genomu; negatif anlamli RNA olmasından dolayı kendi başına infeksiyöz değildir (5). Sığır vebası virüsünün antijenik olarak sadece bir tek Kabete 'O' serotipi olmasına rağmen farklı suşları bulunmaktadır. Bu suşlar Saudi 1/81, Eqypt/84, Kuwait/82, Kenya Eland/96, Nakamura III, Lapinize suş ve RBOK aşı suşudur (6, 28, 58, 67, 69, 100). Sığır vebası virüsü ilk olarak 1910 yılında Kenya'da izole edilmiştir ve aşı 1950'lerde seri pasajlarla primer hücre kültüründe hazırlanmıştır (9). Virüsün tek serotipi ve farklı suşları bulunmasından dolayı serolojik olarak teşhisinde zorluklarla karşılaşılmaktadır. Bu suşlar

arasında en virüent olan suş Saudi 1/81 suşudur (68, 69, 70). Sığır vebası virüs suşlarının virülensindeki değişimleri belirleyen moleküler faktörler hala tam olarak bilinmemektedir (26).

Sığır vebası virüsü çevre şartlarına karşı oldukça hassastır. Virüsün stabil olduğu pH değeri 7.2-8 arasındır. Virüs labildir ve tropikal şartlarda karkaslarda birkaç saatte, 56°C'de birkaç dakikada inaktif olmaktadır. Gübrede virüs 48 saat infeksiyöz kalmasına rağmen 5°C'de et, dalak ve lenf nodüllerinde 2-3 gün kadar infeksiyöz kalabilmektedir. Virüs -20°C ve daha düşük ısılarda yıllarca infeksiyöz özelliğini korumaktadır (12, 94).

Sığır vebası virüsü koyun, keçi, civciv embriyo, domuz, hamster, köpek ve insan orjinli hücre kültürlerinde üremesine rağmen virüent suşlar makrofaj ve lenfositlerde yüksek titrelerde üremektedirler (12, 53, 58, 80, 94).

Sığır vebası virüsünün bulunduğu *Paramyxoviridae* ailesindeki virüsler infekte ettikleri hücrelerin protein sentezini etkili bir şekilde durdurmamaktadırlar (shut off) (28, 78). Ayrıca birçok morbillivirüsün aksine sığır vebası virüsünün infekte hayvanların beyinlerinde görülmediği bildirilmiştir (78).

### 3.1.1. Virüsün genel özellikleri

Sığır vebası virüsü *Paramyxoviridae* ailesinin morbillivirüs sınıfında bulunmaktadır. Bu sınıf içerisinde kızamık virüsü (measles), köpek gençlik hastalığı virüsü (distemper), küçük ruminant veba virüsü (peste-des-petits virus), phocid distemper virüs, porpoise morbillivirüs ve dolphin morbillivirüsleri bulunmaktadır (9, 43, 50). Bu sınıfta bulunan virüsler birbirleri ile antijenik yakınlık göstermesine rağmen genetik olarak farklı virüslerdir (26).

Morbillivirüsler arasında bulunan antijenik yakınlık serum nötralizasyon (SN), immunfloresan (IF) ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri ile belirlenmiştir (92, 97).

Sığır vebası virüsü segmentsiz, helikal nükleokapsid içeren negatif anlamlı ve tek iplikli 15-16 kb uzunluğunda RNA genomuna sahip zarlı bir virüstür (4, 8, 12, 31, 33, 55, 59). Sığır vebası virüsünün bulunduğu *Paramyxoviridae* ailesindeki virüslerin hücreye girmesi sialik asit içeren glikoprotein reseptörleri sayesinde gerçekleşmektedir. Morbillivirüs sınıfında bulunan kızamık virüsü için reseptör olarak CD46, moesin ve SLAM (CD150) olduğu bildirilirken sığır vebası virüsü için spesifik bir reseptör olmamasına rağmen, virüsün SLAM (CD150) reseptörünü kullandığı bildirilmiştir (41, 68, 95). Virüs genomu sekiz adet protein kodlamaktadır. Bu proteinlerden nükleoprotein (NP), fosfoprotein (P), matriks (M), füzyon (F), hemaglutinin (H) ve large (L) proteinleri yapısal, V ile C proteinleri ise yapısal olmayan proteinlerdir (33, 40, 86).

Sığır vebası virüsünün altı tane monosistronik mRNA'sı (N, P, M, F, H, L) bulunmaktadır. Bu mRNA'ların transkripsiyon haritalama yöntemi ile 3' ucundan 5' ucuna doğru N-P-M-F-H-L sırasında yerleştiği bildirilmiştir (4, 37). Sığır vebası virüs mRNA'ların büyüklüğü nükleoprotein 1.8 kb, fosfoprotein 1.8 kb, matriks 1.5 kb, füzyon 2.4 kb, hemaglutinin 2.0 kb ve large protein ise 6.0 kilobazdır (97). Toplam transkriptlerin % 59'u N mRNA, % 13'ü P mRNA, % 14.5'i M mRNA , % 10.5'i F mRNA ve % 2.6'sı H mRNA'dan oluşmaktadır (36). Virüs genomu 56 nükleotid uzunluğunda bir öncül (leader) RNA'ya sahiptir. Genom transkripsiyonu 3' -N, P, M, F, H, L- 5' şeklinde gerçekleşmekte ve her gen bir protein kodlamasına rağmen P geni V ile C proteinlerini de kodlamaktadır

(19, 30, 42, 55, 86). Bu altı mRNA'nın transkripsiyonu N:RNA genomundan P-L polimeraz kompleksi tarafından yapılmaktadır. Transkripsiyon boyunca viral genom üzerindeki gen başlama ve gen durma sinyalleri tanınarak başlıklarlanmış, poliadenile mRNA'lar üretilmektedir (13, 19, 22, 37, 64, 86). Bu mRNA'lar tek bir açık okuma bölgesinden (ORF) translasyon ürünü açıklamaktadır. Segmentsiz negatif anlamlı RNA virüs genomlarından mRNA'ların transkripsiyonu genomun 3' ucunda bulunan bir promotordan yapılmaktadır. Bu nedenle promotora yakın olan genler fazla miktarda açıklanmakta ve monosistronik mRNA'ların sentezi 3' ucundan 5' ucuna doğru azalmaktadır (7, 19, 39, 88). İlk olarak öncül RNA transkribe edilmekte ve bunu nükleoprotein ile diğer genler takip etmektedir (19). Öncül RNA 7-metil guanosin (m7Gppp) [cap] ve poliadenilasyon kuyruğuna sahip değildir. Öncül ve N geni arasındaki bölge transkripsiyona uğramayan genler arası (intergenik) nükleotid sekansı kapsamamaktadır (19).

Paramiksovirüslerin kurgulanması nükleokapsidlerin oluşumu ile başlamaktadır (83). Temel olarak projeni virionların oluşumunda iki önemli adım bulunmaktadır. Bunlardan birincisi viral nükleokapsidlerin oluşumu, ikincisi ise oluşan nükleokapsidler içerisine yeni kurgulanan virionların alınmasıdır (20). Viral RNA sentezi; nükleoprotein, fosfoprotein, large ve kapsitlenen viral RNA kalıbına gereksinim duymaktadır (13, 19, 22, 38, 54, 64, 86). Sığır vebası virüs genomunun her bir ucunda yaklaşık 100 nükleotidden oluşan transkripsiyon ve replikasyon için gerekli kısa bölgeler bulunmaktadır. Viral polimeraz için gerekli olan promotorlar bu bölgelere yerleşmiştir (19, 64). Genom sonunda 37 nükleotidden oluşan kuyruk (trailer) bölge genom RNA sentezi için promotor görevi yapmaktadır (19, 64). Bütün paramiksovirüslerin öncül ve kuyruk

bölgelerin komplemant DNA dizisi ACCA ile başlamaktadır. Bu DNA dizisinde yapılan değişiklikler viral transkripsiyon üzerine etkili olmaktadır (64).

Sığır vebası virüsünün nükleokapsidi 18 nm çapında helikal simetrik bir yapıya sahip olup; zarlı virüs 100-150 nm çapındadır (12, 94). Virion zarı 8-12 nm uzunlukta olup lipoprotein karakterindedir ve viral yüzeyde iki grup glikoproteinden meydana gelmiştir. Lipid karakterindeki zar dayanıksız olduğu için saklama, dondurup çözme ve elektron mikroskop için preparat hazırlama durumları kolaylıkla virionun yıkılmasına neden olmaktadır. Bütün paramiksovirusler ısıya ve kurutma işlemlerine oldukça hassastır. Bu nedenle klinik örnekler 4°C’de korunmalı ve vakit geçirmeden hücre kültürüne ekilmelidir (12, 94).

Sığır vebası virüsü hem intrastoplazmik ve hemde intranükleer inklüzyon cisimciği oluşturmaktadır. Sığır vebası virüsü ile aynı sınıfta bulunan kızamık virüsünün intranükleer inklüzyon cisimcikleri 15-17 nm çapında zayıf helikal yapılardan oluşmuştur ve sadece nükleokapsid antijeni kapsamaktadır. Ancak intrastoplazmik inklüzyonlar 30-40 nm çapındaki nükleokapsidlerden oluşmuştur (54). Sığır vebası virüsünün zar proteinlerinin üzerinde bulunan epitoplarm sodyum dodesil sülfata (SDS) duyarlı olduğu bildirilmiştir (91). Böylece SDS’in hem hemaglutininin hem de füzyon proteinlerinin antijeniteleri üzerinde önemli olduğu açıklanmıştır. Morbillivirüs zar proteinlerinin antijenik bölgeleri amino asit diziliminden ziyade açıklama sonrası (posttranslasyon) modifikasyonlara ve konformasyonlara bağlı olarak şekillenmektedir (56, 91).

Morbillivirüs sınıfında bulunan virüslerin genleri arasında durma-başlangıç (stop-sinyal), genler arası (intergenik) DNA dizisi ve bir sonraki genin

başlama sinyal DNA dizisi bulunmaktadır. İki gen arasındaki intergenik DNA dizisi CTT dizilimidir fakat bu dizilim H ve L genleri arasında bulunmamaktadır (4, 8, 9, 37). Sığır vebası virüsünün bütün genleri AGGNNNAN ile başlamakta ve Adenin (A) uzantısı ile sonlanmaktadır (4, 9).

Sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu ve infeksiyöz Kabete-O virüs genom DNA dizilerinin karşılaştırılmasında iki genom arasında toplam 87 nükleotidden oluşan % 1'den daha az bir baz farkı bulunmuştur. Bu farklılıkların büyük bir kısmı öncül bölgede (3' ucunda) görülmektedir. Kuyruk (trailer) bölge ise daha iyi korunmuştur (5, 9). Sığır vebası virüsünün 5' ucu translasyona uğramayan bölgesi (5' UTR) % 57 oranında guanin (G) ve sitozin (C) içermektedir (32). Farklılıkların daha çok promotor bölgesinde meydana gelmesinin aşı suşunun transkripsiyon ve replikasyon etkinliğini azaltacağı ve bu virüsün zayıflamasına (attenüasyon) neden olabileceği bildirilmiştir. İki virüs arasındaki amino asit değişimi ise 33 tanedir (9).

### **3.1.2. Sığır Vebası Virüsünün Proteinleri**

#### **3.1.2.1. Fosfoprotein (P)**

Sığır vebası virüsü fosfoprotein geni 1524 nükleotid uzunluğunda bir ORF'a sahiptir. Fosfoprotein geni 507 amino asit içeren 90.5 kDa moleküler ağırlığındaki fosfoproteini açıklamaktadır (40). Sığır vebası virüs P proteini fosforile bir protein olup fosfat grupları serin amino asitidir. Kızamık virüsü P proteinin asidik bölgesi hücresel kazein kinaz II (CKII) tarafından fosforile olmaktadır (24). Fosforilasyon sonucu P proteinin N:RNA kalıbına bağlanması kolaylaşmaktadır. Fosfoprotein fosforilasyonu viral RNA sentezi için gereklidir.

Kızamık virüsünün fosforilasyon bölgesi V proteini ile ortak olan proteinin amino uç kısmında bulunduğu bildirilmiştir. Fosfoprotein ribonükleoprotein (RNP) kompleks oluşumuna katılmaktadır. Ribonükleoprotein kompleksi viral genomun transkripsiyonu ve replikasyonu için gereklidir (13, 21, 52, 75, 82, 99).

Fosfoprotein bütün RNA sentez aşamalarında modüler bir rol oynamaktadır. Large proteini ile beraber transkripsiyon ve replikasyonda aktif rol oynamaktadır (3, 13, 19, 21, 22, 42, 64). Kurgulanmamış NP<sup>o</sup>-P formu genom replikasyonunda yeni oluşan (nascent) genomik RNA'yı paketlemek için kullanılan soluble formdur (45). Sığır vebası virüsü fosfoproteini, virüsün replikasyon ve transkripsiyonunda görevli olan bir proteindir (93). Fosfoprotein geni fosfoprotein haricinde V ile C proteinlerini de kodlamaktadır (11, 30, 42, 55, 86, 96, 106). Altı mRNA; N:RNA genomundan P-L polimeraz kompleksi tarafından transkript edilmektedir. Sığır vebası virüsü P proteini amino asit dizilimi kızamık virüsü ile % 60, köpek gençlik hastalığı virüsü ile % 44, küçük ruminant veba virüsüyle % 46 homologluk göstermektedir (106). Genel olarak paramiksovirus P proteinlerinin karboksil uç kısmı korunmuştur. Fosfoprotein yalnız açıklandığında diffüz bir şekilde stoplazmada yerleşmektedir (90). Bu protein nükleoproteini soluble formda tutarak NP'nin bir araya toplanmasını ve virüs replikasyonu olmadığında kurgulanmasını engellemektedir (22). Sendai virüs ve kızamık virüslerinde P proteinin; L proteini ile beraber açıklanmasıyla L proteinin degradasyonu engellenmektedir (15, 18). Fosfoprotein ılımlı pH ve düşük iyonik ortamda nükleokapsidden ayrılmaktadır (83). Bu protein ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında çok fazla hibridizasyon şekillenmesinden dolayı bu proteinin ayırıcı teşhis çalışmalarında kullanımı uygun değildir (26, 83).

### 3.1.2.2. Matriks proteini (M)

Sığır vebası virüsü matriks geni 1460 nükleotid uzunluğunda olup 1008 nükleotidlik bir ORF'u bulunmaktadır. Böylelikle 335 amino asit içeren 38 kDa moleküler ağırlığındaki matriks proteini açıklanmaktadır. Morbillivirüs sınıfında bulunan virüslerin en küçük yapısal proteini olan matriks proteini glikozile olmayan bir proteindir. Matriks proteini hidrofobik yapıdadır ve bir çok bazik bölgeden oluşmuştur. Matriks proteini plazma membranı ve invitro hücre sel aktinlerle ilişki halinde bulunmaktadır. Matriks proteini, virion morfolojisinde viral zar ile kapsid arasında lokalize olmakta ve hemaglütinin ile füzyon proteinlerinin stoplazmik uçlarıyla ilişki halinde bulunmaktadır. Matriks proteinin membran nükleokapsid ilişkisi, virüs tomurcuklanması, virüs morfolojisi, oluşan yeni virionların kurgulanması ve virüsün infektivitesinde önemli bir görevi bulunmaktadır (8, 20, 40, 46, 51, 59, 66).

Sığır vebası virüsü matriks geni diğer morbillivirüs M genleri ile aynı uzunlukta bulunmamaktadır. Kızamık virüsünden 6 nükleotid kısa, küçük ruminant veba virüsünden 12 ve köpek gençlik hastalığı virüsünden ise 18 nükleotid daha uzundur (8). Paramiksovirus matriks genlerinin uzun bir 3' ucu açıklama yapmayan bölgesi (UTR) bulunmamaktadır. Bu bölge ayrıca % 65 oranında guanin (G) ve sitozinden (C) zengin bir bölgedir (8). Matriks proteini morbillivirüslerde çok fazla korunmuş bir genidir. Bu proteinin amino ucu glisin ve prolinden zengin olmasına rağmen karboksil uç kısmı baziktir ve N proteini ile ilişki halinde bulunmaktadır (20). Genin iki adet ORF'u bulunmaktadır. Birinci ORF 33. nükleotidde ikinci ORF ise 991. nükleotidde başlamaktadır. Matriks geninin 3' ucu translasyon yapmayan bölgesi morbillivirüslerde tam anlamıyla

homologluk göstermemesine rağmen kodlayan bölgelerde % 68.6 homologluk göstermektedir. Matriks proteinin tripsin enzimi ile kesim sonrası 43 fragmente ayrılması nedeniyle proteinin arjinin, lizin ve histidin amino asitlerinden zengin olabileceği bildirilmiştir. Sığır vebası virüsü, köpek gençlik hastalığı virüsü ve kızamık virüsü matriks proteinlerinin hidropati karakterleri benzerlik göstermektedir. Matriks proteinin 139-170. pozisyonundaki amino asit dizilimleri  $\beta$ -yaprağı (sheet) sekonder formu gösterdiği ve bu bölgenin ayrıca lipid bağlanma bölgesinden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (8, 59). Sığır vebası virüsü matriks protein amino asit dizilimi; kızamık virüsü ile % 78.2, köpek gençlik hastalığı virüsü ile % 77.6 homologluk göstermektedir (59). Morbillivirüslerde M protein amino asit dizilimi iyi korunmasına rağmen, diğer paramiksovirusler ile karşılaştırıldıklarında, homologluğun az olduğu bildirilmiştir. Matriks geni ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında çok fazla hibridizasyon şekillenmesinden dolayı bu gen teşhis amaçlı kullanımlara uygun bulunmamaktadır (26).

### **3.1.2.3. Füzyon proteini (F)**

Sığır vebası virüsü füzyon geni 2350 nükleotid uzunluğunda bulunmaktadır. Gen 587. nükleotidde başlayan ve 2227. nükleotidde durma kodunu ile sonlanan 1641 bazlık bir ORF'a sahiptir ve bu ORF'tan 546 amino asit uzunluğunda, 62 kDa moleküler ağırlığındaki füzyon proteini açıklanmaktadır (40, 98). Bu protein virüsün zarında bulunan tip 1 transmembran karakterinde glikoproteindir ve nötralize antikorların oluşmasında görevlidir (12, 19). Füzyon proteini virüsün zarında dimerler halinde bulunmaktadır. Pürifiye paramiksovirus F proteinleri ile yapılan immunizasyon çalışmalarında füzyon proteininin güçlü

bir immun yanıt oluşturduğu ve enfeksiyona karşı canlıyı koruduğu bildirilmiştir. Füzüyon ve hemaglütinin proteinleri enfekte hücrelerde paramiksovirüslere özgül olan sinsitalleri oluşturmaktadır (23, 56, 73, 74). Füzüyon proteini virüsün hücreden hücreye yayılmasında görev alan bir proteindir ve bu görevini nötral pH'da yapmaktadır (56, 81). Sığıır vebasü virüsü füzüyon proteini sayesinde hücreden hücreye yayılımını anti-H nötralizan antikorlarının varlığında bile gerçekleştirmekte ve böylece virüse karşı oluşun nötralizan antikorlardan virüsün kaçmasını sağlamaktadır (10, 31). Füzüyon proteini; hedef hücre membranı ile füzüyonu sağlaması nedeni ile, virüsün hücreye girmesinde (penetrasyonu), hücrenin hemolizisinde ve virüsün virülensinde rol oynamaktadır (87, 98, 104).

Paramiksovirüslerin F proteinleri inaktif prekürsör (F<sub>0</sub>) olarak sentezlenmektedir. Füzüyon proteini biyolojik aktivitesini yapabilmesi için hücrenel enzimler tarafından iki polipeptide (F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub>) ayrılmalıdır (12, 56, 73). F<sub>2</sub> polipeptidin 1027. nükleotidindeki sistein F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> arasında gerçekleşen kovalent disülfid bağı oluşturmaktadır. Kesim bölgeleri F<sub>0</sub> amino ucunda 100 amino asitlik bir kısma yerleşmiştir. Bu kesim bölgesinin amino ucunda bazik amino asitler (arjinin ve lizin), karboksil ucunda ise hidrofilik bölgeler görülmektedir. Bazik amino asitlerdeki artış virüsün patojenitesini artırmaktadır (17). Füzüyon proteinin hücrenel proteazlar tarafından kesiminden sonra F<sub>1</sub> proteinin karboksil ucunun virüsün gerçekleştirmiş olduğu füzüyon aktivitesinde önemli bir görevinin olduğu bildirilmiştir (56, 98). Paramiksovirüslerde F<sub>1</sub> proteinin amino asit diziliminin korunduğu ve uzun bir stoplazmik uç kısma sahip olduğu bildirilmiştir. F<sub>1</sub> proteinin stoplazmik uç kısmı; nükleokapsidle ilişki halinde olan matriks proteini ile temas kurarak virüsün tomurcuklanmasında görev almaktadır. Füzüyon

proteinin sekonder yapısı birkaç hidrofobik bölge ile  $\alpha$ -helikal bölgeden oluşmaktadır (98). Füzyon proteinleri iki önemli hidrofobik bölgeye sahiptir. (i) Amino terminal kısmı yeni oluşan (nascent) polipeptidlerin endoplazmik retikuluma yönelmesi için sinyal sekansı içermektedir. (ii) Karboksil uç ise membrana yerleşmiştir (17). Füzyon proteini hücrelere virüsün tutunmasına yardım ettiği gibi hücreden hücreye yayılmasına ve konak hücre membranı ile virion zarının füzyonunun gerçekleşmesini sağlamaktadır (98). F<sub>1</sub> polipeptidi 438 amino asit uzunluğunda ve 40 kDa moleküler ağırlığındadır (78). Bu proteinin amino ucu hidrofobik kısımlardan oluşmuştur ve paramiksoviruslerin hepsinde korunmuştur. F<sub>1</sub> proteinin stoplazmik bölgesinde bir tane glikozilasyon bölgesi belirlenmiştir (31, 46). F<sub>2</sub> polipeptidi 89 amino asit uzunluğunda ve 20 kDa moleküler ağırlığında bulunmaktadır (78). F<sub>2</sub> proteini üzerinde üç tane potansiyel glikozilasyon bölgesinin olduğu bildirilmiştir (31, 46).

Morbillivirüslerde füzyon proteini korunmuş olmasından dolayı bu sınıftaki virüsler arasında şekillenen çapraz reaksiyonda önemli bir yere sahip olabileceği bildirilmiştir. Füzyon proteini bu sınıftaki virüslerde bulunan en küçük glikozile proteindir (23, 78, 81). Füzyon proteinin 25-27, 57-59, 63-65. bölgelerinde asparajine (N) bağlı üç adet glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır (98). Sığır vebası virüsü F proteini amino asit diziliminin kızamık virüsü ile % 18.7, köpek gençlik hastalığı virüsü ile % 31.8 oranında farklı olduğu bildirilmiştir (46). Ayrıca füzyon proteinini kodlayan F geni ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında morbillivirüsler arasında fazla miktarda hibridizasyon şekillenmesinden dolayı bu proteinin ayırıcı teşhis çalışmalarında kullanımı uygun değildir (26). Morbillivirüslerin F proteinleri arasında sığır

vebası virüsü ve kızamık virüsü en uzun açıklama yapmayan 5' uç bölgesine sahip olup sitozinden (C) zengindir. Bu bölgenin nükleotid dizilimi korunmuştur ve düzenleme görevinin olabileceği bildirilmiştir (32, 98).

#### **3.1.2.4. Hemaglütinin proteini (H)**

Sığır vebası virüsü hemaglütinin geni 1952 nükleotid uzunluğundadır. Hemaglütinin geni 1827 nükleotid uzunluğunda bir ORF'a sahip olup bu bölgeden 609 amino asit içeren 77 kDa moleküler ağırlığındaki hemaglütinin proteini açıklanmaktadır. Açık okuma bölgesi genin 21-23 nükleotidlerinde ATG ile başlamakta ve 1848-1850. nükleotidde durma (stop) kodonu ile sonlanmaktadır. Genin başlangıç bölgesinde +4 pozisyonunda kozak DNA dizisi bulunmamaktadır (40, 97, 107). Hemaglütinin proteini hücre üzerinde bulunan reseptöre bağlanarak infeksiyonu başlatmaktadır. Hemaglütinin proteinin hücre reseptörüne bağlanması sonucu güçlü bir humoral ve hücreyel immün cevap oluşmaktadır (29, 46, 87).

Kompetatif bağlanma ölçümleri ile sığır vebası virüsü hemaglütinin proteini üzerinde en az yedi farklı antijenik ve bir tane polimerik disülfid bağ bölgesinin bulunduğu bildirilmiştir. Bu bölgelerden altı tanesi nötralizasyon aktivitesi uyarabilmektedir (51, 91, 92). Gen üzerinde asparajine (N) bağlı glikozilasyon için 168-170, 200-202, 215-217 ve 395-397 olmak üzere dört adet potansiyel glikozilasyon bölgesi bulunmuştur. Sığır vebası virüsü ve kızamık virüsü hemaglütinin genlerinin DNA dizilerinin karşılaştırılmasında nükleotid diziliminde % 63.4, amino asit diziliminde ise % 59.3 benzerlik bulunmuştur (97). Hemaglütinin proteinin üç boyutlu yapısının oluşmasında sistein pozisyonlarının önemli olduğu bildirilmiştir. Hemaglütinin proteini 13 residülük bir sistein

disülfid bağı oluşturmaktadır ve kısa bir stoplazmik uç kısma sahiptir (46, 97). Bu proteinin amino uç kısmı, karboksil uç ve orta bölgelerine kıyasla, daha fazla korunmuştur. Az korunmuş olan bölgelerin daha fazla immunojenik olabileceği ve bu bölgelerin birkaç hidrofilik kısım ile glikozilasyon bölgeleri kapsayacağı bildirilmiştir. Ayrıca bu bölgeler virion zarının dış yüzeyini oluşturmaktadır (97). Hemaglütinin proteini sığır vebası virüsünün zarında füzyon proteinine kıyasla daha fazla bulunmaktadır (51). Hemaglütinin proteini virüsün hücrelere tutunmasından, virüse karşı nötralizan antikorların oluşmasından sorumlu olup tip 2 trans membran karakterinde glikozile bir proteindir (29, 46, 66, 87). Füzyon proteini ile beraber sinsitia oluşumuna katılmaktadır. Hemaglütinin ve F proteinleri üzerinde tanımlanan antijenik bölgeler asparajine (N) bağlı oligosakkarid zincirlerinden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Morbillivirüslerde H geni en az korunmuş gendir. Hemaglütinin ve F proteinlerinin beraber açıklanması immunosupresyonu uyararak için yeterli olduğu bildirilmiştir (43).

### **3.1.2.5. C proteini**

Sığır vebası virüsü C geni ORF'u 534 nükleotid uzunluğunda olup 177 amino asit açıklamaktadır. C proteini 21.5 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (40). C proteini yapısal olmayan protein olup fosfoprotein geninin amino terminalindeki alternatif birbiri ile örtüşen (overlapping) açık okuma bölgesindeki ikinci bir AUG kodonu tarafından sentezlenmektedir (30, 40, 62, 86, 96). C proteinin rolü tam olarak bilinmemesine rağmen mRNA'ların miktarında ve kalitesinde görevli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca C proteinlerinin pozitif yüklü olmasından dolayı

RNA ile ilişki halinde olabileceği bildirilmiştir. C proteini bazik karakterde bir proteindir (19). Sığır vebası virüsü C proteini amino asit dizilimi kızamık virüsü ile % 56, köpek gençlik hastalığı virüsü ile % 42, küçük ruminant veba virüsüyle % 40 homologluk göstermektedir (106). C proteinin, kızamık virüsü ile infekte hücrelerin stoplazmasında ve nükleusunda lokalize olduğu immunfloresan çalışmalarla gösterilmiştir (30).

### 3.1.2.6. V proteini

Sığır vebası virüsü V proteini yapısal olmayan bir proteindir ve fosfoprotein geninden RNA üzerinde Guanin (G) editlemesi ile sentezlenmektedir (19, 30, 62, 86, 96). V geni, 899 nükleotid uzunluğunda ORF'a sahip olup 299 amino asit açıklamaktadır. Fosfoprotein ve V proteinlerinin amino uçları ortak olmasına rağmen karboksil uçları farklıdır. V proteinlerinin karboksil uç kısımları sisteinden zengin bölgelerden oluşmuştur ve paramiksovirusler arasında korunmuştur. V proteinin karboksil ucu çinko parmak (zinc finger) motifi ile sonlanmaktadır. Sisteinden zengin bölgelerin nükleik asit bağlanma bölgesi, protein-protein ilişkisi yada oligomerlerin stabilizasyonunda görevli olabileceği bildirilmiştir. V proteinin viral transkripsiyon ve replikasyonda görevli olabileceği kaydedilmiştir (11, 19, 24, 62, 75). Sendai virüs V proteinin genom replikasyonunu azalttığı (down regulate) fakat transkripsiyonu ise etkilemediği bildirilmiştir. Ayrıca V proteini zayıf bir şekilde L ve P proteinleri ile ilişki halindedir. V proteini stoplazmada lokalize olan fosforile bir proteindir (30).

### 3.1.2.7. Large proteini (L)

Sığır vebası virüsü large geni 6552 nükleotid uzunluğunda bir ORF'a sahiptir. Large geni 2183 amino asit büyüklüğünde ve 212 kDa moleküler ağırlığındaki L proteinini açıklamaktadır (40, 62). Bu genin 3' ucu translyasyona uğramayan bölgesinde 72 nükleotid, 5' ucu translyasyona uğramayan bölgesinde ise 22 nükleotid bulunmaktadır (4, 62).

Morbillivirüs L proteinlerinin karşılaştırmalı analizlerinde üç korunmuş bölgenin var olduğu tespit edilmiştir. Birinci bölgenin RNA bağlanma bölgesi olabileceği bildirilirken, ikinci bölgenin replikasyon ile transkripsiyon aktivitelerinde ve üçüncü bölgenin ise diğer nükleotidlere bağlanma bölgesi olabileceği kaydedilmiştir (62). Morbillivirüslerde L proteini en büyük yapısal proteindir (78). Negatif zincirli RNA virüslerinin large proteinleri en az dört nükleotidden oluşan korunmuş bir bölge içermektedir. Paramiksovirüslerin L proteinlerinde korunmuş pentapeptid sekans olarak QGDNQ bulunmaktadır ve bu dizilimin RNA'ya bağımlı polimerazın bir tür çeşidi olabileceği bildirilmiştir (3, 62). Large proteini polimeraz kompleksin (P-L) katalitik subünitesidir. Large proteini RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzim özelliğine sahiptir ve proteinin birden fazla fonksiyonu bulunmaktadır. Bu proteinin fonksiyonları arasında genomik RNA'nın transkripsiyon ve replikasyonu ile ilgili transkriptaz ve replikaz, mRNA'nın 5' ucunun başkklanması (cap), metil transferaz aktivitesi ve poliadenilasyon aktivitesi gibi enzimatik aktiviteler yer almaktadır (15, 18, 52, 62, 86, 93, 102). Large proteini yapısal bir proteindir ve genomun 5' ucunda bulunması nedeni ile en az sentezlenen proteindir (7, 19, 39, 40). Virüsün replikasyon ve transkripsiyonunda rol oynamaktadır (13, 19, 21, 22). Simian virüs

5, sendai virüs ve kızamık virüsü L proteinlerinin amino uç kısmında fosfoprotein için bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Large proteinleri paramiksovirüslerde belirgin bir benzerlik göstermektedir (24).

### **3.1.2.8. Nükleoprotein (NP)**

Sığır vebası virüsü nükleoprotein geni 1668 nükleotid uzunluğundadır. Nükleoprotein geninin 3' ucunda 53 nükleotid 5' ucunda ise 40 nükleotid uzunluğunda translasyona uğramayan bölgeler bulunmaktadır. Sığır vebası virüsü NP geninin başlama bölgesi AGGA dizilimidir. Nükleoprotein geni ATG ile başlayan ve 1576 da TGA stop kodonu ile sonlanan 1575 nükleotid uzunluğunda bir açık okuma bölgesine (ORF) sahiptir. Böylelikle 525 amino asitten oluşan nükleoprotein açıklanmaktadır (4, 48, 50).

Sığır vebası virüsü nükleoproteini genomik RNA'yı sola doğru (left-handed) sararak helikal nükleokapsid formunu oluşturmakta ve viral replikasyon siklusu boyunca filamentöz ribonükleoprotein (RNP) kompleksi halinde bulunmaktadır. Ribonükleoprotein kompleksi elektron mikroskopta karakteristik olarak çapraz dikiş (herring-bone) görünümünde görülmektedir (19, 33, 34, 108). Paramiksovirüslerin kurgulanması nükleokapsidin oluşmasıyla başlamaktadır. Kapsitlenme öncül RNA üzerinde bulunan spesifik bir nükleotid dizisinde başlamasına rağmen kapsitin uzaması RNA üzerinde bulunan bazlardan bağımsız olarak gerçekleşmektedir (108). Negatif anlamlı RNA genomu yaklaşık 2800 nükleoprotein molekülü tarafından kapsitlenerek nükleokapsid merkezini (core) oluşturmaktadır. Yeni oluşan nükleokapsid merkeze daha sonra P ve L proteinleri bağlanmaktadır (83). N-RNA ve N-N arasında güçlü bir hidrofobik ilişki

bulunmaktadır (63). Paramiksovirus nükleoproteinlerinin amino uçlarının tamamı olmasa dahi büyük bir kısmı RNP oluşumunun içerisinde yer almaktadır (83). Nükleoprotein RNA'dan sadece sodyum dodesil sulfat ve 3M guanidine-HCl iyonik deterjanlarıyla ayrılmaktadır (54). Negatif zincirli RNA virüslerinde nükleoprotein, viral RNA genomu, fosfoprotein ve large proteini ribonükleoprotein yapıyı oluşturmaktadır (13, 19, 25, 36). Viral replikasyon boyunca nükleoprotein antiterminasyon aktivitesi ve RNP kompleks kopyeleri; aynı kalıp üzerinde öncül RNA (leader RNA), mRNA durma (stop) sinyallerini, poliadenilasyon ve P gen editleme sinyallerini ihmal etmektedir. Nükleoprotein viral genomun etrafını sararak nükleokapsidi oluşturmakta ve bu oluşan N:RNA kompleksi viral transkripsiyon ve replikasyon için kalıp olarak kullanılmaktadır (13, 21, 48, 86). Paramiksovirusler ile yapılan invitro replikasyon çalışmalarında ya üç proteinin (N, P, L) ortak açıklanması ile yada P-NP ve P-L proteinlerinin ayrı olarak ortak açıklanmaları ile replikasyon gerçekleşmektedir. Bunların dışında oluşan kombinasyonlarda replikasyon gerçekleşmemektedir (22). Fosfoprotein ve large proteinleri negatif zincirli RNA'dan mRNA'ları sentezleyebilmelerine rağmen, N proteini kalıbın bir parçası olarak belirtilmiştir. Bunun nedeni polimeraz enziminin çıplak genom RNA'yı kopyalayamaması ve sadece nükleoprotein tarafından kapsitlenen RNA'nın viral RNA sentezi için kalıp olarak görev yapmasıdır (21, 64, 83, 102).

Nükleoprotein tarafından kapsitlenen RNA, RNase'lara karşı dirençlidir ve RNA'ya bağımlı RNA sentezi boyunca kalıp olarak kullanılmak için gereklidir (13, 19, 20). Nükleoprotein, genomik RNA'yı kapsitlemesinden dolayı P ve L proteinlerine göre virüs yapısında daha fazla bulunmaktadır (52). RNA genomu

viral nükleokapsid proteini olan nükleoprotein ile sıkı bir ilişki halinde iken L ve P proteinleri ile daha gevşek bir ilişki halinde olduğu bilinmektedir (21). Paramiksoviruslerin transkripsiyonu ve replikasyonu için farklı protein komplekslerine ihtiyaç duyulmaktadır. Polimeraz kompleksi (P-L) hem replikasyon hem de transkripsiyon için ihtiyaç iken; replikasyonda kurgulanmamış NP (NP<sup>o</sup>) ve P proteini kompleksine ihtiyaç duyulmaktadır (13, 86). Transkripsiyondan replikasyona geçiş kurgulanmamış nükleoprotein (NP<sup>o</sup>) konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir (13, 86). Nükleoprotein böylece iki farklı kompleksin oluşumu ile karakterizedir. Kurgulanmamış nükleoprotein fosfoproteine bağlanır (NP<sup>o</sup>-P) yada kurgulandığı zaman P/L kompleksine bağlanarak nükleokapsidin core bölgesini oluşturur (13, 86).

Morbillivirus sınıfında bulunan virüslerin nükleoproteinlerinde DNA baz düzeyindeki farklılıklar 3' ucunda belirgin, 5' ucunda ılımlı, orta bölgesinde ise en düşük olarak belirlenmiştir. Nükleoprotein 5' ucunda ve orta (core) bölgesinde görülen bir çok nükleotid değişiklikleri üçlü (triplet) kodonların üçüncü pozisyonunda görülmesine rağmen genel olarak aynı amino asitleri açıklamaktadırlar. Morbillivirus nükleoproteinlerinin yüksek düzeyde korunmuş olan bölgelerinin virüs replikasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Nükleoprotein 3' ucundaki farklılıkların çoğu ise üçlü (triplet) kodonların birinci ve ikinci nükleotidinde bulunmuştur (48, 71). Morbillivirus sınıfında bulunan kızamık virüsü (MV) ve köpek gençlik hastalığı virüsünün (CDV) nükleoprotein genlerinin DNA dizimleri sığır vebası virüs nükleoprotein gen DNA dizilimi ile % 68.1 ve % 63 oranında bir homologluk göstermektedir. En yüksek homologluk MV ve CDV arasında genin 593-1312. nükleotidlerindeki

orta bölgelerinde bulunmuştur. Bu bölgelerdeki amino asitlerin homologluğu ise kızamık virüsünde % 88.3 iken köpek gençlik hastalığı virüsünde (CDV) % 86.3 olarak belirlenmiştir. En düşük homologluk son 318 nükleotid (1313-1630) arasında görülmüştür (49). Nükleoprotein geninde meydana gelen değişiklikler virüsün virülensini etkilemektedir (4).

Amino asit uzunluğu 525 olan nükleoprotein üç bölgeye bölünebilir. (i) Orta derecede korunmuş amino uç (N-Terminal) bölge. (ii) Yüksek bir şekilde korunmuş orta bölge. (iii) Çok değişken olan (hypervariable) karboksil uç (C-terminal) bölge (125a.a). Orta derecede korunmuş olan bölge; nükleokapsid yapılar içerisinde kurgulanma ve genom RNA' sına bağlanma için gerekli olan bir bölgedir. Ancak, fazla değişken olan karboksil uç bölge (421-525 a.a) hidrofilik amino asitlerin çoğunu içermekte ve nükleoproteinin dış yüzeyini kaplamaktadır. Ayrıca bu bölge üzerindeki 452-501 amino asitler T yardımcı hücreleri (T-helper cell) için epitoplari oluşturmaktadır (50, 71).

Morbillivirüs sınıfında bulunan virüsler arasındaki amino asitlerin homologluğu kızamık virüsünde (MV) % 88.3, köpek gençlik hastalığı virüsünde (CDV) % 86.3, phocid distemper virüs ile % 69 olarak bulunmuştur. Amino asitlerin bilinen sekonder yapıları bu üç virüs içinde farklılıklar göstermektedir. Sekonder yapılarındaki bu farklılıklar karboksil uçta görülürken, amino uçta ve orta bölgede benzer yapılar gözlenmiştir (11, 50). Ayrıca, diğer *Paramyxoviridae* ailesinde yer alan virüsler ile karşılaştırıldığında nükleoproteinler arasında yüksek oranda homologluk görülmemektedir. Böylece nükleoprotein geninin çok yüksek bir şekilde korunduğu ortaya çıkmaktadır (50). Yine aynı şekilde DNA diziliminde bulunan AGLASGF ve WSYAMGL amino asitlerinin Sendai virüs ve

Bovine Parainfluenza virüs 3 ile karşılaştırılmasında ise bu bölgelerin korunmuş olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bu bölgelerin RNA bağlanma bölgesi yada replikasyon düzenleme bölgesi olarak fonksiyonel bir görevi olabileceği düşünülmektedir (48, 50).

Sığır vebası virüsü nükleoproteini nükleusta lokalize olan bir proteindir. Bununla beraber nükleoprotein fosfoprotein ile beraber açıklandığında stoplazmada, V proteini ile beraber açıklandığında ise hem stoplazma hemde çekirdekte yerleşmektedir (38, 47, 90). Nükleoprotein ile fosfoprotein arasındaki ilişki non-ioniktir ve bu iki protein arasındaki ilişkinin gerçekleşebilmesi için her iki proteinin birden fosforile olmasına gerek yoktur, iki proteinden birinin fosforile olması yeterlidir (86). Nükleoprotein fosfoprotein ile beraber açıklandığında NP proteinin non-spesifik RNA'ya bağlanması önlenerek intranükleer lokalizasyonu engellenmektedir (38).

Sığır vebası virüsü nükleoproteininin moleküler ağırlığı 58-65 kDa arasında değişmektedir (40, 48, 49). Nükleoprotein birkaç bazik amino asitten oluşmuştur (47). Kızamık virüsü nükleoproteininin fosforilasyon bölgesi karboksil uç bölgede bulunmakta ve fosfat grupları threonin ile serin amino asitleridir (78). Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizlerinde fosforile formunun fosforile olmamış formuna göre daha yavaş hareket ettiği bilinmektedir (28). Morbillivirüslerin nükleoproteinleri hücre içi proteolizise karşı oldukça hassastır. Bu proteazlar tarafından sindirilen nükleoprotein proteolizis ürünleri ile yapılan SDS-PAGE analizlerinde, ürünlerin 40 ve 55 kDa moleküler ağırlıkta hareket ettikleri bildirilmiştir (78). Aynı şekilde stoplazmadan ve nükleustan izole edilen nükleoproteinler de SDS-PAGE analizinde farklı göç etmektedirler (78).

Sendai virüs nükleoproteininin karboksil uç kısmı nükleokapsidin dış yüzeyine yerleşmiştir ve proteaz kesimine daha dayanıklıdır (83).

Sığır vebası virüs infeksiyonunda nükleoprotein ilk sentezlenen ve akut infeksiyonlarda ilk belirlenen proteindir (44). Nükleoprotein genomun 3' ucunda bulunması nedeni ile en fazla sentezlenen proteindir ve sentezlenen viral proteinlerin % 80'i, toplam hücrel proteinlerin ise % 20'sini oluşturur (7, 33, 36, 55). Nükleoprotein infekte hücrelerde fazla miktarda sentezlenmesinden dolayı hücrel immun sistemi uyarmaktadır (33). Bu protein yüksek immunojenitesinden dolayı sığır vebası infeksiyonlarının teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır (48, 49).

Morbillivirüs sınıfında bulunan ve geviş getirenlerde infeksiyona neden olan sığır vebası virüsü ve küçük ruminant vebası virüslerinin antijenik yakınlık göstermelerinden dolayı, bu iki hastalığın görüldüğü bölgelerde ayırıcı teşhisinin yapılması önemlidir. Sığır vebası virüsü koyun ve keçilerde infeksiyona neden olabildiği gibi küçük ruminant vebası virüsünde sığırlarda infeksiyona neden olmaktadır (34, 57, 72). Bu hastalıkların her ikisi de Office International Epizootics tarafından hızlı yayılmaları ve kontagiyöz olmalarından dolayı A grubuna dahil edilmişlerdir (23). İki hastalığın birbirinden ayırıcı teşhisinde NP proteinin kullanımı ön plana çıkmıştır. Bunun için NP proteinine spesifik hazırlanan monoklonal antikorlar ve NP geninin radyoaktif olarak veya biotinle işaretlenmiş cDNA problemleri kullanılmaktadır. Ayrıca her iki virüs nükleoproteinleri ile yapılan SDS-PAGE analizlerinde bu proteinlerin farklı göç ettikleri bildirilmiştir (26, 57, 58, 72).

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin ilerlemesi ile viral infeksiyonlara karşı koruyucu amaçlı rekombinant aşilar geliştirilmiştir. Rekombinant aşiların kullanımı başarılı olmasına rağmen, rekombinant aşı ile aşilanmış ve infekte hayvanların teşhisinin yapılması oldukça güçtür. Bu sorunun üzerinden gelmek için virüsün içsel proteinleri kullanılarak teşhis amaçlı kitler hazırlanmıştır (1, 40, 48, 49, 69, 85).

Bu çalışmada sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu ile infekte Vero hücrelerinden elde edilen toplam RNA'lar kullanılarak NP genine spesifik primerler ile tersine transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonuyla NP geni çoğaltıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan NP geninin klonlama plazmidine yerleştirilmesi, rekombinant plazmidin *E.coli* hücrelerine transformasyonu ve *E.coli* hücrelerinde NP geninin klonlanması gerçekleştirildi. Daha sonra klonlanan rekombinant plazmid DNA'sından izole edilen sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu NP geninin ökaryotik açıklama plazmidine yerleştirilmesi ve bu açıklama vektörü ile transfekte edilen Vero hücrelerinde nükleoprotein geninin açıklanması amaçlanmıştır. Nükleoprotein geninin açıklanması ile elde edilecek olan nükleoprotein teşhis amaçlı kitlerin hazırlanması ve immunizasyon çalışmalarının yanı sıra NP proteinin sığır vebası virüsü biyolojisindeki görevinin daha detaylı çalışılmasına imkan verecektir.

## 4. GEREÇ ve YÖNTEM

### 4.1. Plazmidler

#### 4.1.1. pGEM-3Zf (-) plazmidi

pGEM-3Zf (-) plazmidi standart bir klonlama vektörü olup invitro transkripsiyon ile yüksek miktarda RNA üretmek için uygun bir promotor bölgesi içermektedir. Plazmid 3199 nükleotid uzunluğunda olup *lacZ*  $\alpha$ -peptid ve pGEM-3Z klonlama plazmidinden düzenlenen bir klonlama bölgesine sahiptir. Ayrıca, plazmid klonlama bölgesinin bitişiğinde hem SP6 hem de T7 RNA polimeraz bölgelerini bulundurmaktadır. Bu düzenleme plazmide fonksiyonel  $\beta$ -galaktosidazı açıklayan *lacZ* $\Delta$ M15 gen ürününü tamamlayan fonksiyonel bir  $\alpha$ -peptid vermektedir. Bu *LacZ* $\Delta$ M15 genotipini bulunduran ve aynı zamanda pGEM-3Zf (-) vektörünü taşıyan hücreler IPTG ve X-Gal kapsayan besi yerinde mavi beyaz renk seleksiyonuna imkan vermektedir. Plazmid sirküler tek iplikli DNA üretimi için uygun olup, filamentöz faj fl replikasyon başlangıcı ve ampisiline dirençlilik geni içermektedir (76).

#### 4.1.2. pCI-neo plazmidi

pCI-neo; ökaryotik hücrelerde hem devamlı hem de geçici protein açıklamakta kullanılan 5472 nükleotid uzunluğunda bir plazmidir. pCI-neo plazmidi insan cytomegalovirus (CMV) çok erken enhancer/promotor, simian virüs 40 (SV40) geç poliadenilasyon sinyali ve gen açıklaması için dizayn edilmiş optimize kimerik intron bölgesini içermektedir. Plazmid devamlı transfekte klonların seçimi için neomisin fosfotransferaz geni, klonlama bölgesi (bu bölgenin başında T7 ve sonunda T3 RNA polimeraz promotorları), fl replikasyon

başlangıç bölgelerinde sahiptir. Neomisin fosfotransferaz geni genetiğin olarak bilinen G-418 antibiyotikine dirençlidir. Klonlama bölgesinin hemen yanında bulunan T7 ve T3 RNA polimeraz promotorları ile klonlanan DNA'ların pozitif ve negatif anlamlı zincirlerini sentezleyebilmektedir (76).

#### **4.2. Sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu**

Çalışmada sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu kullanıldı. Virüs Etlik Araştırma Enstitüsünden temin edildi. Virüsün Sberman ve Kaerber metoduna göre titresi  $DKID_{50} = 10^{5.2}/0.1$  ml olarak bulundu.

#### **4.3. Hücre kültürü**

Bu çalışmada Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri (Vero) kullanıldı. Hücreler % 10 fetal sığır serumu (Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'de üretildi. Bu hücreler Şap Enstitüsü, Ankara'dan sağlandı.

#### **4.4. Primer seçimi**

Bu çalışmada kullanılan primerler EMBL gen bankası sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu X 68311 gen diziliminden nükleoprotein geninin açık okuma bölgesine göre dizayn edildi. Primerler oluşturulurken çalışmada kullanılacak klonlama ve açıklama plazmidlerinin klonlama bölgelerindeki enzim kesim bölgeleri dikkate alınarak primerlerin 5' uçlarına enzim kesim bölgeleri yerleştirildi. pGEM-3Zf (-) klonlama vektörüne yerleştirmek için ileriye doğru olan primerin 5' ucuna *Hind*III ve geriye doğru olana ise *Sal*I enzim kesim

bölgeleri ve açıklama vektörü pCI-neo plazmidine yerleştirmek için ise primerin 5' ucuna *NheI* ve *SalI* enzim kesim bölgeleri ilave edildi. Ayrıca açıklama plazmidinde protein açıklatılmasını artırmak için -3 pozisyonunda adenin bulunan kozak dizisi (CCA) eklendi (84). Böylece NP1: 5' GG AAG CTT CCG CTA GCC CAC CAT GGC TTC TCT C 3' ve NP2: 5' GGG TCG ACT CAG TTG AGA AT 3' primerleri dizayn edildi.

#### 4.5. Toplam RNA izolasyonu

Vero hücreleri, sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu ile adsorbsiyon metoduyla infekte edildi. İnfeksiyonun 2. gününde virüse özgül sitopatik etki (CPE) olan sinsitallerin görülmeye başladığı gözlemlendi ve 5. günde sitopatolojik değişiklikler % 80'e ulaştı. Bu hücreler toplam RNA izolasyonu için kullanıldı.

Bu amaçla infekte Vero hücrelerinin üzerindeki vasat döküldü, 10 cm<sup>2</sup> hücre kültürü için 1 ml Tri-reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) bırakıldı ve hücreler bu solüsyonla resüspanse edilerek hücrelerin tamamının doku kültür kabının tabanından ayrılması sağlandı. Hücreler tamamen resüspanse edildikten sonra 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 12000 rpm 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün alt kısmındaki hücre peletine dokunmadan üst kısım alındı ve yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Beş dakika oda ısısında bekletildikten sonra tüplere 1 ml Tri-reagent için 0.2 ml kloroform eklendi; tüpler hızlı bir şekilde sallanarak 5 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra karışım 12000 rpm 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpte santrifüj sonunda üç ayrı faz oluştu. Tüpün alt kısmındaki kırmızı faz protein, orta faz DNA ve en üst renksiz olan faz RNA olarak ayrıştı. Renksiz olan üst fazdaki

RNA yeni steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. Bu tüplere birebir oranında isopropanol ilave edildi ve elle sallanarak 5 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra 12000 rpm 4°C'de 10 dakika santrifüj tekrarlandı. RNA pelet halinde mikrosantrifüj tüplerinin dibine çöktürüldü. RNA peleti % 80'lik soğuk etil alkol ile yıkanarak santrifüj tekrarlandı. Üst kısım dikkatlice uzaklaştırıldı ve pelet RNA 2 ml mutlak etil alkol ile sulandırılarak -20°C'de saklandı (89).

#### **4.6. Tersine transkripsiyon (Reverse Transkripsiyon)**

İzole edilen ve -20°C'de saklanan toplam RNA' dan 500 µl alınarak 5 µl (20 pmol/µl) geriye doğru olan nükleoprotein genine spesifik primer ile aynı mikrosantrifüj tüpüne kondu. Karışıma 3M sodyum-asetat (pH 5.4) 1/10 hacminde eklendi ve -20°C'de bir gece çöktürüldü. Çöktürme işleminden sonra 12000 rpm 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelet % 80'lik soğuk etil alkol ile yıkandı ve santrifüj tekrar edildi. Pelet 15 µl diethyl pyrocarbonate (DEPC) içeren su ile sulandırıldı. Karışım 90°C'deki suya bırakıldı ve ısı 37°C'ye düşüncüye kadar bekletildi. Karışıma reverse transkriptaz buffer (5X RT-buffer 6 µl, 5 mM dNTP 6 µl, MLV reverse transkriptaz enzimi 1.25 µl) 14 µl ilave edildi ve karışım 37°C'de 1 saat bekletildi. Karışıma bir saat sonra tekrar 1.25 µl MLV reverse transkriptaz enzimi ilave edilerek inkübasyon tekrarlandı. Elde edilen cDNA'lar PZR'de kullanılmak üzere -20°C'de saklandı (84).

#### **4.7. Nükleoprotein gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması**

RT-PCR ile elde edilen cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PZR'da [10 pmol primer, 1.25 mM dNTP (Promega), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 10X PCR

buffer (Promega), 2 IU Taq DNA Polimeraz (Promega)], 50 µl'lik PZR karışımı hazırlandı. 95°C'de 2 dakika ön ısıtmadan sonra, 94°C'de 1 dakika ayrılma, 44°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 5 dakika uzatma ile 32 döngüden oluşan ve 72°C'de 15 dakika son uzatma ile sonlanan PZR kuruldu. Çoğaltılan PZR ürününü görüntülemek için 50 ml Tris-asetat/EDTA elektroforez tamponu [TAE; 0.04 M Tris-asetat ve 0.001 M EDTA) içerisine 1 gr agaroz (Promega Co. Madison, WI, USA) ilave edilerek kaynatıldı] hazırlandı. Karışım 65°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0.5 µg/ml oranında etidyum bromid ilave edilerek agaroz jel donduruldu. Polimeraz zincir reaksiyon ürünleri jele 6X yükleme tamponu (% 0.25 bromfenol mavisi, % 40 sükröz) kullanılarak yüklendi. Örnekler daha sonra 150 volt akımda 30 dakika elektroforez edildi. Agaroz jele ultraviyole ışık kaynağında bakılarak beklenen büyüklükteki nükleoprotein geni görüntülendi (84).

#### **4.8. Nükleoprotein geninin agaroz jelden saflaştırılması**

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu nükleoprotein geni % 1'lik agaroz jelden ticari pürifikasyon kiti (Wizard PCR prep DNA Purification System, Promega Co. Madison, WI, USA) ile saflaştırıldı. Kısaca; % 1'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile ultraviyolede görüntülenen nükleoprotein geni bistürü ile kesilerek steril bir mikrosantrifüj tüpüne kondu. Üzerine 1 ml rezin ilave edildi ve 65°C'deki su banyosunda jel tamamen eriyinceye kadar beklendi. Mikrosantrifüj tüpündeki karışım steril bir enjektöre alındı ve enjektörün ucuna filtre takıldı. Enjektörün pistonu itilerek agarozun filtreden geçmesi, rezin ve DNA'nın ise filtrede tutulması sağlandı. Enjektöre daha sonra 2 ml % 80'lik isopropanol ilave edildi ve rezin-DNA

karışımı yıkandı. Filtre daha sonra steril bir mikrosantrifüj tüpüne takılarak 7000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda filtre başka bir steril tüpe takılarak, filtreye 60°C'deki steril dH<sub>2</sub>O'dan 30 µl ilave edildi ve oda ısısında 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süspansiyondaki DNA'nın tüpe geçmesi sağlanarak kullanılmıncaya kadar -20°C'de saklandı (76).

#### 4.9. DNA miktarının belirlenmesi

Steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırılan DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığını absorbe etmesine bağlı olarak ölçüldü. Nükleoprotein geni 1/50 sulandırıldı ve spektrofotometrede (Jasco V-530, Japonya) Optik Dansite (OD)<sub>260</sub>: 1 değeri ile çift sarmal DNA miktarını hesaplamada kullanılan 50 µg/ml değerine eş tutularak DNA miktarı belirlendi (84).

#### 4.10. RBOK NP geninin kesim enzimleri ile kesimi

Agaroz jelden saflaştırılan ve miktarı belirlenen NP geni *Hind*III kesim enzimi ile tek kesime tabi tutuldu. Nükleoprotein geninin *Hind*III enzimi ile kesimi için steril mikrosantrifüj tüpüne 30 µl NP DNA solüsyonu, 5 µl 10X kesim enzim solüsyonu (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA), 5 µl *Hind*III (10 u/µl), ve 10 µl steril dH<sub>2</sub>O eklendi. Kesim için karışım 37°C'de 1 gece bekletildi. Kesim ürünleri daha sonra steril dH<sub>2</sub>O ile 200 µl ye tamamlandı. Karışıma eşit miktarda fenolkloroform: kloroform: isoamilalkol (25:24:1) ilave edildi, 30 saniye vortekslendi ve 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısmı alınan tüplere 2 hacim (2X) soğuk mutlak etil alkol ve 1/10 oranında 3 M sodyum asetat (pH 5.4) ilave edildi. Daha sonra karışım vortekslenerek -20°C'de 1 gece çöktürmeye bırakıldı. Bu süre sonunda karışım 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi, üst kısım dökülerek NP DNA peleti % 70'lik soğuk etanolle yıkandı. Santrifüj sonrası, süpernatant alınarak pelet NP DNA kurutuldu. Nükleoprotein DNA'sı 40 µl steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı ve solüsyonun üzerine 5 µl 10X kesim enzim solüsyonu (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) ile 5 µl *Sa*I enzimi eklendi ve kesim için karışım 37°C'de 1 gece bekletildi. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek pürifiye edildi ve ligasyon işlemine kadar -20°C'de saklandı (84).

#### 4.11. Kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin hazırlanması

Bu çalışmada, kompetan hücre olarak *E.coli* hücrelerinin JM109 suşu kullanıldı. İlk olarak Lurie-Bertani (LB) katı besi yerine hücreler (1 lt dH<sub>2</sub>O'da 10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 10 gr NaCl ve 15 gr agar eritildi ve pH 7.4'e 5 M NaOH ile ayarlandı) tek nokta ekimi yapıldı. Ekim yapılan pleyt 37°C'de 16 saat bekletildi. Bu süre sonunda üreyen kolonilerden bir koloni öze ile alınarak 5 ml LB sıvı besi yerine (1 lt dH<sub>2</sub>O' da 10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 10 gr NaCl ve pH 7.4'e 5 M NaOH ile ayarlandı) ekildi ve 37°C'de sallayıcı üzerinde tutuldu. Sıvı besi yerinde üreyen hücreler 2 saat sonra 100 ml'lik sıvı besi yerine aktarıldı. İki saat sonra her yirmi dakikada bir hücrelerin üreme miktarlarını belirlemek için spektrofotometrede OD<sub>600</sub> değerinde absorbans ölçümleri yapıldı. Absorbans değeri 0.5 olduğu saatte, besi yerinde üreyen

bakteriler 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 3000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı boşaltıldı ve hücrelerin üzerine 40 ml steril RF1 çözeltisi (100 mM rubidyum klorid, 50 mM mangan klorid, 30 mM potasyum asetat, 30 mM kalsiyum klorid, % 15 gliserol ve glacial asetik asit ile pH 5.8'e ayarlandı) ilave edildi ve hücreler bu solüsyonla dikkatli bir şekilde resüspanse edildi. Karışım 20 dakika buz üzerinde bekletildi ve daha sonra 3000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım alındı ve 5 ml RF2 solüsyonu (10 mM MOPS, 10 mM rubidyum klorid, % 75 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, % 15 gliserol ve NaOH ile pH 6.8'e ayarlandı) hücrelerin üzerine ilave edildi. Resüspanse edilen hücreler buz üzerinde 15 dakika bekletildi. Hücreler daha sonra steril mikrosantrifüj tüplerine 100 µl olarak taksim edildi ve -80°C'de soğuk etil alkolde şok dondurma ile donduruldu. Hücreler etil alkolden alınarak transformasyonda kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı (84).

#### **4.12. pGEM-3Zf (-) plazmidinin *E.coli* hücrelerine transformasyonu**

Kompetan *E.coli* hücrelerine pGEM-3Zf (-) plazmidinden (1 µg/µl) 5 µl eklendi. Tüpler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra tüpler 42°C'de 90 saniye bekletilerek plazmid DNA'sının *E.coli* hücrelerine transformasyonu sağlandı. Hücrelerin üzerine 400 µl LB sıvı besi yeri ilave edildi ve 37°C'de sallayıcı üzerinde 1.5 saat sallandı. Bu süre sonunda üreyen hücreler 60 µg/ml ampisilin içeren LB katı besi yerine ekildi ve 37°C'de 16 saat bekletildi. Katı besi yerinde üreyen hücrelerden pGEM-3Zf (-) plazmid DNA'sı izole edildi (84).

#### 4.13. pGEM -3Zf (-) Plazmid DNA'sının izolasyonu

Ampisilinli katı besi yerinde *E.coli* hücrelerinin JM109 suşunda çoğalan pGEM-3Zf (-) plazmid DNA'sını izole etmek için pleytten tek koloni alınarak 60 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerine ekildi. Besi yeri 2 saat 37°C'de karıştırıcı üzerinde (250 siklus/dak) sallandı. Bu süre sonunda hücreler 60 µg/ml ampisilin içeren 37°C ısıdaki 100 ml LB sıvı besi yerine aktarılarak sallayıcı üzerinde 16 saat bekletildi. Daha sonra hücrelerden alkali lizis yöntemi ile plazmid DNA'sı elde edildi. Bunun için, sıvı besi yerinde üreyen hücreler 15 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sıvı besi yeri döküldü ve hücreler 1 ml STE çözeltisi (0.1 M NaCl, 10mM Tris.Cl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) ile resüspanse edildi. Karışım steril mikrosantrifüj tüplerine aktararak 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım alındı ve peletin üzerine 100 µl soğuk solüsyon I (50 mM glukoz, 25 mM Tris.Cl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0]) ilave edildi, pelet vortekslendi ve buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Peletin üzerine daha sonra yeni hazırlanan 200 µl hücre lizis solüsyon II (0.2N NaOH, % 1 SDS) ilave edildi ve yavaş bir şekilde sallandı. Solüsyon II ilave edildikten sonra karışım buz üzerinde yaklaşık 5 dakika bekletildi. Karışıma daha sonra 150 µl soğuk nötralizasyon solüsyonu olan solüsyon III (3M potasyum asetat, % 10 glacial asetik asit) ilave edildi, karışım sallandı ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Karışım 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere birebir oranında fenolkloroform: kloroform: isoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek 30 saniye vortekslendi. Santrifüj tekrarlandı ve üst kısım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere eşit

hacimde kloroform ilave edildikten sonra vortekslenme tekrarlandı. Santrifüjü takiben üst kısım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere daha sonra 5 µl DNase bulundurmeyen pankreatik RNase (10 µg/µl) ilave edildi ve su banyosunda 37°C'de 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda tüplere eşit hacimde fenolkloroform: kloroform: isoamilalkol (25:24:1) ilave edildi ve 30 saniye vortekslendi. Santrifüj sonrası üst kısım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere eşit hacimde kloroform ilave edildi. Karışım 30 saniye vortekslendi ve santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısım alındı ve tüplere 2 hacim soğuk mutlak etil alkol ve 1/10 oranında 3 M sodyum asetat (pH 5.4) ilave edildi. Karışım vortekslendi ve -80°C'de 1 saat çöktürmeye bırakıldı. Bu süre sonunda tüpler 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi ve DNA peleti % 70'lik soğuk etanolle yıkandıktan sonra kurutuldu. Plazmid DNA'sı 100 µl steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı. DNA miktarı OD<sub>260</sub> nm dalga boyunda belirlendi. Miktarı belirlenen DNA'nın *Hind*III ve *Sal*I kesim enzimleri ile kesim işlemi yapıldı. Elde edilen plazmid DNA'sı agaroz jelden pürifiye edildi, 20 µl steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı ve -20°C'de ligasyon için saklandı (84).

#### 4.14. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin oluşturulması

Pürifiye SV-RBOK-NP geni ile klonlama vektörü pGEM-3Zf (-) *Hind*III ve *Sal*I enzimleri ile kesildikten sonra T4 DNA ligaz enzimi ile gen/vektör oranı 3:1 olacak şekilde ligasyona bırakıldı. Ligasyonda kullanılan gen ve vektörün miktarını belirlemede;

Genin miktarı: (gen büyüklüğü/vektör büyüklüğü) x (gen/vektörün molaritesi) x vektörün miktarı, formülü kullanıldı.

Bu formüle göre 60 nanogram plazmid DNA'sı için yaklaşık olarak 90 nanogram nükleoprotein geni kullanıldı. Ligasyon 15 µl üzerinden yapıldı. Ligasyon karışımı 5 µl NP gen, 2 µl plazmid DNA, 1.5 µl 10X bakteriofaj T4 DNA ligaz tamponu (200 mM Tris.Cl [pH 7.6], 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM dithiotreitol ve 500 µg/ml sığır serum albümini; Promega Co. Madison, WI, USA), 2 µl T4 DNA ligaz (3 unit/µl) (Promega Co. Madison, WI, USA) enzimi ve 4.5 µl nükleaz bulunmayan steril distile su eklenerek hazırlandı. Ligasyon karışımı 16°C'de 12 saat bekletildi (84).

#### **4.15. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin seçilmesi**

Ligasyon ürünleri daha önceden belirtilen yöntemle *E.coli* JM109 hücrelerine 3 µl, 5 µl ve 7 µl olacak şekilde transforme edildi. Transforme hücreler 60 µg/ml ampicilin içeren katı besi yerine ekildi.

Rekombinant plazmidi içeren hücrelerin seçimi isopropylthio-β-D-galaktoside (IPTG) ve 5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galaktoside (X-gal) içeren katı besi yerinde yapıldı. Bu amaçla, LB katı besi yerine 40 µl X-gal solüsyonu (20 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) yayıldı ve 15 dakika bekletildi. Daha sonra 100 µl IPTG solüsyonu (200 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) LB katı besi yerine yayıldı ve 37°C'de 15 dakika bekletildi.

Transforme *E.coli* hücrelerinden daha fazla beyaz koloni elde etmek için sıvı besi yerinde üreyen hücreler 1000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek hücre peleti 100 µl LB sıvı besi yeri ile resüspanse edildi. Bu hücreler daha sonra LB katı besi yerine yayıldı. Lurie-Bertani katı besi yeri 37°C'de 16 saat bekletildi ve bu süre sonunda görülen beyaz koloniler PZR-

tarama (PZR-T) ve pGEM-SV-NP plazmid DNA'sının izolasyonunda kullanıldı (84).

#### **4.16. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tarama Deneyi (PZR-T)**

Transformasyon sonrası oluşan beyaz kolonilerde nükleoprotein genini içeren rekombinant plazmidleri belirlemek için PZR-T deneyi yapıldı. Kısaca, ampisilinli katı besi yerindeki kolonilerin her birine ayrı numaralar verildi. Daha sonra steril kürdanın ucu numaralandırılmış kolonilere dokundurularak bir başka ampisilinli katı besi yerine aktarıldı. Kürdanın ucu tekrar koloniye dokundurularak 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2 µl 10X PCR buffer (Promega), 3 µl 1.25 mM dNTP, 4 µl 10 pmol/µl nükleoprotein genine özgül primer ve 4 µl dH<sub>2</sub>O içeren PZR karışımına değdirildi. Karışım 95°C'de 10 dakika ön ısıtmaya tutuldu. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımının bulunduğu ependorfların içine kısa bir santrifüjden sonra, karışıma 1 IU Taq polimeraz (Promega) eklendi ve 50 µl mineral yağ damlatıldı. Polimeraz zincir reaksiyon-tarama programı 95°C'de 5 dakika ön ısıtma, 94°C'de 1 dakika ayrılma, 55°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzatma olacak şekilde 25 döngü olarak düzenlendi. Polimeraz zincir reaksiyon ürünleri % 1.5' lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi (84).

#### **4.17. Rekombinant pGEM-SV-NP plazmid DNA'sının izolasyonu**

Elde edilen beyaz koloniler öze yardımı ile alınarak 60 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerine ekildi. Besi yeri 37°C'de sallayıcı üzerinde 16 saat bekletildi. Üreyen hücrelerden plazmid DNA'sı alkali lizis yöntemi ile daha

önce belirtildiği gibi elde edildi. Plazmid DNA'larına *NheI* ve *HindIII-SalI* enzim kesim deneyleri yapıldı. Kesim ürünleri % 1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile görüntülendi (84).

#### 4.18. Rekombinant pSV-NP plazmidinin oluşturulması

Rekombinant pSV-NP plazmidini oluşturmak için pGEM-SV-NP plazmidini *NheI-SalI* kesim enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülendi ve yaklaşık 1575 nükleotid uzunluğundaki NP geni agaroz jelden pürifiye edildi. Pürifiye NP geni -20°C'de saklandı.

Ökaryotik açıklama plazmidini olarak seçilen pCI-neo vektörü *E.coli* JM109 hücrelerine transforme edildi ve LB katı besi yerine ekildi. Katı besi yerinde üreyen hücrelerden tek koloni alınarak LB sıvı besi yerine ekildi ve 37°C'de 16 saat bekletildi. Üreyen hücrelerden pCI-neo plazmid DNA'sı elde edildi ve 100 µl steril dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı. Plazmid DNA miktarı spektrofotometrede belirlendi.

Plazmid DNA *NheI* ve *SalI* kesim enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülendi ve yaklaşık 5430 nükleotid uzunluğundaki plazmid DNA'sı agaroz jelden pürifiye edildi. Pürifiye plazmid DNA'sının miktarı spektrofotometrede ölçülerek -20°C'de saklandı.

Pürifiye pCI-neo plazmid DNA'sının klonlama bölgesine sıgır vebası virüsü RBOK aşısı suşu nükleoprotein geni, bakteriofaj T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak gen/plazmid oranı 3:1 olacak şekilde ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünleri *E.coli* JM109 hücrelerine transforme edildi. Transforme hücreler 60 µg/ml ampisilin içeren LB katı besi yerinde 37°C'de 16 saat bekletildi (84).

Bu süre sonunda üreyen kolonilerde rekombinant plazmidlerin varlığını belirlemek için PZR-T, PZR ve enzim kesim deneyleri yapıldı.

#### **4.19. Rekombinant pSV-NP vektörünün Vero hücrelerine transfeksiyonu**

Bu çalışmada transfeksiyon için Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri (Vero) kullanıldı.

Rekombinant pSV-NP plazmid DNA'sı alkali lizis yöntemi ile elde edildi. Plazmid DNA'sının miktarı ve saflığı OD<sub>260</sub>: OD<sub>280</sub> absorpsiyon değerinde belirlendi. Bu DNA'nın Vero hücrelerine Transfast™ Transfection Reagent (Promega Co. Madison, WI, USA) vasıtasıyla geçici transfeksiyonu yapıldı. Kısaca; transfeksiyondan bir gün önce Transfast™ Reagent ([+]-N, N[bis(2-hydroxyethyl)]-N methyl -N-[2;3 di (tetradecanoyloxy) propyl] amonium iodide, nötral lipid DOPE] oda ısısında çözdürüldü ve 400 µl nükleaz bulundurmayan su ile molaritesi 1 mM olacak şekilde sulandırıldı ve vortekslendi. Karışım daha sonra -20°C'de 1 gece bekletildi. Daha sonra plazmid DNA'sı ve Transfast karıştırılarak karışım 15 dakika oda ısısında bekletildi. Bu sırada hücre üretme kaplarındaki vasat boşaltıldı ve hücreler steril 1X fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS; 1 lt dH<sub>2</sub>O'da 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.15 gr Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub> ve 1.15 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözdürüldü ve otoklavda steril edildi) ile yıkandı. Daha sonra transfeksiyon karışımı hücrelere ilave edildi. Hücreler 37°C'de 1 saat bekletilerek hücre üretme vasatı ilave edildi. Transfekte hücreler 72 saat 37°C'de bekletildi (76).

#### **4.20. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması**

Tek tabaka oluşturan Vero-pCI-neo ve Vero-pSV-NP doku kültür kaplarındaki vasat dökülerek hücreler PBS ile yıkandı. Doku kültür kabına 5 ml steril PBS ilave edilerek hücreler steril bir hücre kazıyıcı ile kaldırıldı. Karışım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst kısım alındı ve hücre peletinin üzerine 200 µl jel yükleme solüsyonu (100 mM Tris.Cl pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, % 4 sodyum dodesil sulfat [SDS], % 0.2 bromfenol blue, % 20 gliserol) eklendi. Aynı işlemler Vero-pCI-neo hücreleri içinde uygulanarak numuneler 5 dakika kaynatıldı (84).

#### **4.21. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) deneyi**

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için standart yığınlayıcı jel (stacking) ve çözdürücü jel (resolving) prosedürü uygulandı. 20x20x5 ebatlarındaki elektroforez kasetine % 10'luk çözdürücü jel (% 30 akrilamid-bisakrilamid, 1 M Tris pH 6.8, % 10 SDS, % 10 amonyum persülfat, TEMED, dH<sub>2</sub>O) döküldü. Çözdürücü jel üzerine polimerizasyonu sağlamak ve jelin hava ile temasını kesmek için 2 ml bütanol ilave edildi. Jelin polimerizasyonu için 30 dakika beklendi Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol dökülerek jelin yüzeyi distile su ile yıkandı. Örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması için elektroforez kasetine tarak yerleştirildi. Daha sonra yığınlayıcı jel (% 30 akrilamid-bisakrilamid, 1.5 M Tris pH 8.8, % 10 SDS, % 10 amonyum persülfat, 50 µl TEMED [ N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine], hazırlandı ve çözdürücü jel üzerine döküldü. Polimerizasyon için 30 dakika

beklendi. Tarak çıkarıldı ve kuyucuklar iyice yıkanarak jel parçacıklarının uzaklaştırılması sağlandı. Elektroforez alt ve üst kısımları 1X Tris-glycine elektroforez buffer (25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3, % 0.1 SDS) ile dolduruldu. Vero, Vero-SV-RBOK, Vero-pCI-neo ve Vero-pSV-NP ile moleküler ağırlık markeri (Sigma, SL, USA) 1X SDS yükleme solüsyonu (50 mM Tris.Cl pH 6.8, 100 mM dithiothreitol [DTT], % 2 SDS, % 0.1 bromophenol blue, % 10 glycerol) ile sulandırıldı ve örnekler 100°C'de 3 dakika kaynatıldı. Kuyucuklara örnekler 40 µl, moleküler ağırlık markeri ise 5 µl yüklendi. Elektroforez işlemi 150 Volt akımda 8 saatte gerçekleştirildi (84).

#### **4.22. Vestern immunoblotting (İmmunblotlama) deneyi**

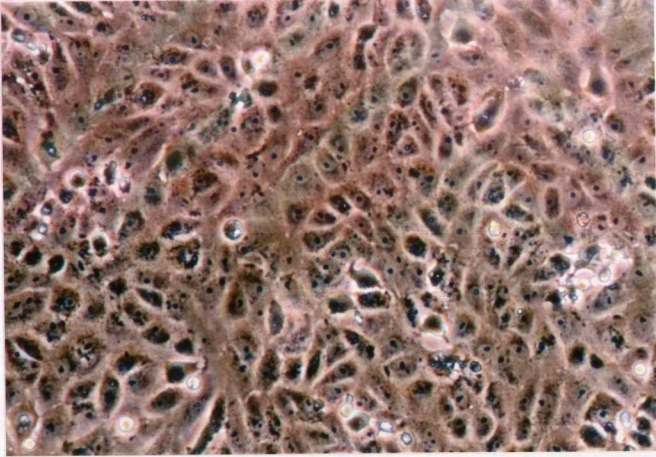
Örneklerin nitroaselülöz membrana transferi için standart protokol uygulandı (84). Yığılayıcı jel kesilerek atıldı. Çözdürücü jel ile aynı ölçülerde olan nitroaselülöz membran (Sigma, USA) ve altı adet Whatman 3MM kurutma kağıdı kesildi. Nitroaselülöz membran distile suda, kurutma kağıtlarının iki tanesi Anot I solüsyonu (0.3 M Tris pH 10.4, % 20 methanol), iki tanesi Anot II solüsyonu (0.025 M Tris pH 10.4, % 20 methanol) ve diğer iki tanesi ise katot solüsyonunda (0.025 M Tris pH 9.4, % 20 methanol) 10 dakika bekletildi. Jeldeki proteinlerin nitroaselülöz membrana transferi Semi-Dry sisteminde (IMM-Semi-Dry Blotter, W. E. P., Comp., USA.) sırası ile anottan katota doğru; Anot I ve Anot II solüsyonlarında bekletilen kurutma kağıtları, nitroaselülöz membran, jel ve katot solüsyonunda bekletilen kurutma kağıdı konularak gerçekleştirildi. Transfer işleminin bitiminde moleküler renkli ağırlık markerinin bulunduğu şerit kurutuldu ve saklandı. Nitroaselülöz membran sulandırma solüsyonu (% 0.02 Tween-20

içeren PBS) ile sulandırılan % 5'lik yağsız süt tozu ile 37°C'de 2 saat bekletilerek bloklama yapıldı. Bloklama sonrası membran % 0.01 Tween-20 içeren PBS ile yıkandı. Membran, sığır vebası virüs antikor pozitif olan ve PBS ile 1/50 oranında sulandırılan 10 ml serumda 37°C'de 2 saat bekletildi. Primer serum daha sonra dökülerek membran, yıkama solüsyonu (% 0.01 Tween-20 içeren PBS) ile beşer dakika aralıklarla yıkandı. Yıkamayı takiben membranlar 1/1000 oranında sulandırılan Anti-bovine IgG-peroksidaz konjuge (Sigma, USA) serumda 37°C'de 2 saat bekletildi. Membranlar karanlık bir ortamda 15 ml kromojen-substrat eriyiğinde (0.05 M Tris pH 7.6 içerisinde 0.5 mg/ml di amino benzidine "DAB" [Sigma, USA] eritildi, süzöldü ve kullanımdan hemen önce 25 µl % 20 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi) 10 dakika bekletildi. Reaksiyon dH<sub>2</sub>O ilave edilerek durduruldu ve görüntüleme işlemi tamamlandı (84).

## 5. BULGULAR

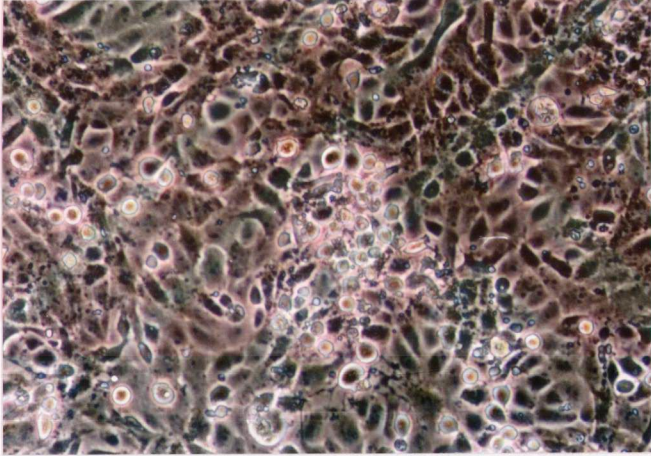
### 5.1. Vero hücrelerinin sığır vebası virüsü ile infeksiyonu

Vero hücreleri 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre üretme kaplarına ekilerek % 70-80 oranında tek tabaka haline geldiğinde sığır vebası virüsü RBOK aşı suşu (SV-RBOK) ile adsorbsiyona bağlı yöntemle infekte edildi. Ayrıca infekte edilmeyen Vero hücresi kontrol hücre olarak kullanıldı (Şekil 1).



Şekil 1. SV-RBOK aşı suşu ile infekte olmayan kontrol Vero hücreleri (100X).

Paramiksovirüslerle özgül olan sitopatolojik değişiklikler ve sinsitialar enfeksiyonun ikinci gününden itibaren görülmeye başlandı. Enfeksiyonun 5. gününde tek tabaka olan hücrelerin % 70-80'inde sinsitialar belirlendi (Şekil 2).



**Şekil 2.** SV-RBOK aşı suşu ile infekte Vero hücrelerinde enfeksiyonun 5. gününde oluşan sinsitiaların görünümü (100X).

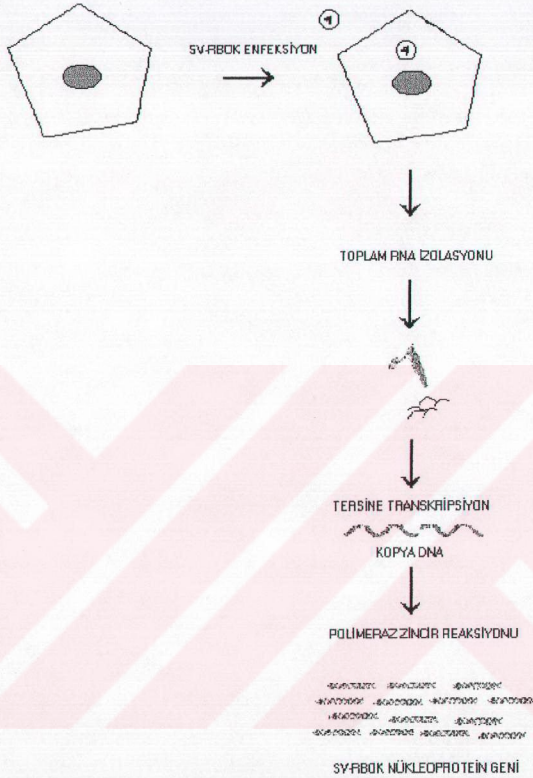
## 5.2. Tersine transkripsiyon ve PZR

Sığır vebası virüsü RBOK aşısı ile infekte hücrelerden elde edilen toplam RNA'lerden, nükleoprotein geninin geriye doğru olan özgül primerleri kullanılarak cDNA'lar elde edildi. Elde edilen cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı ve yaklaşık 1575 nükleotid uzunluğunda nükleoprotein geni % 1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi (Şekil 3 hat 1).



**Şekil 3.** % 1.5'lik agaroz jelde nükleoprotein geninin görünümü. Hat 1: PZR ile çoğaltılan 1575 nükleotid uzunluğundaki nükleoprotein geni. Hat 2: Lambda DNA *EcoRV/HindIII* markeri.

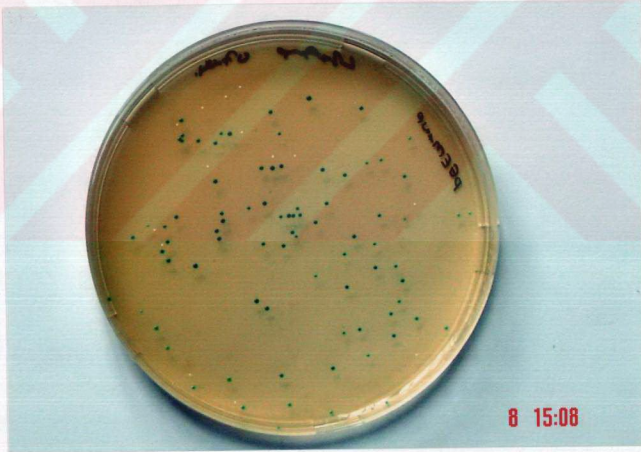
Bu aşamaya kadar olan basamaklar Şekil 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Sığır vebası virüsü ile Vero hücrelerinin infeksiyonu, toplam RNA'ların elde edilmesi, tersine transkripsiyon ve PZR ile Nükleoprotein geninin çoğaltılması.

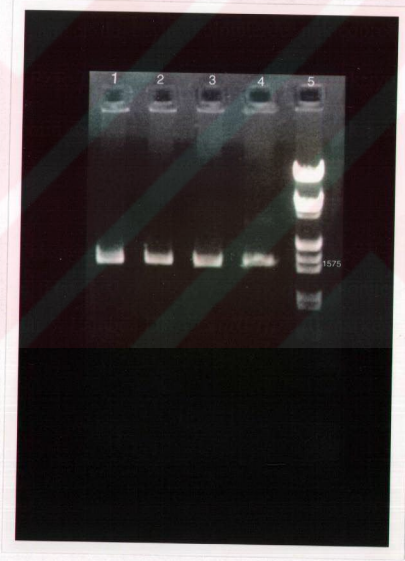
### 5.3. SV-RBOK-NP geninin pGEM-3Zf (-) plazmidinde klonlanması

Nükleoprotein geninin pGEM-3Zf (-) klonlama vektörüne ligasyonu ve ligasyon ürünlerinin *E.coli* hücrelerine transformasyonundan sonra rekombinant plazmidleri belirlemek amacı ile kolonilere mavi-beyaz seçimi yapıldı (Şekil 5).



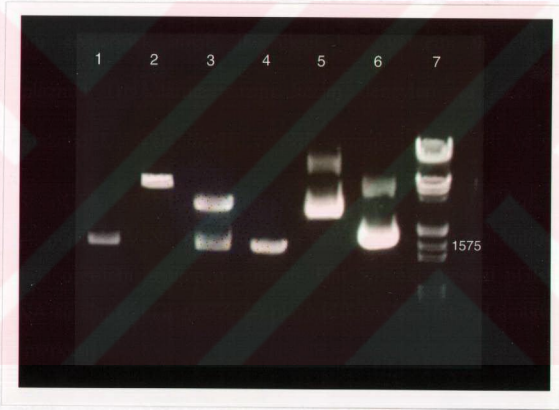
**Şekil 5.** Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidlerinin *E.coli* hücrelerine transformasyonundan sonra kolonilerin mavi-beyaz renk seçimi ile gösterilmesi. Beyaz koloniler pGEM-SV-NP plazmidleri, mavi koloniler ise pGEM-3Zf (-) plazmidlerini içeren *E.coli* hücreleri.

*Escherichia coli* hücrelerine transforme edilen rekombinant plazmidlerde NP genini belirlemek amacı ile beyaz kolonilerde nükleoprotein genine özgül primerler kullanılarak PZR-T yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu-tarama deneyi sonucunda 1575 nükleotid uzunluğundaki NP geni % 1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi (Şekil 6).



**Şekil 6.** % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant pGEM-SV-NP plazmidlerinin PZR-T ile gösterilmesi. Hat 1, 2, 3, PZR-T ile pozitif koloniler. Hat 4: Pürifiye SV-RBOK-NP geni. Hat 5: Lambda DNA *EcoRI/HindIII* marker.

Polimeraz zincir reaksiyonu-tarama yapılan kolonilerde nükleoprotein geninin varlığını göstermek amacı ile alkali lizis yöntemi ile elde edilen rekombinant plazmid DNA'larına enzim kesim deneyleri ve PZR yapıldı. Rekombinant plazmid DNA'sı *Hind*III ve *Sal*I enzimleri ile kesildi ve yaklaşık 1575 nükleotid uzunluğundaki SV-RBOK-NP geni % 1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi (Şekil 7, hat 3).



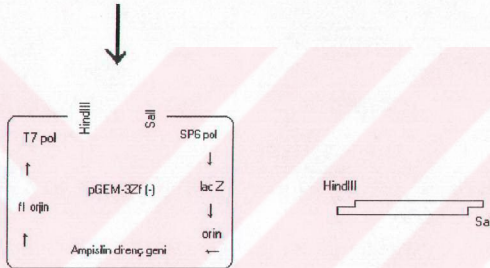
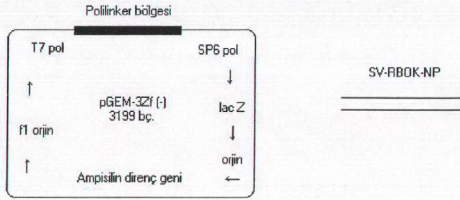
**Şekil 7.** % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant plazmid pGEM-SV-NP'nin enzim kesim deneyleri ve PZR ile doğrulanmasının görünümü. Hat 1: pürifiye SV-RBOK-NP geni. Hat 2: pGEM-SV-NP plazmid DNA'sının *Nhe*I enzimi ile kesimi. Hat 3: pGEM-SV-NP plazmid DNA'sının *Hind*III ve *Sal*I enzim kesimleri. Hat 4: pGEM-SV-NP plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PZR ile çoğaltılan nükleoprotein geninin görünümü. Hat 5: Rekombinant pGEM-SV-NP plazmid DNA'sı. Hat 6: pGEM-3Zf (-) plazmid DNA'sı. Hat 7: Lambda DNA *Eco*RI/*Hind*III markeri.

Ayrıca pGEM-3Zf (-) klonlama vektöründe herhangi bir bölgeyi tanımayan fakat NP1 primerinin 5' ucuna yerleştirilen *NheI* enzimi ile kesim sonrasında rekombinant plazmidin beklenildiği gibi linear bir yapıda açıldığı % 1.5'lik agaroz jelde etidyum bromid boyama ile gösterildi (Şekil 7, hat 2).

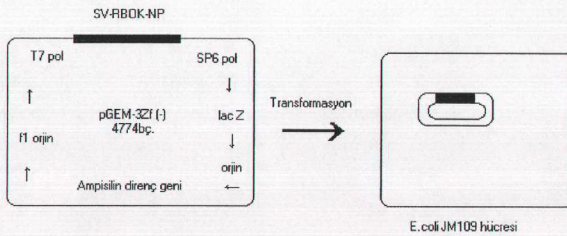
Rekombinant plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı NP genine özgül primerler ile yapılan PZR'da yaklaşık 1575 nükleotid uzunluğundaki nükleoprotein geni % 1.5'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 7, hat 4).

Klonlama vektörü olarak seçilen pGEM-3Zf (-) plazmidi 3199 nükleotid uzunluğunda olup 1575 baz çifti uzunluğundaki nükleoprotein geninin ligasyonu sonucunda oluşan rekombinant plazmidin 4774 nükleotid büyüklüğe ulaştığı gösterildi (Şekil 7, hat 5). Oluşturulan rekombinant plazmid pGEM-SV-NP olarak isimlendirildi.

Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinin oluşturulma aşamaları Şekil 8'de şematize edilmiştir.



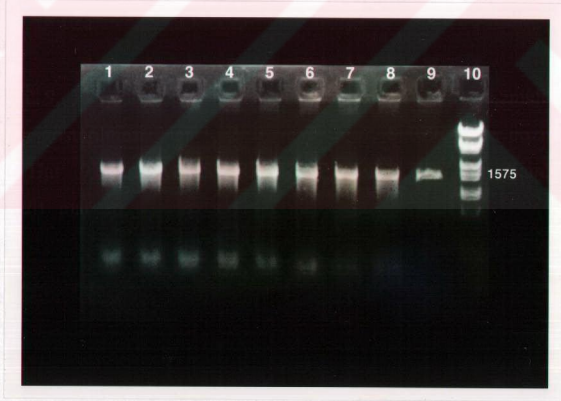
Ligasyon



Şekil 8. Rekombinant plazmid pGEM-SV-NP'nin oluşturulması

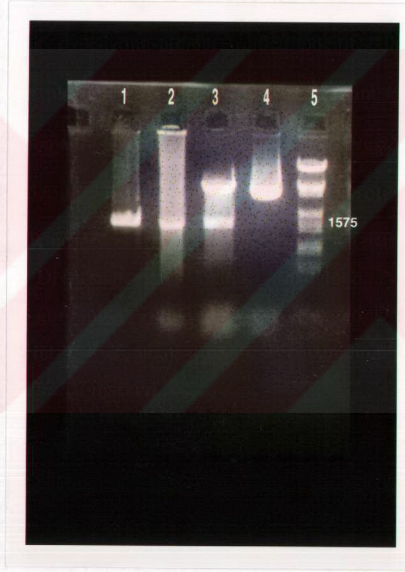
#### 5.4. SV-RBOK-NP geninin pCI-neo vektöründe klonlanması ve açıklanması

Rekombinant pGEM-SV-NP plazmidinden *NheI* ve *SaII* enzimleri ile çıkarılan nükleoprotein geninin pCI-neo açıklama vektörüne ligasyonu ve bu ligasyon ürünlerinin *E.coli* hücrelerine transformasyonundan sonra rekombinant plazmidleri belirlemek amacı ile kolonilere nükleoprotein genine özgül primerler kullanılarak PZR-T yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu-tarama deney sonucunda 1575 nükleotid uzunluğundaki NP geni % 1.5'lik agaroz jelde gösterildi (Şekil 9).



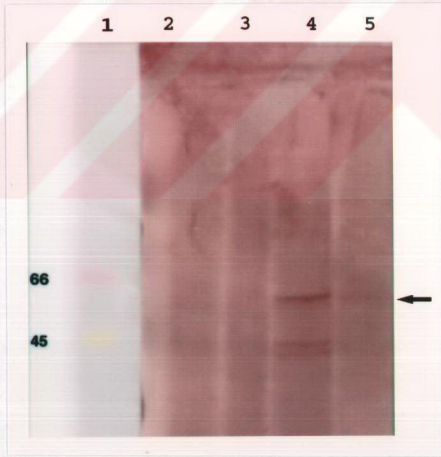
**Şekil 9.** % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant pSV-NP plazmidinin PZR-T sonuçlarının gösterilmesi. Hat 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 PZR-T ile pozitif bulunan koloniler. Hat 9: Pürifiye SV-RBOK-NP geni. Hat 10: Lambda DNA *EcoRI/HindIII* markeri.

Polimeraz zincir reaksiyonu-tarama sonucu pozitif bulunan kolonilerden alkali lizis yöntemi ile plazmid DNA'sı elde edilerek enzim kesim deneyleri ve PZR yapıldı. Rekombinant plazmid DNA'sının *NheI* ve *SaI* enzimleri ile kesiminde yaklaşık 1575 nükleotid uzunluğunda nükleoprotein geni % 1.5'lik agaroz jelde gösterildi (Şekil 10, hat 3). Nükleoprotein geninin ligasyonu ile rekombinant plazmidin 7047 nükleotid büyüklüğünde olduğu % 1.5'lik agaroz jelde belirlendi (Şekil 10, hat 4). Rekombinant plazmid pSV-NP olarak isimlendirildi.

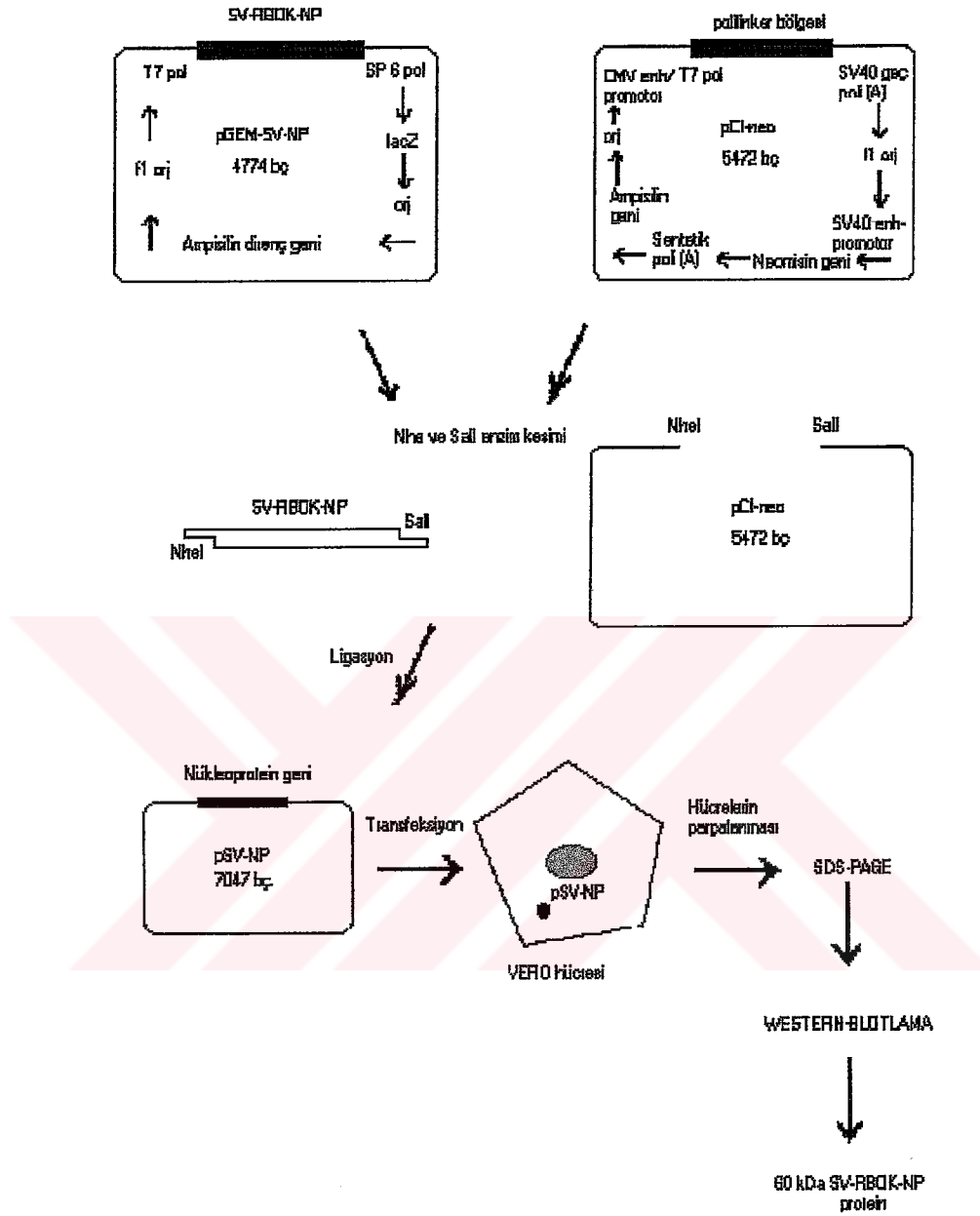


**Şekil 10.** % 1.5'lik agaroz jelde rekombinant pSV-NP plazmidinin enzim kesim deneyleri ve PZR ile gösterilmesi. Hat 1: Pürifiye SV-RBOK-NP geni. Hat 2: pSV-NP plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PZR ile çoğaltılan nükleoprotein geninin görünümü. Hat 3: pSV-NP plazmid DNA'sının *NheI* ve *SaI* enzim kesimleri. Hat 4: Rekombinant pSV-NP plazmidinin görünümü. Hat 5: Lambda DNA *EcoRI/HindIII* markeri.

Rekombinant pSV-NP plazmidinin oluşturulması teyit edildikten sonra NP proteinin açıklatılması için transfeksiyon çalışması yapıldı. Bunun için Vero hücrelerine, pCI-neo ve rekombinant plazmid pSV-NP geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra pSV-NP ile geçici transfekte Vero hücre lizatlarında yapılan Vestern immunoblot analizlerinde, hücrelerin 60 kDa moleküler ağırlığındaki nükleoproteini açıkladığı görüldü (Şekil 11, hat 5). Kontrolümüz pCI-neo plazmidini ve SV-RBOK infeksiyonlarının hücre lizatlarında yapılan Vestern immunoblot analiz sonuçları ile kıyasladığımızda infekte hücre lizatlarında 60 kDa moleküler ağırlığındaki nükleoprotein belirgin bir bant halinde gözlemlendi. Bununla beraber pCI-neo plazmidinin transfekte edildiği hücrelerde ise bu moleküler ağırlıkta bir protein açıklanmadığı belirlendi (Şekil 11, hat 3).



**Şekil 11.** Vero-pSV-NP hücre proteinlerinin Vestern immunoblotlama ile gösterilmesi. Hat 1: Renkli marker. Hat 2: Vero hücresi. Hat 3: Vero-pCI-neo. Hat 4: İnfekte Vero hücresi. Hat 5: Vero-pSV-NP hücresi.



**Şekil 12.** Rekombinant plazmid pSV-NP'nin oluşturulması, Vero hücrelerine transfeksiyonu ve Vestern immunoblot ile gösterilmesi.

## 6. TARTIŞMA

Bu çalışmada sığır vebası virüsü RBOK aşısı suşu nükleoprotein geninin (SV-RBOK-NP) klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanması rapor edilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında SV-RBOK-NP geni pGEM-3Zf (-) klonlama vektörüne yerleştirilerek *E.coli* JM109 hücrelerinde klonlandı. İkinci aşamada SV-RBOK-NP geninin açıklama vektörüne yerleştirilmesi ve memeli hücrelerine transfekte edilmesi gerçekleştirildi. Transfeksiyon sonucu 60 kDa moleküler ağırlığındaki SV-RBOK-NP geninin açıklanması Western immunoblot deneyi ile gösterildi.

Sığır vebası virüsü nükleoprotein geninin klonlanması ilk olarak Kamata ve arkadaşları tarafından 1991 yılında gerçekleştirilmiştir. Nükleoprotein geninin klonlanmasından sonra prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde açıklanması çalışmaları yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda ise sığır vebası virüsü saha izolatları ve diğer morbillivirüs NP gen dizilimleri belirlenerek DNA dizilim karşılaştırmaları yapılmıştır (48, 49, 50, 55).

Sığır vebası infeksiyonları akut salgınlara neden olması ve yüksek mortalite ile seyretmesinden dolayı büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Hastalığın 2010 yılına kadar bütün dünyadan tamamen eradike edilmesi FAO (Foot and Mouth Organization) tarafından planlanmaktadır (6, 100). Bu mücadelenin ilk adımında infeksiyonun endemik olarak görüldüğü bölgelerde aşılama yapmak, daha sonraki adımında ise aşılamanın tamamen ortadan kaldırılması yer almaktadır (6). Sığır vebası infeksiyonunun etkili bir şekilde kontrolü ve eliminasyonu için infekte ve aşıları hayvanların serolojik olarak ayırt edilmesi önemli bir adımdır (100). Sığır vebası infeksiyonlarına karşı kullanılan

aşı, doku kültüründe zayıflatılmış canlı (attenüe-canlı) aşılardır. Bu aşilar enfeksiyona karşı etkin bir koruma sağlamasına rağmen ısıya karşı oldukça hassastır ve aşılarn üretimi pahalıdır. Bu aşılarn Afrika ve Asya'nın sıcak bölgelerinde kullanımı oldukça zordur (12, 48, 94). Günümüzde rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler ile sığır vebası virüsünün hemaglutinin ve füzyon glikoproteinlerine yönelik hazırlanan aşilar ile enfeksiyona karşı tam bir koruma sağlanmaktadır (79, 85). Ancak rekombinant aşilar ile aşılamalarda bir endemi esnasında infekte ve aşılı hayvanların teşhisi yapılamamaktadır. Nükleoprotein belirlenmesi infekte ve aşılı hayvanların ayırımında kullanılmaktadır. Ayrıca kızamık ve sığır vebası enfeksiyonlarında serumda ilk görülen antikor anti-nükleoprotein antikorları olması nedeni ile de NP' nin varlığı hastalığın hızlı bir şekilde teşhisine imkan kılmaktadır (1, 40, 48, 49, 69).

Sığır vebası enfeksiyonlarının teşhisinde agar jel immuno difüzyon (AGID), counter immuno elektrophesis (CIEP), nükleokapsidlerin elektroforezdeki hareketleri, indirek yada pasif hemaglutinasyon, RT-PCR, immün floresans, immün peroksidaz boyama, kompleman fiksasyon ve serum-nötralizasyon deneyleri kullanılmaktadır (27, 55, 57). Bu deneyler arasında en güvenilir yöntemlerden birisi serum nötralizasyon deneyidir. Ancak serum nötralizasyon deneyi bazı dezavantajlara sahiptir. Bunlar; doku kültürü ile steril test örneklerine ihtiyaç duyması, sahada uygulanmasının zorluğu ve deneyimli bir personele ihtiyaç duyması ile zaman alıcı olmasıdır (27, 48). Kızamık ve sığır vebası enfeksiyonlarında serumda ilk görülen antikor anti-nükleoprotein antikorlarıdır ve nükleoprotein ile hazırlanan tanısal kitlerde teşhis daha çabuk

yapılabilmekte, infekte ve aşılı hayvanların ayırt edilmesi doğru bir şekilde gerçekleştirilmektedir (44, 48, 49).

Virüslerin internal proteinleri humoral immun yanıt oluşturmak yerine hücresele immun yanıt uyarmaktadır. Kızamık ve sığır vebası infeksiyonlarında nükleoprotein çok fazla sentezlenmekte ve hücresele immun sistemi uyarmaktadır (33, 40, 44, 48, 70, 83). Bununla beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda nükleoprotein ile hazırlanan rekombinant aşuların hayvanları infeksiyona karşı korumadığı gösterilmiştir (67, 70, 85). Rekombinant DNA teknolojisini kullanarak sığır vebası virüsü nükleoprotein, hemaglütinin ve füzyon proteinlerinin antijenik bölgelerinden oluşan bir aşı ile infeksiyonlara karşı daha etkin koruma sağlanabileceği düşünülmektedir (40, 70).

Morbillivirüs sınıfında bulunan kızamık virüsü nükleoproteini, B hücrelerinin FcγRII reseptörlerine bağlanmakta ve böylece virüse karşı oluşacak olan immunglobulin sentezini inhibe etmektedir (35, 77). Sığır vebası virüsü NP geninin böyle bir fonksiyonunun olup olmadığı tam olarak aydınlatılmamıştır. Rekombinant NP proteinin üretimi ile bu proteinin humoral immun sistem üzerindeki etkilerini çalışmak kolaylaşacaktır.

Kızamık virüsü NP plazmid DNA'sı ile yapılan immunizasyon çalışmalarında IgG2a üretiminin şekillendiği bildirilmiştir. IgG2a immun sistemin önemli bir üyesi olan kompleman sisteminin hem alternatif hem de klasik yolunu aktive etmektedir (16). Sığır vebası virüsünün NP-DNA immunizasyonları bugüne kadar yapılmamıştır. Daha sonraki çalışmalarda NP-DNA immunizasyonlar yapılarak infeksiyonlara karşı koruma etkinliği araştırılması sağlanmış olacaktır.

Sığır vebası virüsü NP geni üzerinde yapılan çalışmalarda genel olarak immunizasyon ve teşhise yönelik kitlerin hazırlanması ön plana çıkmıştır. Bu amaç için prokaryotik ve ökaryotik açıklama vektörlerinde üretilen yüksek miktarlardaki NP proteini ile aşılama ve teşhis çalışmaları yapılmıştır (48, 55).

Sığır vebası virüsü ve küçük ruminant veba virüslerinin ayırıcı teşhislerinde spesifik anti-serum, nükleokapsidlerin elektroforez hareketleri yada radyoaktif olarak işaretli NP cDNA'lar kullanılmaktadır. Bu metotlardan serum nötralizasyon ve nükleokapsidlerin elektroforez hareketlerini belirlemek için canlı virüse ihtiyaç duyulmaktadır. Radyoaktif olarak işaretlenmiş cDNA problemleri ise yarı ömrünün kısa olması, insan sağlığı için zararlı olması ve her laboratuarda kullanım alanı olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır (27, 57, 72). Son yıllarda moleküler tekniklerin ilerlemesinden sonra virüslerin internal proteinleri prokaryotik ve ökaryotik açıklama vektörlerinde üretilerek viral infeksiyonların teşhisinde kullanılmaktadır. İnfluenza (Inf), lymphocytic choriomeningitis virus (LCV), lassa fever (LV), kuduz (RV) ve kabakulak (MV) viral infeksiyonlarının teşhisi internal protein olan nükleoprotein ile hızlı bir şekilde yapılmaktadır (48). Sığır vebası virüsü nükleoproteini prokaryotik ve ökaryotik açıklama vektörlerine yerleştirilerek açıklanmıştır (48, 55, 67). Hem prokaryotik hem de ökaryotik açıklama vektörlerinin açıkladığı nükleoprotein kullanıldığı enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) deneyleriyle sığır vebası infeksiyonlarının teşhisi yapılabilmektedir (48, 55).

Nükleoprotein hücre içerisinde yalnız açıklandığında hem intranükleer hem de intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturmaktadır. Fakat NP proteini fosfoprotein ile beraber açıklandığında stoplazmada lokalize olmaktadır.

Nükleoprotein yalnız açıklandığında nükleusa yönelmesini belirleyen amino asit dizilimlerinin hangilerinin olduğu, ayrıca çekirdek içerisinde nükleoprotein hangi bölgeye lokalize olduğu ve bu proteinin çekirdek içerisinde yerleşmesinin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Corona virüs nükleoproteini nükleolusa lokalize olmakta ve konak hücrenin bölünmesini inhibe etmektedir (105). Proteinlerin nüklear lokalizasyonları bazik amino asitlerden zengin dizilimlerden oluşmaktadır. Nükleoprotein çekirdek içerisinde lokalize olması yapısında bulunan birkaç bazik amino asitten kaynaklanabilir (7). Daha sonraki yapılacak çalışmalarda NP proteinin çekirdek içerisindeki lokalizasyon bölgesinin belirlenmesi ve hücre üzerindeki etkilerinin aydınlatılması sağlanabilir.

Sığır vebası virüsü nükleoproteini fosforile bir proteindir. Viral proteinlerin fosforlanması; nükleik asite bağlanma ve protein-protein ilişkilerinin gerçekleşmesini sağlamaktadır (63). Fosforilasyonda görevli olan amino asitler serin ve threonindir (2, 105). Amino asit uzunluğu 525 olan sığır vebası virüsü nükleoproteini % 13 oranında serin ve threonin amino asiti bulundurmaktadır. Bu amino asitlerin hangi pozisyonda nükleoprotein fosforlanmasını sağladıkları bilinmemektedir. İleriki çalışmalarda NP geni prokaryotik açıklama vektörüne yerleştirilerek fosforilasyon bölgelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yaparak bu bölgelerin identifikasyonu belirlenebilir.

Rekombinant DNA teknolojisi ile virüs genlerinin klonlanması gen manipülasyonlarına büyük kolaylık sağlamaktadır. Viral genlerin klonlanması ile genler üzerinde nokta, çıkarma (deletion), ilave etme (insertion) mutasyonları yapılarak, genin virüsün biyolojisindeki görevinin saptanması ve gen üzerinde

bulunan replikasyon, protein-protein ilişkisi ve antijenik bölgelerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır (19, 101).

Son yıllarda viral infeksiyonlara karşı koruyucu amaçlı olarak DNA immunizasyonları ön plana çıkmıştır. DNA aşıları adjuvanta gereksinim duymamakta ve hücre içerisinde proteazlar tarafından sindirilmemektedir (103). Nükleoprotein ile yapılan aşılamaalarda koruyucu cevap elde edilmemesine rağmen NP-DNA immunizasyonları veya NP-HA antijenik bölgelerini içeren plazmid DNA aşılamaaları ile hem humoral hem de hücreyel immun sistem uyarılarak infeksiyonlara karşı koruma oluşturulabilir.

Bu çalışmada sığır vebası virüsü nükleoprotein geninin klonlanarak ökaryotik hücrelerde geçici açıklatılmasının sonucunda 60 kDa moleküler ağırlığındaki NP proteini Vestern immunoblotlama deneyi ile gösterildi. Böylece, NP geninin devamlı açıklatılması, elde edilen NP proteinin pürifiye edilmesi ve sığır vebası infeksiyonlarının teşhisi için ELISA kiti geliştirilmesinde kullanımı hedeflenmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ahmad S, Bassiri M, Banerjee AK, Yilma T. (1993). Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *spodoptera exigua* larva: Use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. *Virology* 192: 207-216.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994). *Molecular biology of the cell*. Third Edition. 291-332.
3. Banerjee AK, Barik S. (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* 188: 417-428.
4. Baron MD, Barrett T. (1995). The sequence of the N and L genes of rinderpest virus, and the 5' and 3' extra-genic sequences: The completion of the genome sequence of the virus. *Veterinary Microbiology* 44: 175-186.
5. Baron MD, Barrett T. (1997). Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *Journal of Virology* 71: 1265-1271.
6. Baron MD, Barrett T. (2000). Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *Journal of Virology* 74: 2603-2611.
7. Baron MD, Foster-Cuaves M, Baron J, Barrett T. (1999). Expression in cattle of epitopes of a heterologous virus using a recombinant rinderpest virus. *Journal of General Virology* 80: 2031-2039.
8. Baron MD, Goatley L, Barrett T. (1994). Cloning and sequence analysis of the matrix (M) protein gene of rinderpest virus and evidence for another bovine morbillivirus. *Virology* 200: 121-129.
9. Baron MD, Kamata Y, Barras V, Goatley L, Barrett T. (1996). The genome sequence of the virulent Kabete 'O' strain of rinderpest virus: Comparison with derived vaccine. *Journal of General Virology* 77: 3041-3046.
10. Barrett T, Belsham GJ, Subbarao SM, Evans SA. (1989). Immunization with a vaccinia recombinant expressing the F protein protects rabbits from challenge with a lethal dose of rinderpest virus. *Virology* 170: 11-18.
11. Blixenkron-Moller M, Sharma B, Varsanyi TM, Hu A, Norrby E, Kövamees J. (1992). Sequence analysis of the genes encoding the nucleocapsid protein and phosphoprotein (P) of phocid distemper virus, and editing of the P gene transcript. *Journal of General Virology* 73: 885-893.
12. Bolat Y, Doymaz MZ. (1998). *Veteriner viroloji ders notları*. 302-304.
13. Buchholz CJ, Retzler C, Homann HE, Neubert WJ. (1994). The carboxy-terminal domain of sendai virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid-like particles. *Virology* 204: 770-776.

14. Buckland BR, Giraudon P, Wild F. (1989). Expression of measles virus nucleoprotein in *Escherichia coli*: Use of deletion mutants to locate the antigenic sites. *Journal of General Virology* 70: 435-441.
15. Canter DM, Perrault J. (1996). Stabilization of vesicular stomatitis virus L polymerase protein by P protein binding: A small deletion in the C-terminal domain of L abrogates binding. *Virology* 219: 376-386.
16. Cardoso AI, Blixenkrone-Moller M, Fayolle J, Liu M, Buckland R, Wild TF. (1996). Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. *Virology* 225: 293-299.
17. Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B. (1990). *Fields virology*. Raven press, New York. Second Edition. 945-1045.
18. Chenik M, Schnell M, Conzelmann KK, Blondel D. (1998). Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. *Journal of Virology* 72: 1925-1930.
19. Conzelmann KK. (1998). Nonsegmented negative-strand RNA viruses: Genetics and manipulation of viral genomes. *Annual Reviews Genetic* 32: 123-162.
20. Coronel EC, Murti KG, Takimoto T, Portner A. (1999). Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus-like particles containing nucleocapsid-like structures. *Journal of Virology* 73: 7035-7038.
21. Curran J, Homann H, Buchholz C, Rochat S, Neubert W, Kolakofsky D. (1993). The hypervariable C-terminal tail of the sendai paramyxovirus nucleocapsid protein is required for template function but not for RNA encapsidation. *Journal of Virology* 67: 4358-4364.
22. Curran J, Marq JB, Kolakofsky D. (1995). An N-terminal domain of the sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *Journal of Virology* 69: 849-855.
23. Das SC, Baron MD, Barrett T. (2000). Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of peste-des-petits-ruminants virus: Homologous F and H proteins are required for virus viability. *Journal of Virology* 74: 9039-9047.
24. Das T, Schuster A, Schaulies SS, Banerjee AK. (1995). Involvement of cellular casein kinase II in the phosphorylation of measles virus P protein: Identification of phosphorylation sites. *Virology* 211: 218-226.
25. Deshpande KL, Portner A. (1984). Structural and functional analysis of sendai virus nucleocapsid protein NP with monoclonal antibodies. *Virology* 139: 32-42.
26. Diallo A, Barrett T, Barbron M, Subarao SM, Taylor WP. (1989). Differentiation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using specific cDNA clones. *Journal of Virological Methods* 23: 127-136.
27. Diallo A, Libeau G, Couacy-Hymann E, Barbron M. (1995). Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. *Veterinary Microbiology* 44: 307-317.

28. Diallo BA, Barrett T, Lefevre PC, Taylor WP. (1987). Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *Journal of General Virology* 68: 2033-2038.
29. Doymaz MZ, Kılıç AO, Bulut H, Özdarendeli A, Bolat Y. (2000). Rinderpest virüsü (RPV) hemagglütininin (H) geninin klonlanması ve bakteriyel açıklanması. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi* 14(1): 189-195.
30. Escoffier C, Manie S, Vincent S, Muller CP, Billeter M, Gerlier D. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *Journal of Virology* 73: 1695-1698.
31. Evans SA, Baron MD, Chamberlain RW, Goatley L, Barrett T. (1994). Nucleotide sequence comparisons of the fusion protein gene from virulent attenuated strains of rinderpest virus. *Journal of General Virology* 75: 3611-3617.
32. Evans SA, Belsham GJ, Barrett T. (1990). The role of the 5' nontranslated regions of the fusion protein mRNAs of canine distemper virus and rinderpest virus. *Virology* 177: 317-323.
33. Fooks AR, Schadeck E, Liebert UW, Dowsett AB, Rima BK, Steward M, Stephenson JR, Wilkinson GWG. (1995). High-level of the measles nucleocapsid protein by using a replication-deficient adenovirus vector: Induction of an MHC-1 restricted CTL response and protection in a murine model. *Virology* 210: 456-465.
34. Forsyth MA, Barrett T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus research* 39: 151-163.
35. Fujinami RS, Sun X, Howell JM, Jenkin JC, Burns JB. (1998). Modulation of immune system function by measles virus infection: Role of soluble factor and direct infection. *Journal of Virology* 72: 9421-9427.
36. Ghosh A, Joshi VD, Shaila MS. (1995). Characterization of an in vitro transcription system from rinderpest virus. *Veterinary Microbiology* 44: 165-173.
37. Ghosh A, Nayak R, Shaila MS. (1996). Inhibition of replication of rinderpest virus by 5-fluorouracil. *Antiviral Research* 31: 35-44.
38. Gombart AF, Hirano A, Wong TC. (1993). Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology* 67: 4133-4141.
39. Green TD, Macpherson S, Qiu S, Lebowitz J, Wertz GW, Luo M. (2000). Study of the assembly of vesicular stomatitis virus N protein: Role of the P protein. *Journal of Virology* 74: 9515-9524.
40. Grubman MJ, Mebus C, Dale B, Yamanaka M, Yilma T. (1988). Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus-infected cells. *Virology* 163: 261-267.
41. Hashimoto K, Ono N, Tatsua H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. (2002). SLAM (CD150)-Independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *Journal of Virology* 76: 6743-6749.

42. Hausmann S, Garcin D, Delenda C, Kolakofsky D. (1999). The versatility of paramyxovirus RNA polymerase stuttering. *Journal of Virology* 73: 5568-5576.
43. Heaney J, Barrett T, Cosby SL. (2002). Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *Journal of Virology* 76: 3579-3584.
44. Hickman CJ, Khan AS, Rota PA, Bellini WJ. (1997). Use of synthetic peptides to identify measles nucleoprotein T-cell epitopes in vaccinated and naturally infected humans. *Virology* 235: 386-397.
45. Horikami SM, Smallwood S, Moyer SA. (1996). The sendai virus V protein interacts with the NP protein to regulate viral genome RNA replication. *Virology* 222: 383-390.
46. Hsu D, Yamanaka M, Miller J, Dale B, Grubman M, Yilma T. (1988). Cloning of the fusion gene of rinderpest virus: Comparative sequence analysis with other morbilliviruses. *Virology* 166:149-153.
47. Huber M, Cattaneo R, Spielhofer P, Örvell C, Norrby E, Messerli M, Perriard JC, Billeter MA. (1991). Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* 185: 299-308.
48. Ismail T, Ahmad S, D'souza-ault M, Bassiri M, Saliki J, Mebus C, Yilma T. (1994). Cloning and expression of the nucleocapsid gene of virulent Kabete O strain of rinderpest virus in baculovirus: Use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. *Virology* 198: 138-147.
49. Kamata H, Ohkubo S, Sugiyama M, Matsuura Y, Kamata Y, Tsukiyama-Kohara K, Imoaka K, Kai C, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1993). Expression in baculovirus vector system of the nucleocapsid protein gene of rinderpest virus. *Journal of Virological Methods* 43: 159-166.
50. Kamata H, Tsukiyama K, Sugiyama M, Kamata Y, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1991). Nucleotide sequence of cDNA to the rinderpest virus mRNA encoding the nucleocapsid protein. *Virus genes* 5: 5-15.
51. Kesari KV, Shaila MS. (1988). Structural proteins of rinderpest virus II. purification and characterization of the nucleocapsid protein N, the haemagglutinin protein H and the matrix protein, M. *Indian Journal of Biochemistry&Biophysics* 25: 574-579.
52. Khattar SK, Yunus AS, Samal SK. (2001). Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P and P-L interactions using a minigenome system. *Journal of General Virology* 82: 775-779.
53. Kobune F, Sakata H, Sugiyama M, Sugiura A. (1991). B95a, a marmoset lymphoblastoid cell line, as a sensitive host for rinderpest virus. *Journal of General Virology* 72: 687-692.
54. Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: The rule of six revisited. *Journal of Virology* 72: 891-899.

55. Kumar SS, Renji R, Saini M, Goel AC, Sharma B. (1998). Use of prokaryotically expressed nucleocapsid protein as a positive antigen in ELISA. *Biochemistry and Molecular Biology International* 46: 1093-1100.
56. Lamb RA. (1993). Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. *Virology* 197: 1-11.
57. Libeau G, Diallo A, Colas F, Guerre L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Veterinary Record* 134: 300-304.
58. Libeau G, Lefevre PC. (1990). Comparison of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 25: 1-16.
59. Limo M, Yilma T. (1990). Molecular cloning of the rinderpest virus matrix gene: Comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *Virology* 175: 323-327.
60. Lund BT, Tiwari A, Galbraith S, Baron MD, Morrison WI, Barrett T. (2000). Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates CD4<sup>+</sup> T cell responses with broad viral antigen specificity. *Journal of General Virology* 81: 2137-2146.
61. Marriott AC, Easton AJ. (1999). Reverse genetics of the paramyxoviridae. *Advanced in Virus Research* 53: 321-340.
62. McIlhatton MA, Curran MD, Rima BK. (1997). Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence). *Journal of General Virology* 78: 571-576.
63. Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D, Portela A. (1999). Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: Identification of mutations that affect RNA replication. *Journal of Virology* 73: 1186-1194.
64. Mioulet V, Barrett T, Baron MD. (2001). Scanning mutagenesis identifies critical residues in the rinderpest virus genome promoter. *Journal of General Virology* 82: 2905-2911.
65. Morrison HG, Bauer SP, Lange JV, Esposito JJ, McCormick JB, Auperin DD. (1989). Protection of guinea pigs from lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of lassa virus. *Virology* 171: 179-188.
66. Naim HY, Ehler E, Billeter MA. (2000). Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO Journal* 19: 3576-3585.
67. Nakamura K, Ohishi K, Ohkubo S, Kamata H, Yamanouchi K, Fujiwara K, Kai C. (1998). Immunizing effect of vaccinia virus expressing the nucleoprotein of rinderpest virus on systemic rinderpest virus infection in rabbits. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 21: 91-99.
68. Nores JER, McCullough KC. (1997). Rinderpest virus isolates of different virulence vary in their capacity to infect bovine monocytes and macrophages. *Journal of General Virology* 78: 1875-1884.
69. Ohishi K, Inui K, Barrett T, Yamanouchi K. (2000). Long-term protective immunity to rinderpest in cattle following a single vaccination with a recombinant vaccinia virus expressing the virus hemagglutinin protein. *Journal of General Virology* 81: 1439-1446.

70. Ohishi K, Inui K, Yamanouchi K, Barrett T. (1999). Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with a vaccinia virus recombinant expressing the nucleocapsid protein of rinderpest virus. *Journal of General Virology* 80: 1627-1634.
71. Ohishi K, Kamata H, Yamanouchi K, Barrett T. (2000). Identification of T-helper cell epitopes in the hypervariable region of the nucleocapsid (N) protein of rinderpest virus (RPV) in cattle. *Vaccine* 18: 3077-3081.
72. Pandey KD, Baron MD, Barrett T. (1992). Differential diagnosis of rinderpest and PPR using biotinylated cDNA probes. *Veterinary Record* 131: 199-200.
73. Paterson RG, Johnson ML, Lamb RA. (1997). Paramyxovirus fusion (F) protein and hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein interactions: Intracellular retention of F and HN does not affect transport of the homotypic HN or F protein. *Virology* 237: 1-9.
74. Plemper RK, Hammond AL, Gerlier D, Fielding AK, Cattaneo R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *Journal of Virology* 76: 5051-5061.
75. Precious B, Young DF, Bermingham A, Fearn R, Ryan M, Randall RE. (1995). Inducible expression of the P, V, and NP genes of the paramyxovirus simian virus 5 in cell lines and an examination of NP-P and NP-V interactions. *Journal of Virology* 69: 8001-8010.
76. Promega Technical Bulletin. (2001).
77. Ravanel BK, Castelle C, Defrance T, Wild TF, Charron D, Lotteau V, Rabourdin-Combe C. (1997). Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *Journal of Experimental Medicine* 186: 269-278.
78. Rima BK. (1983). The proteins of morbilliviruses. *Journal of General Virology* 63: 1205-1219.
79. Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, Kitching RP, Fleming M, Black DN. (1994). Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology* 204: 425-429.
80. Rossiter PB, Herniman KAJ, Gumm ID, Morrison WI. (1993). The growth of cell culture-attenuated rinderpest virus in bovine lymphoblasts with B cell, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> alpha/beta T cell and gamma/delta T cell phenotypes. *Journal of General Virology* 74: 305-309.
81. Russell R, Paterson RG, Lamb RA. (1994). Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199: 160-168.
82. Ryan KW, Kingsbury DW. (1988). Carboxyl-terminal region of sendai virus P protein is required for binding to viral nucleocapsids. *Virology* 167: 106-112.
83. Ryan KW, Portner A, Murti KG. (1993). Antibodies to paramyxovirus nucleoproteins define regions important for immunogenicity and nucleocapsid assembly. *Virology* 193: 376-384.
84. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork.

85. Schlereth B, Germann PG, Meulen VT, Niewiesk S. (2000). DNA vaccination with both the haemagglutinin and fusion proteins but not the nucleocapsid protein protects against experimental measles virus infection. *Journal of General Virology* 81: 1321-1325.
86. Shaji D, Shaila MS. (1999). Domains of rinderpest virus phosphoprotein involved in interaction with itself and the nucleocapsid protein. *Virology* 258: 415-424.
87. Sheshberadaran H, Norrby E, McCullough KC, Carpenter WC, Örvell C. (1986). The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 67: 1381-1392.
88. Shioda T, Hidaka Y, Kanda T, Shibuta H, Nomota A, Iwasaki K. (1983). Sequence of 3.687 nucleotides from 3' end of Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequences of viral NP, P, and C proteins. *Nucleic Acids Research* 11: 7317-7330.
89. SIGMA Bio Sciences Technical Bulletin. (1995). TRI Reagent. No 205.
90. Spohner D, Drillien R, Howley PM. (1997). The Assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology* 232: 260-268.
91. Sugiyama M, Minamoto N, Kinjo T, Hirayama N, Asano K, Tsukiyama-Kohara K, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1991). Antigenic and functional characterization of rinderpest virus envelope proteins using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 72:1863-1869.
92. Sugiyama M, Minamoto N, Kinjo T, Hirayama N, Sasaki H, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1989). Characterization of monoclonal antibodies against four structural proteins of rinderpest virus. *Journal of General Virology* 70: 2605-2613.
93. Takacs AM, Banerjee AK. (1996). Efficient interaction of the vesicular stomatitis virus P protein with the L protein or the N protein in cells expressing the recombinant proteins. *Virology* 208: 821-826.
94. Tatar N. (1994). Değişik ısı derecelerinde farklı sürelerde tutulan sığır vebası aşısının vero hücrelerinde aktivite kontrolü. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 4: 5-25.
95. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *Journal of Virology* 75. 5842-5850.
96. Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston Ian ACD, Niewiesk S, Meulen VT, Schneider-Schaulies S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *Journal of Virology* 72: 8124-8132.
97. Tsukiyama K, Sugiyama M, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of the rinderpest virus mRNA encoding the hemagglutinin protein. *Virology* 160: 48-54.
98. Tsukiyama K, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. (1988). Fusion glycoprotein (F) rinderpest virus: Entire nucleotide sequence of the F mRNA, and several features of the F protein. *Virology* 164: 523-530.

99. Vincent S, Gerlier D, Manie SN. (2000). Measles virus assembly within membrane rafts. *Journal of Virology* 74: 9911-9915.
100. Walsh EP, Baron MD, Rennie LF, Monaghan P, Anderson J, Barrett T. (2000). Recombinant rinderpest vaccines expressing membrane-anchored proteins as genetic markers: Evidence of exclusion of marker protein from the virus envelope. *Journal of Virology* 74: 10165-10175.
101. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. (1992). *Recombinant DNA. Second Edition.* 213-234.
102. Wertz WG, Perepelitsa PV, Ball LA. (1998). Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3501-3506.
103. Whalen RG. (1996). DNA vaccines for emerging infectious disease: What if? *Emerging Infectious Disease* 2. 168-175.
104. Wild TF, Nanche D, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Malvoisin E, Lecouturier V, Buckland R. (1995). Mode of entry of morbilliviruses. *Veterinary Microbiology* 44: 267-270.
105. Wurm T, Chen H, Hodgson T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *Journal of Virology* 75: 9345-9356.
106. Yamanaka M, Dale B, Crisp T, Cordell B, Grubman M, Yilma T. (1992). Sequence analysis and editing of the phosphoprotein (P) gene of rinderpest virus. *Virology* 190. 553-556.
107. Yamanaka M, Hsu D, Crisp T, Dale B, Grubman M, Yilma T. (1988). Cloning and sequence analysis of the hemagglutinin gene of the virulent strain of rinderpest virus. *Virology* 166: 251-253.
108. Zhang X, Glendening C, Linke H, Parks CL, Brooks C, Udem SA, Oglesbee M. (2002). Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology* 76: 8737-8746.

TC YÜKSEKÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## 8. ÖZGEÇMİŞ

01.06.1968 tarihinde Eskişehir'in Sivrihisar ilçesinde doğdum. İlk, orta, lise eğitimimi aynı ilçede lisans eğitimimi ise Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinde tamamladım. Askerliğimi bitirdikten sonra 1998 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilimdalında doktora başladım. Halen aynı kurumda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

