



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**AŞILAMA STRATEJİLERİNDE BİR GEN
AKTARIM VEKTÖRÜ OLARAK BoHV-4 MOVAR
SUŞU İLE BAC-BoHV-4 ELDE EDİLMESİ**

Touraj ALİGHOLİPOUR FARZANİ

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP**

**ANKARA
2018**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AŞILAMA STRATEJİLERİNDE BİR GEN
AKTARIM VEKTÖRÜ OLARAK BoHV-4 MOVAR
SUŞU İLE BAC-BoHV-4 ELDE EDİLMESİ**

Touraj ALİGHOLİPOUR FARZANİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP

ANKARA
2018

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Aşılama Stratejilerinde Bir Gen Aktarım Vektörü Olarak BoHV-4 Movar suşu ile BAC-BoHV-4 Elde Edilmesi ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Touraj Aligholipour Farzani

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Anabilim Dalında

Touraj Aligholipour Farzani tarafından hazırlanan

"Aşılama Stratejilerinde Bir Gen Aktarım Vektörü Olarak BoHV-4 Movar suşu ile

BAC-BoHV-4 Elde Edilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından

DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkan

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkan

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkan

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkan

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkan

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Herpesviridae Ailesi	2
1.1.1. Genel Bilgiler	2
1.2. Sığır Herpesvirusları	15
1.3. Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4)	16
1.3.1. Etiyoloji	16
1.3.2. BoHV-4'ün Genom Yapısı	19
1.3.3. BoHV-4'ün Fiziksel, Kimyasal ve İn vitro Üreme Özellikleri	24
1.3.4. Epidemiyoloji	27
1.3.4.1. Bulaşma	27
1.3.4.2. Konakçı Spektrumu	27
1.3.4.3. Coğrafik Yayılım	28
1.3.5. Patogenez	30
1.3.6. Klinik Belirtiler	32
1.3.7. Tanı	33
1.3.7.1. Virolojik Tanı	33
1.3.7.2. Serolojik Tanı	35
1.3.8. İmmunité	36
1.3.9. Koruma-Kontrol	37
1.4. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Teknolojisi	38
1.5. BAC Sistemi İle Herpesviral Vektör Hazırlanması	42
1.6. İyi Bir Gen Aktarım Vektörü Olarak BoHV-4' ün Özellikleri	47
2. GEREÇ VE YÖNTEM	53

1.4. Gereç	53
2.1.1. Virus	53
2.1.2. Hücre Kültürü	53
2.1.3. Plazmidler	53
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Enzimler	54
2.1.5. Kullanılan <i>E.coli</i> Suşları	55
2.1.6. Bakteri Besiyerleri	55
2.2. Yöntemler	56
2.2.1. Hücre Hattının Üretilmesi	58
2.2.2. Virusun Üretilmesi	59
2.2.3. DNA Ekstraksiyonu	59
2.2.4. pSP72-ORF2-ORF3'ün Oluşturulması	60
2.2.5. pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo Plazmidin Hazırlanması	64
2.2.6. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 Plazmidin Hazırlanması	68
2.2.7. MDBK Hücresinde Homolog Rekombinasyon ile BoHV-4-BAC-EGFP Hazırlanması	70
2.2.8. Rekombinant Virus Seçimi	71
2.2.9. Rekombinant Plakların Purifikasyonu	71
2.2.10. Hirt Metodu ile Sirküler BoHV-4-BAC-EGFP Elde Edilmesi	71
2.2.11. Sirküler Rekombinant BoHV-4-BAC-EGFP Transformasyonu	72
2.2.12. MDBK Hücresinde Rekombinant Virus Eldesi	73
3. BULGULAR	74
1.5. BoHV-4'ün Hücre Kültüründe Çoğaltılması	74
3.2. DNA Ekstraksiyonu	74
3.3. pSP72-ORF2-ORF3'ün Oluşturulması	75
3.4. pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo Plazmidin Hazırlanması	77
3.5. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 Plazmidin Hazırlanması	78
3.6. MDBK Hücresinde Homolog Rekombinasyon İle BoHV-4-BAC-EGFP Hazırlanması	81
3.7. Rekombinant Virus Seçimi ve Purifikasyonu	81
3.8. Hirt Metodu ile Sirküler BoHV-4-BAC-EGFP Elde Edilmesi	82

3.9. Sirküler Rekombinant BoHV-4-BAC-EGFP'ın, BH10B Bakteriye Transformasyonu	83
4. TARTIŞMA	84
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	96
ÖZET	99
SUMMARY	100
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	127



ÖNSÖZ

Viruslar, doğal olarak konakçı hücrelere genlerini aktarabilen gelişmiş taşıyıcılardır. Bu özellik onları genlerin aktarımında vektör sistemler olarak cazip kılmaktadır. Son yıllarda yeni viral vektörlerin geliştirilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İmmunizasyon ya da terapi amaçlı olarak viral vektör geliştirilmesi oldukça zor ve zahmetli uygulamaları içerir. Viral vektörler, sadece basit bir taşıma sistemi değil, adjuvant olarak da çalışarak, immün sistemi stimüle etmekte ve spesifik koruyucu immunitiyi uyarmaktadırlar. Birçok virus viral vektör olarak denenmiş, dezavantajları/avantajları değerlendirilerek çok azı vektör olarak kullanılabilmiştir.

Özellikle herpesviruslar en yaygın kullanılan vektörlerdir. Genetik stabilitesi ve büyük miktarda yabancı DNA'yı taşıyabilme kapasitesine sahip olabilmeleri, in vitro ve in vivo viral replikasyon üretimi için gerekli olmayan virulans genlerinin varlığı ve herpesviral genomlara manipülasyon için etkili yöntemlerin varlığı gibi faktörler herpesvirusları gen aktarım vektörü olarak kullanmada önemli avantajlar sunar.

Herpesviridae ailesinde, gammaherpesvirinae alt ailesinde ve rhadinovirus genusunda yer alan BoHV-4, son yıllarda özellikle üzerinde durulan, immunizasyon ve terapötik amaçlı olarak çalışılan bir etkidir. Virusun patojenitesinin az veya olmaması, onkojenitesinin bulunmaması, yüksek miktarda yabancı genetik materyal barındırma kapasitesi, bölünen hücrelerde epizomal formda kalabilmesi, değişik hayvan türlerinden elde edilen pek çok hücre çeşidini enfekte edebilme gibi biyolojik özellikleri birlikte değerlendirildiğinde, BoHV-4 iyi bir viral vektör olarak görülmektedir.

Bu çalışma ile, BoHV-4'ün (Movar suşu) bir gen aktarım vektörü olarak geliştirilebilmesi amacıyla BAC olarak klonlanması hedeflenmiş ve çalışmanın uzantısında ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan patojenlere ait çeşitli

immundominant antijenlerin aktarılmasıyla farklı hayvan türlerinde immunizasyon ve kanser terapi amacıyla kullanılması planlanmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda yardım ve desteğini aldığım, bilgisi deneyimleri ve görüşleriyle bana yol gösteren, özveri ve sabrını esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. Seval Bilge Dağalp'e, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yılmaz Akça ve Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Feray Alkan, Prof. Dr. Aykut Özkul, Prof. Dr. M. Taner Karaoğlu ve Prof. Dr. T. Çiğdem Oğuzoğlu ile tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan Yardımcı'ya teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez çalışmam boyunca birlikte görev yaptığım ve tez çalışmam sırasında laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm tüm araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAV	Adeno Associated Virus
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BEK	Bovine Embryonic Kidney
BoHV-1	Bovine Herpesvirus 1
BoHV-4	Bovine Herpesvirus 4
BoMac	Bovine Macrophage Cells
bp	Base Pair
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
CD	Cluster of Differentiation
CPE	Sitopatolojik Etki
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E	Erken Genler
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EtOH	Ethanol
FDS	Fötal Dana Serum
g	Gram
G/C	Guanin Sitozin Oranı
G418	Geneticin (Antibiyotik)
GAGs	Glikozaminoglikanlar
GFP	Green Fluorescence Protein
gp	Glikoprotein
HCMV	İnsan Sitomegalovirus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	Homolog Rekombinasyon

HSV-1	Herpes Simpleks Virus 1
IE	En Erken Genler
IF	Immunofluorescence Assay
IgG	Immunoglobulin G
IR	Internal Inverted Repeat Bölgesi
kDa	Kilo Dalton
L	Geç Genler
LB	Luria-Bertani Agar
LUR	Long Unique Genom Bölgesi
MCF	Malignant Catarrhal Fever
MCS	Multi Cloning Site
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
mRNA	Messenger RNA
μ	Mikro
NLS	Nuclear Localization Signaller
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
prDNA	Polyrepetitive DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Revolutions Per Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SN	Serum nötralizan
TK	Timidin Kinaz
TR	Terminal Inverted Repeat Bölgesi
U _L	Unique Large Segment
U _S	Unique Small Segment
YAC	Yeast Artificial Chromosome

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Herpesviridae ailesi sınıflandırılması	3
Şekil 1.2. Herpesvirusların DNA yapısına göre sınıflandırılması	6
Şekil 1.3. Alfa, beta ve gammaherpesvirusların kapsit yapıları	7
Şekil 1.4. Herpesvirusların iki basamaklı zarflanması	9
Şekil 1.5. Herpesvirusların farklı hücre bağlanma reseptörleri	10
Şekil 1.6. Herpesviruslarda viral ve hücrel reseptör bağlantısı	11
Şekil 1.7. Herpesvirusların enfekte hücrede farklı viral gen gruplarının sıralı ekspresyonu	13
Şekil 1.8. Herpesvirusların enfekte hücrelerde replikasyon detayı	14
Şekil 1.9. BoHV-4'de RFLP tekniği ile suş ayrımı	18
Şekil 1.10. BoHV-4'ün genomik organizasyonu	19
Şekil 1.11. BoHV-4'ün farklı suşlarının prDNA bölgesinin RFLP ile ayrımı	20
Şekil 1.12. BoHV-4'ün kapsit proteinleri	21
Şekil 1.13. BoHV-4'ün kapsit, tegument ve zarf proteinlerin düzeni	23
Şekil 1.14. BoHV-4'ün V.TEST suşunun Georgia Bovine Kidney (GBK)) hücrelerinde tek basamaklı çoğalma eğrisi	25
Şekil 1.15. BoHV-4'ün invitro olarak çoğaldığı insan hücreleri	25
Şekil 1.16. BoHV-4 CPE'si (İzolat K.339 X 400; 4.gün)	26
Şekil 1.17. Postpartum dönemde patojen bakterilerin BoHV-4 ile ilişkisi	31
Şekil 1.18. BoHV-4'ün tespitinde kullanılan metotlar	36
Şekil 1.19. pBAC108L vektörün yapısı	39
Şekil 1.20. pBeloBAC11 vektörün yapısı	40
Şekil 1.21. pBACe3.6 vektörün yapısı	41
Şekil 1.22. pBAC/oriV vektörün yapısı	41
Şekil 1.23. Yaygın kullanılan viral vektörler	43
Şekil 1.24. Herpesviruslarda BAC sistemi ile viral vektör hazırlanması	45
Şekil 1.25. Farklı herpesviruslarda BAC kullanımı ile rekombinant virus hazırlanması	46
Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan plazmidlerin genom haritası	54

Şekil 2.2. Çalışmada uygulanan metotların şematik özeti	58
Şekil 3.1. BoHV-4'ün MDBK hücresinde çoğalması	74
Şekil 3.2. BoHV-4 gB PCR sonucu	75
Şekil 3.3. ORF2 ve 3 için gradient PCR (50-60°C) sonuçları	75
Şekil 3.4. pSP72-ORF2-ORF3 konstraktın doğrulanması	76
Şekil 3.5. pSP72-ORF2-ORF3 vektörün genom haritası	76
Şekil 3.6. pBeloBAC-CMV-EGFP-Neo plazmidin genom haritası	77
Şekil 3.7. BamHI ile kesilmiş pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo	78
Şekil 3.8. Transfeksiyondan 72 saat sonra HEK 293IQ hücresinde pBeloBAC-CMV-EGFP-Neo plazmidin EGFP ekspresyon doğrulaması	78
Şekil 3.9. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 vektörün genom yapısı	79
Şekil 3.10. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-ORF3 vektörün XhoI ile kesimi ve doğrulanması	80
Şekil 3.11. Transfeksiyondan 72 saat sonra HEK 293FT hücresinde pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidin EGFP ekspresyon doğrulanması	80
Şekil 3.12. IGV programı ile pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidin yeni nesil sekanslama analizi	81
Şekil 3.13. Rekombinant yeşil virusların BEK hücresinde 3. pasajdan sonra üremesi	82
Şekil 3.14. DH10B bakteriden elde edilmiş 7 farklı rekombinant virusun EcoRI ile kesim doğrulanması ve Movar referans suşu ile karşılaştırılması	83

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Herpesviridae ailesinde farklı viruslar ve ilişkili hastalıklar	4
Çizelge 1.2. Sığırlarda tespit edilen herpesviruslar ve neden oldukları klinik bulgular	16
Çizelge 1.3. BoHV-4' ün önemli tegument proteinleri	23
Çizelge 1.4 . Çeşitli viral vektörlerin karşılaştırması	43
Çizelge 2.1. Kullanılan kesim enzimleri ve markası	55
Çizelge 2.2. Bakteri besiyerlerinin hazırlanması	56
Çizelge 2.3. Bu çalışmada kullanılan primerlerin dizi, hedef bölgesi ve ürün büyüklüğü	60
Çizelge 2.4. BoHV-4 gB PCR için miks bileşenleri ve programı	61
Çizelge 2.5. BoHV-4 ORF2 ve 3 için PCR miks bileşenleri ve programı	61
Çizelge 2.6. pSP72 ve ORF2 PCR ürünlerin kesim protokolü	62
Çizelge 2.7. pSP72 ve ORF2 için T4 ligaz ile ligasyon protokolü	62
Çizelge 2.8. BoHV-4'ün ORF2 ve 3 için koloni PCR miks bileşenleri ve programı	63
Çizelge 2.9. pSP72-ORF2 plazmid ve ORF3 PCR ürünlerinin kesim protokolü	64
Çizelge 2.10. pSP72-ORF2 ve ORF3 için T4 ligaz ile ligasyon protokolü	64
Çizelge 2.11. pEGFP-C1 plazmidin kesim protokolü	65
Çizelge 2.12. CMV-EGFP-Neo kasetin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü	65
Çizelge 2.13. pBeloBAC11 plazmidin kesim protokolü	66
Çizelge 2.14. Linear pBeloBAC11 plazmidin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü	66
Çizelge 2.15. Linear BAC ve CMV-EGFP-Neo kasetin T4 ligaz ile ligasyon protokolü	67
Çizelge 2.16. pSP72-ORF2-ORF3 plazmidin kesim protokolü	68
Çizelge 2.17. pSP72-ORF2-ORF3 plazmidin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü	68
Çizelge 2.18. pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo plazmidin kesim protokolü	69

Çizelge 2.19. pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo plazmidin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü	69
Çizelge 2.20. Linear pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo ve pSP72-ORF2-ORF3 plazmidlerin T4 ligaz ile ligasyon protokolü	69
Çizelge 2.21. Hirt yönteminde kullanılan Buffer I (resüspanسیون buffer)	72
Çizelge 2.22. Hirt yöntemde kullanılan Buffer II (lisis buffer)	72



1. GİRİŞ

Viral enfeksiyonlara karşı en iyi savunma yolu immunizasyondur. Ancak atenüe suşların geliştirilmesinde başarısızlık, inaktif virusun immun yanıtın uyarılmasında yeterli olamaması, purifiye viral proteinlerin immunojenik ya da nötralizan antikor yanıtında yetersiz kalması gibi nedenlerle bazı viruslara karşı elde edilen aşılar başarısız olabilmektedir. Klasik tekniklerle hazırlanan aşıların zamanla ortaya çıkan dezavantajları düşünülerek, günümüzde rekombinant stratejiler kullanılarak yeni jenerasyon aşılar üretilmeye çalışılmaktadır.

Viruslar, doğal olarak konakçı hücrelere genlerini aktarabilen gelişmiş taşıyıcılardır. Bu özellik onları genlerin aktarımında vektör sistemler olarak cazip kılmaktadır. Belirli viruslar, yabancı genetik materyalleri taşıma ve etkili olarak bu genleri aktarma kapasitelerinden dolayı gen aktarım vektörleri olarak kullanılabilir. Bu anlamda en çok kullanılan viruslar retrovirus, adeno-associated virus, poxvirus ve herpesviruslardır.

Özellikle herpesviruslar en yaygın kullanılan vektörlerdir. Genetik stabilitesi ve büyük miktarda yabancı DNA'yı taşıyabilme kapasitesine sahip olabilmeleri, in vitro ve in vivo viral replikasyon üretimi için gerekli olmayan virulans genlerinin varlığı, bölünen hücrelerde epizomal formda kalabilmesi ve herpesviral genomlara manipülasyon için etkili yöntemlerin varlığı gibi faktörler herpesvirusları aşı vektörleri olarak kullanmada önemli avantajlar sunar.

Herpesviridae ailesi her biri pek çok cins içeren Alpha-, Beta- ve Gammaherpesvirinae alt ailelerini kapsar. BoHV-4, Herpesviridae familyasının Gammaherpesvirinae alt familyasında ve rhadinovirus genusunda yer alan bir etkindir. Diğer herpesviral vektörlerin özelliklerine ilave olarak BoHV-4'ün patojenitesinin az veya olmaması, onkojenitesinin bulunmaması, değişik hayvan türlerinden elde edilen pek çok hücre çeşidini enfekte edebilme ve başkalaşım süresince transgen ekspresyonunu sürdürebilme gibi moleküler ve biyolojik

özellikleri birlikte değerlendirildiğinde, vektör aşısı üretilmesinde oldukça avantajlı bir virus olarak görülmektedir.

Bilindiği gibi genlerin etkili aktarımı ve uygun gen ekspresyonu gen terapilerinin en önemli basamaklarıdır. Bu amaçları gerçekleştirmede en iyi metotlardan biri, herpesvirus genomunda mutasyonlar gerçekleştirmek ve genin fonksiyonunu araştırmaktır. Herpesviral bir genomda çok spesifik mutasyon, viral genomik DNA ve bir DNA fragmenti taşıyan spesifik allelin mutasyonu ve hücrelere ko-transfeksiyon ile bir viral mutantı oluşturmak için rekombinasyon stratejisi uygulandığında mümkün olmuştur. Birçok herpesviral mutant, Bacterial Artificial Chromosome (BAC) yaklaşımı ile sağlanmış ve herpesviral genlerin fonksiyonlarını karakterize etmek için kullanılmıştır. İlk insan herpesvirus BAC'ı herpes simplex virus (HSV-1) için üretilmiştir. Daha sonra bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda Human Sitomegalovirus (HCMV), HSV-1, Epstein Barr Virus (EBV) ve BoHV-4'ü içeren herpesviral BAC vektörlere birçok örnek vardır. BoHV-4'ün iyi bir gen aktarım vektörü olabileceğinin bildirilmesinin ardından bu konu üzerine birçok çalışma yapılmış ve BAC olarak klonlanan BoHV-4, farklı patojenlere ait çeşitli immundominant antijenlerin aktarılmasıyla farklı hayvan türlerinde immunizasyon ve özellikle glioma ve meme kanserinde küratif amaçlı olarak kullanılmış ve orijinal konakçıda kullanılabilirliği açısından umut verici sonuçlar alınmıştır.

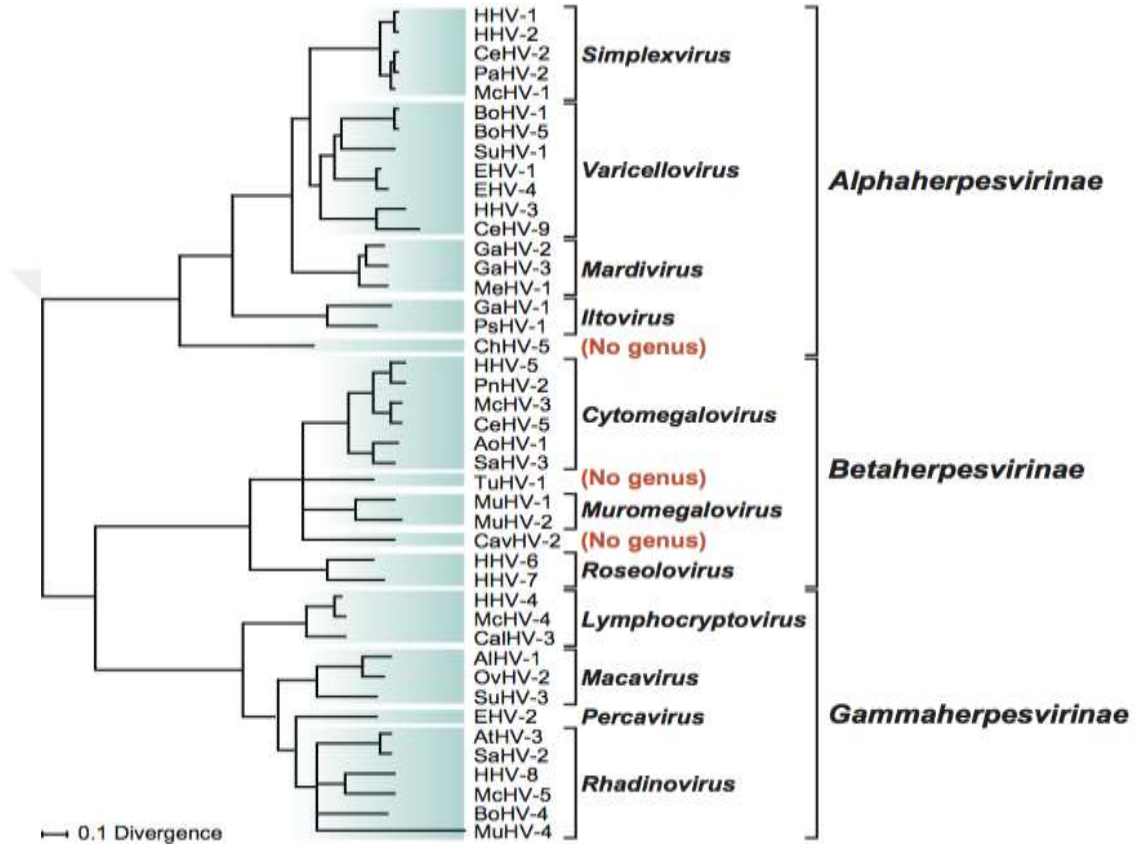
1.1. Herpesviridae Ailesi

1.1.1. Genel Bilgiler

Herpes kelimesi ilk olarak yaklaşık 25 yüzyıl önce Yunanca'da bazı deri hastalıklarını tanımlamak için kullanılmıştır. Daha sonra 1962 yılında Beswick tarafından bu terim spesifik olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Herpesviridae ailesi konakçı türü, latentlik bölgesi, sitopatolojik etkileri (CPE) ve replikasyon hızına göre ayrılan, her biri pek çok cins içeren Alpha-, Beta- ve Gammaherpesvirinae alt ailelerini kapsar (Şekil 1.1; Davison ve ark., 2010).

Şekil 1.1. Herpesviridae ailesi sınıflandırılması (Davison, 2010).



Alphaherpesviruslar kısa replikasyon periyoduna sahip olup, replikasyon sırasında konakçı hücrelerin parçalanmasına neden olmakta ve farklı konakçı hücrelerde çoğalabilmektedir. Genel olarak bu viruslar sensorik nöronların nükleusunda latent olarak kalabilmektedirler (Kramer ve Enquist, 2013).

Betaherpesviruslar dar konakçı spektrumuna sahip olmaları, replikasyon sürelerinin uzun olmasıyla diğer herpesviruslardan ayrılmaktadır. İn vitro koşullarda genellikle fibroblast hücrelerinde dev hücresi oluşturarak üremektedirler. Virus üreme sırasında hem çekirdekte, hem de sitoplazmada inkluzyon cisimcikleri oluşturmaktadır. Betaherpesviruslar monositlerde, tükürük bezlerinde,

retiküloendotelial hücrelerde ve böbreklerde latent olarak bulunmaktadır (Santos, 2016).

Gammaherpesviruslar in vivo olarak sadece spesifik konakçılarda litik faza girmektedirler. Bu viruslar in vitro şartlarda belirli hücrelerde çoğalabilmektedir. Latent viruslar lenfositlerde ve lenfoid dokularda bulunmaktadır (Çizelge 1.1; Rajcani ve Kudelova, 2003).

Çizelge 1.1. Herpesviridae ailesinde farklı viruslar ve ilişkili hastalıklar (Murphy ve ark., 1999).

Virus	Hastalık
<u>Alphaherpesvirinae</u>	
Bovine Herpesvirus 1	Infectious Bovine Rhinotracheitis, Infectious Pustular Vulvovaginitis, Infectious Balanoposthitis
Bovine Herpesvirus 2	Sığır Mammillitis, Pseudo-lumpy skin disease
Bovine Herpesvirus 5	Ensefalitis
Caprine Herpesvirus 1	Konjunktivitis, Solunum ve Genital kanal hastalıkları
Porcine Herpesvirus 1	Yavru Domuzlarda Jeneralize Hastalıklar, Domuzlarda Abort.
Equine Herpesvirus 1	Abort, Yavru Atlarda Perinatal Solunum ve MSS Hastalıkları
Equine Herpesvirus 3	Coital Exanthema
Equine Herpesvirus 4	Rhinopneumonitis
Canine Herpesvirus 1	Yavru Köpeklerde Kanamalı Hastalıklar
Felid Herpesvirus 1	Kedilerde Viral Rhinotracheitis
B Virus (Cercopithecine)	Maymunlarda Herpes Simpleks-1 Benzeri Hastalık, insanlarda ölümcül Ensefalitis)
Simian Varicellavirus	Maymunlarda Varicella Benzeri Hastalıklar
Gallid Herpesvirus 1	Tavuklarda Infectious Laryngotracheitis
Gallid Herpesvirus 2	Marek Hastalığı
Anatid Herpesvirus 1	
<u>Betaherpesvirinae</u>	
Porcine Herpesvirus 2	Jeneralize Cytomegalovirus Hastalığı
<u>Gammaherpesvirinae</u>	
Alcelaphine Herpesvirus 1	Sığır Malignant Kataral Fever
Bovine Herpesvirus 4	Solunum, genital hastalık, abort
Equine Herpesvirus 2	Solunum sistemi enfeksiyonu
Equine Herpesvirus 5	Solunum sistemi enfeksiyonu

Herpesvirusların taksonomisi ilk olarak 1971 yılında International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından yapılmıştır. Yapılan bu ilk sınıflandırmada 23 virus ve 4 grup tanımlanmıştır (Davison, 2010). Herpesvirusların en yaygın gruplandırması Roizman ve ark. (1981) tarafından, sahip oldukları DNA yapısına göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.2).

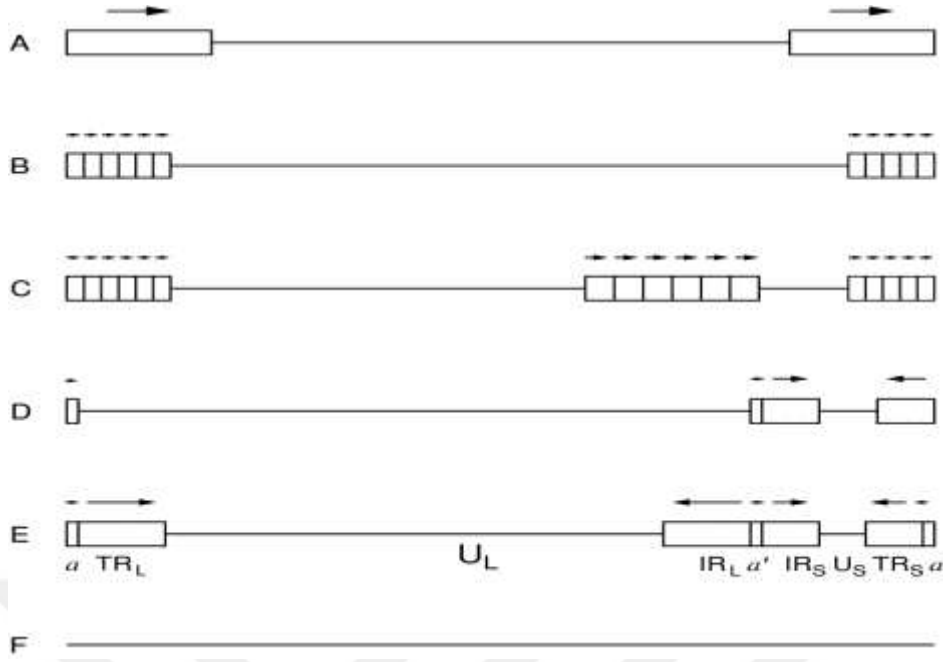
Grup A'da yer alan virusların DNA'sında iki direkt tekrar (tandem repeat) gen bölgesi, ortada olan unique sekans gen bölgesine bağlanmıştır. Bu grupta betaherpesviruslar ve equine herpesvirus tip 2 yer almaktadır.

Grup B'de yer alan viruslarda iki sıralı direkt tekrar gen bölgesi, ortada olan unique sekans gen bölgesine bağlanmıştır. Gammaherpesviruslar bu grupta sınıflandırılmıştır. Bu grupta tekrar bölgeleri virus DNA'sının yaklaşık %30'unu kaplamıştır.

Grup C, grup B nin alt grubu olarak kabul edilmekte olup, bu grubun temsilcisi olarak Epstein Barr Virus (EBV) bildirilmektedir.

Grup D'de DNA molekülü bir uzun (Unique Large segment; U_L -103 kbp) ve bir kısa (Unique Small segment; U_S-32 kbp) kovalent bağlanmış parçalardan oluşmuştur. İki internal ve terminal inverted repeat bölgesi (IR ve TR-11kbp) U_S segmente bağlanmıştır. D grubu herpesviruslarda U_S segmenti her zaman sabit durumdadır; dolayısıyla bu bölgenin oryantasyonuyla iki farklı izomerik form tespit edilmektedir. Alphaherpesviruslar bu grupta yer almaktadır.

Grup E en kompleks genom yapısı olarak tanımlanmaktadır. Bu grup, grup D'deki viruslara benzer genomik organizasyona sahiptir ancak TR_L/IR_L bölgeleri daha büyüktür (Roizman ve ark.,1981).

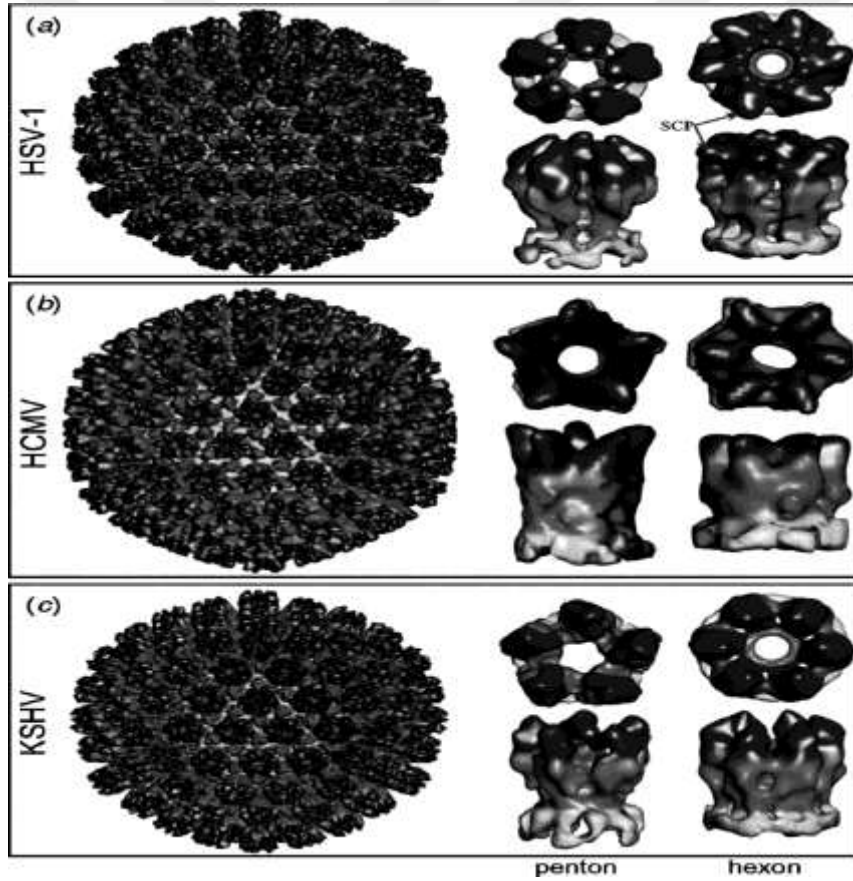


Şekil 1.2. Herpesvirusların DNA yapısına göre sınıflandırılması (Roizman ve ark.,1981).

Tüm herpesvirusların ortak özelliği sferikal virion morfolojisidir. Bu ailede ortalama 120-200 nm çapında olan sferikal virionlarda kor, kapsit, tegument ve zarf bulunmaktadır. Herpesviruslar büyük, linear, çift iplikçikli DNA içeren bir kor ve 162 kapsomer içeren ikozadeltahedral bir kapsit tabakasından oluşur. Herpesvirusların genomik DNA'sının moleküler ağırlığı $80-150 \times 10^6$ olup, % 32-75 arasında değişen guanin-sitozin (G-C) oranına sahiptir. Kapsit yapısındaki kapsomerler 12 penton ve 150 hekzondan oluşmaktadır. Ayrıca virion yapısında her penton kapsomerden 5 kopya ve her hekzon kapsomerden 6 kopya tespit edilmiştir. Herpesviruslarda kapsit genel olarak major kapsit proteini, alfa-tripleks, beta-tripleks ve küçük bazal kapsit proteinlerden oluşmaktadır (Şekil 1.3; Trus ve ark., 2001). Kapsomerler tripleks bölgeleri ile birbirine bağlanmaktadır (Brown ve Newcomb, 2011). Herpesviruslarda kapsit viral DNA'yı mekanik ve diğer çevresel etkilerden korumaktadır. Ayrıca kapsit proteinleri, herpesvirusla enfekte hücrelerde litik dönemde DNA'yı çekirdek porlarına yönlendirmektedir (Heming ve ark., 2017). Enfekte hücrelerde aynı zamanda A kapsit (boş kapsit), B kapsit (intermediate-kapsit ve kor) ve C kapsit (olgun virion) yapısı bulunmaktadır (Tandon ve ark., 2015). Araştırmalarda alphaherpesviruslarda A ve C kapsitin, B kapsitten oluştuğu ve ayrıca

B kapsitde fazladan VP21 ve VP22a proteinlerinin bulunduğu bildirilmektedir (Rixon, 1993).

Tüm herpesviruslarda kapsit proteinlerinin birleşmesi ve olgun kapsit oluşması ve viral DNA'nın paketlenmesi çekirdekte gerçekleşir. Yapısal proteinlerin (kapsit ve tegument proteinleri) ekspresyonu geç genlerde olmakta ve bu süreç sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bu proteinlerin yapısında Nuclear Localization Signaller (NLS) bulunmaktadır ve bu peptidlerin yardımıyla kapsit çekirdeğe yönlendirilerek, DNA paketlenmesi çekirdekte meydana gelmektedir (Abaitua ve ark., 2012).



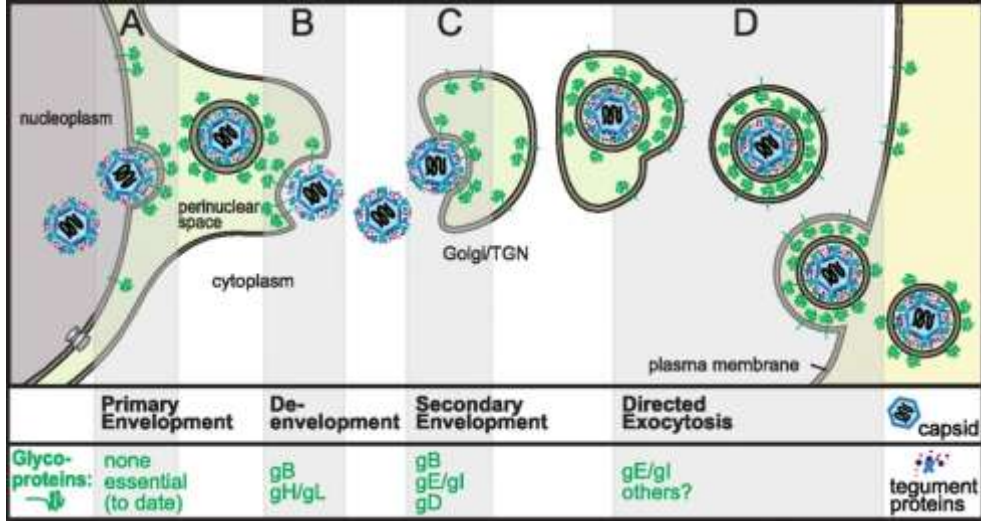
Şekil 1.3. Alfa, beta ve gammaherpesvirusların kapsit yapıları (Trus ve ark., 2001).

Tegument proteinleri sadece herpesviruslarda bulunmaktadır ve bu proteinler nükleokapsit translokasyonu ve toparlanma (assembly) sürecinde rol

oyunmaktadırlar. Ayrıca bu proteinlerin, en erken viral ve hücrel genlerin ekspresyonunda da önemleri vardır. Bu proteinlerin sayısı herpesviruslarda farklılık göstermektedir. Örnek olarak HSV-1’de 26, insan Sitomegalovirusda (HCMV) 38 ve EBV’da 17 tane tegument proteini tespit edilmiştir. Bu proteinlerin yapısı elektron mikroskopta, fibröz veya granüler olarak görülmektedir. Tegument proteinleri major (pUL36, pUL47, pUL48 ve pUL49) ve minor (pUL13) olarak gruplandırılmıştır (Guo ve ark., 2010).

Tegument proteinlerinin morfolojisi hücrede farklı bölgelerde ve hücre dışındaki virionda değişkenlik gösterir. Dolayısıyla bu proteinlerin viriona eklenmesi, virusun farklı replikasyon dönemlerinde meydana gelmektedir. Bazı tegument proteinleri sadece hücre içinde bulunan viruslarda tespit edilmiştir. Bu noktadan hareketle, virusun farklı replikasyon dönemlerinde farklı tegument proteinlerinden yararlanabildiği ileri sürülmektedir. Tegument proteinleri iki tabakadan oluşmaktadır. İç tabakadaki proteinler kapsit ile, dış tabakadaki proteinler ise glikoproteinler ile ilişki kurmaktadırlar (Coller ve ark., 2007).

Herpesviruslarda zarf genel olarak glikoproteinlerden oluşmaktadır. Ayrıca zarfda hücrel proteinler de bulunmaktadır. Örnek olarak HCMV zarfında 2-mikroglobulin, CD55, CD59 ve annexin II tespit edilmiştir. Herpesviruslarda zarf oluşması ilk basamakta iç nükleer membranda gerçekleşir. Virus daha sonra zarflanma/zarftan arınma (envelopment/de-envelopment) işlemi ile zarfını kaybederek, çekirdekten sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada golgi aparatında virusa tegument proteinleri ile tekrar zarf eklenir (Şekil 1.4). Dolayısıyla herpesvirusların zarfında farklı hücrel bölgelerin lipidleri bulunmaktadır. Bu lipidler genellikle fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinositoldan oluşmaktadır (Johnson ve ark., 2011).



Şekil 1.4. Herpesvirusların iki basamaklı zarflanması (Johnson ve ark., 2011).

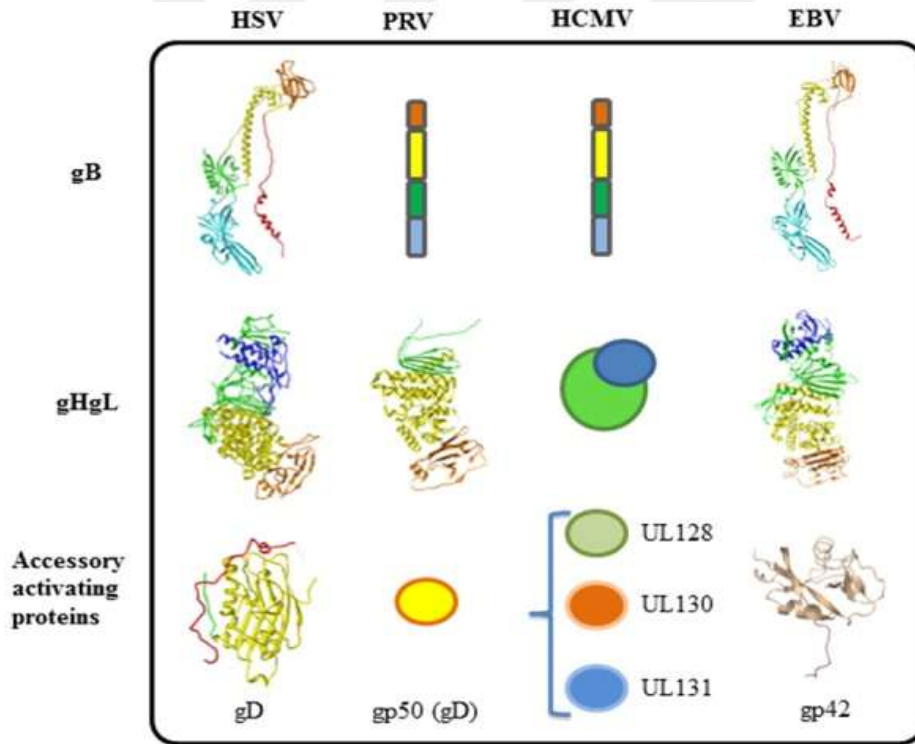
Genel olarak herpesviruslarda 20-80 arasında değişen sayıda glikoprotein tespit edilmiştir. Glikoprotein (g) B (heparan-binding, fusion), gH (gH ilişkili, füzyon), gL (gL ilişkili, fusion), gM (gN ilişkili), gL (gM ilişkili) tüm herpesviruslar arasında ortak olarak bulunmaktadır (Glauser ve ark., 2012).

Örnek olarak HSV-1 de 20 zarf proteininden 11 tanesi gL, gM, gH, gB, gC, gK, gG, gJ, gD, gI ve gE zarfda bulunmaktadır. Bu proteinler hücresel reseptörlere bağlanma durumunda, virusun hücreye girmesinde, tomurcuklanma, hücreden hücreye geçmede ve immun yanıtı kaçmada rol oynamaktadırlar (Friedman, 2003). Başka bir alphaherpesvirus olan Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) genomunda 48 viral protein (33 yapısal ve 15 yapısal olmayan protein) tespit edilmiştir. Bunların arasında gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK ve gM görülmektedir (Keil ve ark., 2005).

Sitomegaloviruslarda (Betaherpesvirus), 75 adet glikoproteinden 15 tanesi zarfda tespit edilmiştir. Zarfda bulunan glikoproteinler 3 grupta toplanmaktadır. Grup CI de gB bulunmaktadır. Glikoprotein B (UL55) daha sonra hücrede furin ile kesilip, gp55 ve gp116 meydana gelmektedir. Grup CII de gN (UL73) ve gM (UL100) bulunmaktadır. Son olarak grup CIII'de gH (UL75) ve gO (UL74) yer almaktadır. Bazı viruslarda gQ (UL100) da tespit edilmiştir. Ayrıca bu ailede UL4 ve RL10 olarak iki spesifik glikoprotein daha bulunmaktadır (Adair ve ark., 2002).

Bir gammaherpesvirus olan EBV’da en az 12 adet glikoprotein tanımlanmıştır. Bunlar arasında gB, gH, gL, gM ve gN tüm herpesviruslar arasında homolog olarak bulunmaktadır. Ayrıca bu viruslarda bulunan p38 (BFRF1) başka ailelerde de bulunmaktadır. Glikoprotein 150, gp78, gp350/220, gp42 ve BMRF2 bu aileye spesifik yüzey proteinleri olarak kabul edilmektedir (Hutt-Fletcher, 2015).

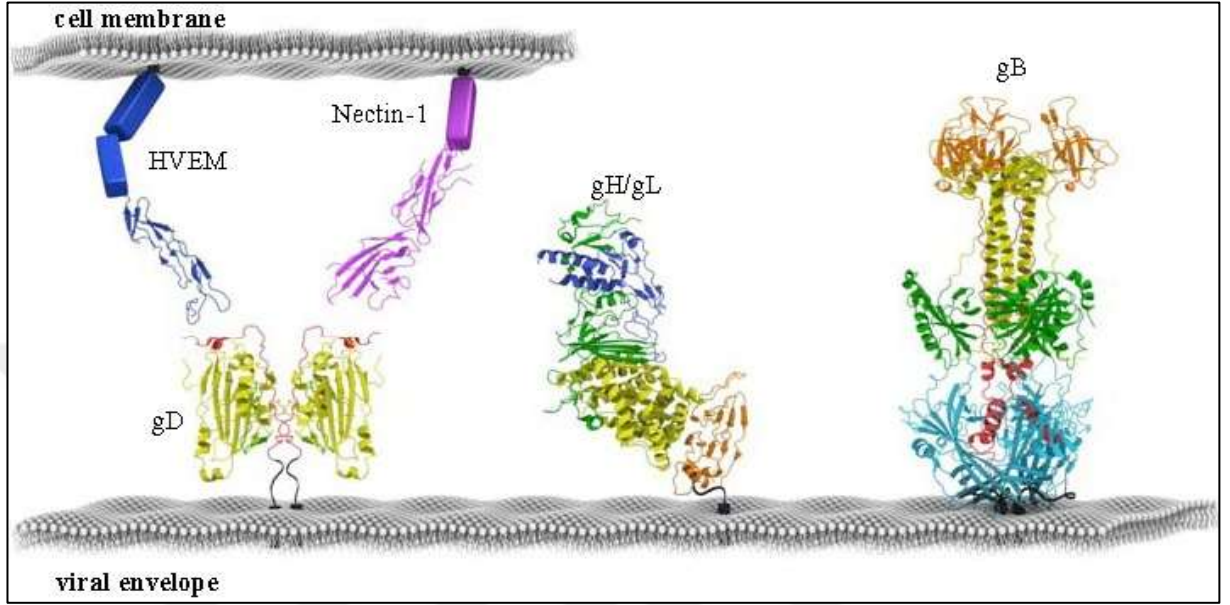
Bu proteinlerin ilk görevi virusun hücreye girmesini sağlamaktır. Herpesviruslar zarf füzyonu ile hücrelere giriş yapmaktadırlar. Bu füzyon tüm herpesviruslarda gB, gH-gL kompleksi ile yapılmaktadır. Enfekte hücrelerde gD ve gH-gL nin bir araya gelmesi alphaherpesviruslarda gD, betaherpesviruslarda UL128, UL130 ve UL131 ve gammaherpesviruslarda gp42 aracılığıyla yapılmaktadır (Şekil 1.5; Spear ve Longnecker, 2003).



Şekil 1.5. Herpesvirusların farklı hücre bağlanma reseptörleri (Spear ve Longnecker, 2003).

Genel olarak herpesvirusların hücresel tropizması bu füzyon aksesuar proteinleri ile yapılmaktadır. Örneğin alphaherpesviruslardaki gD endotelial hücresel

reseptörler olan HVEM ve nektin-1 ile bağlanarak, virusun hücreye girişini sağlar. Gammaherpesviruslarda ise viral gp42, B lenfositlerin HLA hücresel reseptörüne bağlanmaktadır (Şekil 1.6; Eisenberg ve ark., 2012).



Şekil 1.6. Herpesviruslarda viral ve hücresel reseptör bağlantısı (Eisenberg ve ark., 2012).

Herpesvirusların glikoproteinleri, replikasyon için gerekli olan (esansiyel) ve gerekli olmayan glikoproteinler (non-essential) olarak gruplandırılmıştır. Örneğin bir alphaherpesvirus olan BoHV-1’de gB, gD, gH ve gL esansiyel; gC, gE, gI, gG ve gM ise esansiyel olmayan glikoproteinlerdir (Pokhriyal ve ark., 2016).

Virusun hücre içine girişi zarf glikoproteinleri tarafından yönetilir. Adsorbsiyon iki kademedede gerçekleşir. Bir alphaherpesvirus olan BoHV-1’de önce zarf glikoproteinleri gC/gB, hücre yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanına gevşek olarak bağlanır. Daha sonra bunu, gD'nin yeni tanımlanmış olan reseptöre (Receptor Herpesvirus Entry Mediator C; HVEM ve Nectin-1 (HveC) olarak da isimlendirilmektedir) sabit şekilde bağlanması izler. Penetrasyon, zarf glikoproteinleri gC/gB ve gH/gL üzerinden gerçekleşse de, bu sürecin mekanizması henüz ayrıntılı olarak tanımlanmamıştır. Glikoprotein C, virus replikasyonu için esansiyel değildir fakat serbest virusun adsorbsiyonunda stabiliteyi sağlamaktadır.

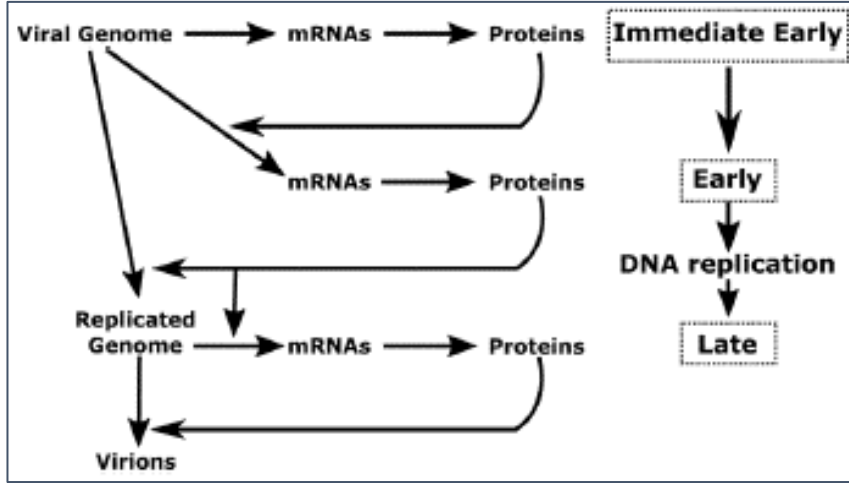
Glikoprotein C'nin eksik olması durumunda, bütün hücrelerde bulunan heparan sülfat reseptörüne labil bir adsorbsiyon şekillenmektedir (Boehmer ve Nimonkar, 2003).

Virus replikasyonunun başlaması için ilk basamak hücresel protein ekspresyonunun engellenmesidir. Bu basamak early-shutoff ya da virion-associated host shutoff olarak isimlendirilmiştir. Herpesvirusların farklı ailelerinde bu basamak farklı viral proteinler ile gerçekleşmektedir. Örnek olarak HSV-1 de bu görev, VHS (UL41 tegument proteini) tarafından yapılmaktadır. VHS hem hücresel proteinlerin ekspresyonunu engellemekte, hem de hücresel mRNA'yı parçalamaktadır. Bu protein viral DNA'nın çekirdeğe transportu tamamlanana kadar sitoplazmada bulunmaktadır. Daha sonra viral DNA hücresel mikrotubul ile çekirdeğe transport edilerek, aynı zamanda tegument proteinleri olan bTIF (VP16) ve VP8 ile en erken (IE) genlerin (bICP0, bICP4 ve bICP22) transkripsiyonunu uyarmaktadır. Daha sonra bu IE proteinler, Erken (E) ve Geç (L) proteinlerin üretilmesine sebep olurlar. İki IE transkripsiyon birimi mevcut olup bunlar:

- IE transkripsiyon birimi 1 (IEtu 1)
- IE transkripsiyon birimi 2 (IEtu 2) dir (Prasad ve ark., 2013).

Herpesviruslarda gen ekspresyonu, ekspresyonun bir litik dönemde oluşması temeline dayanarak ve zamana bağlı olarak 3 ayrı fazda düzenlenmektedir (Şekil 1.7):

- En erken (Immediate Early, IE) genler
- Erken (Early, E) genler
- Geç (Late, L) genler (Cai ve Schaffer, 1992).



Şekil 1.7. Herpesvirusların enfekte hücrede farklı viral gen gruplarının sıralı ekspresyonu (Gruffat ve ark., 2016).

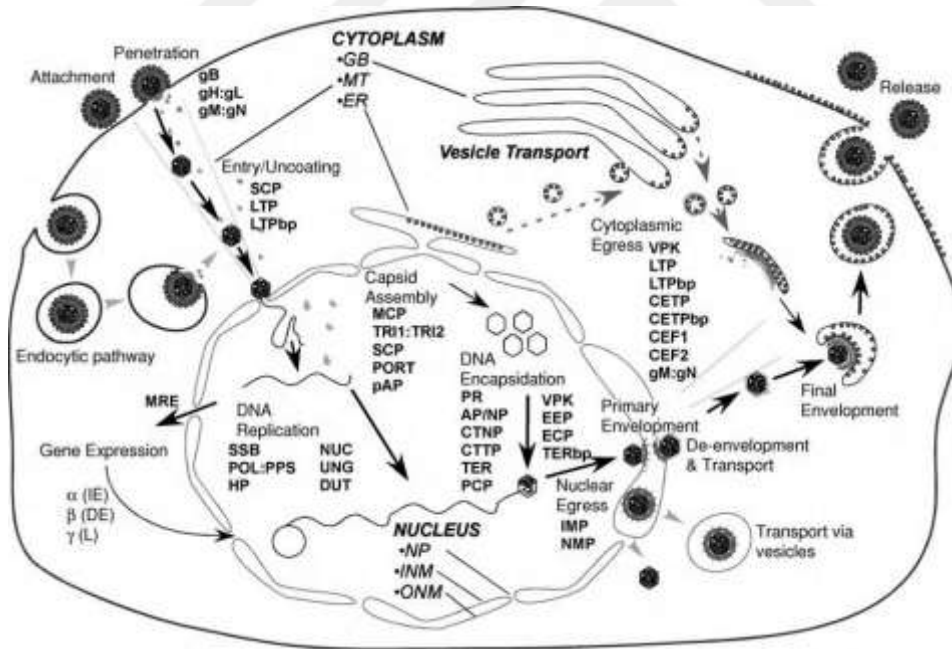
Fonksiyonel düzeyde, IEtu1 tarafından kodlanan proteinler bICP0 ve bICP4 olarak adlandırılırlar. IEtu2 den tek bir transkript oluşur ve bu gen bICP22'dir. IE gen ekspresyonu, selüler transkripsiyon faktörü Oct-1 ile etkileşime giren bir virion komponenti (bTIF) tarafından uyarılır ve daha sonra bu protein kompleksi tüm IE promotorlarında bulunan TAATGAGCT motiflerine bağlanır. IE proteinleri E gen ekspresyonunu aktive eder ve sonuç olarak viral DNA replikasyonu oluşur. Daha sonra bir veya daha fazla IE proteini tarafından L gen ekspresyonu aktive edilir ve bu da virion birleşmesi ve serbest bırakılması ile sonuçlanır. DNA replikasyonu ve transkripsiyonu hücre çekirdeğinde, protein sentezi ise sitoplazmada gerçekleşir. DNA, çekirdek içersine girdikten sonra sirküler hale gelir ve bu aşamadan sonra genom replikasyonu iki yolla gerçekleşir.

- 1- Theta replikasyonu: Normalde plazmidler bu yöntemle çoğalmaktadırlar.
- 2- Rolling circle model (Konkatamer) (Weller ve Coen, 2012).

Ayrıca replikasyona özel bu sirküler formun oluşmasından dolayı herpesviruslarda rekombinasyonlar da tespit edilmektedir. Genom replikasyonu uzun ve kısa genom bölgelerinde farklı replikasyon orijini bölgelerinden başlamaktadır. Yapılan bir çalışmada BoHV-1'de iki replikasyon orijin bölgesi (ori) bulunmuştur (Glazov ve ark., 2010). HSV-1'de biri oriL'de ve 2 tane oriS (UL29 ve 30 arasında)

de olmak üzere US bölgesinde 3 farklı replikasyon başlama bölgesi tespit edilmiştir (Weller ve Coen, 2012).

Replikasyon başlaması için gerekli proteinler viral DNA helikaz, viral DNA polimeraz ve yardımcı proteinlerdir. HSV-1 de UL5, UL8, UL52'den eksprese olan proteinler DNA helikaz enzimi ve UL30'dan sentezlenen protein ise DNA polimeraz olarak aktivite göstermektedir. Replikasyondan sonra geç genlerden elde edilen yapısal proteinler ile kapsit oluşmakta ve virus çekirdekten sitoplazmaya geçmektedir. Yapılan çalışmalarda kapsit proteinlerinin çekirdeğe transportu hücresel sitoskeletonlar (Dynein ve Kinesin) ile gerçekleşmektedir. Yeni oluşan viruslar zarf ve glikoproteinlerini hücre içi organel membranlardan (golgi aparatı) alırlar. Olgun virus partikülleri tomurcuklanma yolu ile hücre dışına salınırlar (Şekil 1.8; Lyman ve Enquist, 2008).



Şekil 1.8. Herpesvirusların enfekte hücrelerde replikasyon detayı (Lyman ve Enquist, 2008).

Herpesvirusların en önemli özelliği konakçı hücrelerde latent kalması ve daha sonra farklı etkiler altında reaktivasyon sergilemesidir. Alphaherpes alt ailesi, uzun süreli latentlik için öncelikle nöronları hedefler. Aynı zamanda deri veya mukoza yoluyla ulaşılan epitelyumda da çoğalabilmektedirler. Beta ve gammaherpes alt aileleri çeşitli lökosit alt gruplarını tercih eder ancak epitel hücrelerini de enfekte edebilmektedirler. Latent viruslar, viral genom bütünlüğünü korumak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Herpesvirusların genomu latent durumlarda epizomal olarak enfekte hücrelerde bulunmaktadır. Latentlik periyodunda, viral replikasyon için gerekli proteinler eksprese edilmediğinden dolayı, bu viruslar konakçı hücre çoğalma mekanizmalarına bağımlıdır (Lieberman, 2016). Ayrıca bazı alphaherpesvirusların -örneğin herpes simpleks virus 1 (HSV-1) ve equine herpesvirus tip 1 ve 3- onkojenik ve hücre DNA'sına integrasyon özelliği tespit edilmiştir (Morissette ve Flamand, 2010).

1.2. Sığır Herpesvirusları

Sığır herpesvirusları, (BoHV'ler) sığırlarda çok sayıda klinik hastalığa neden olurlar. Bugüne kadar sığırlara özgü olarak 5 herpesvirus tespit edilmiştir (Çizelge 1.2). Alphaherpesvirinae alt grubunda Enfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis/Enfeksiyöz Vulvovaginitis (IBR-IPV) enfeksiyonunun etkeni BoHV-1, Bovine mammillitis etkeni BoHV-2, Bovine encephalitis etkeni BoHV-5, Gammaherpesvirinae alt grubunda BoHV-4, son yıllarda tespit edilen bovine lymphotropic herpesvirus (BoHV-6) bulunmaktadır. Ayrıca Alphaherpesvirinae alt grubunda yer alan elklerde enfeksiyona neden olan Elk Herpesvirus 1; Gammaherpesvirinae alt grubunda koyunlarda subklinik enfeksiyona neden olan bovine malignant kataral fever (MCF) etkenlerinden biri olan ovine herpesvirus 2 (OHV-2) ve antilop ilişkili MCF'ye neden olan alcelaphine herpesvirus 1 ve 2, (AlHV-1;-2) yine bu grupta yer alan sığırlarda enfeksiyona neden olan diğer herpesviruslardandır (Nandi ve ark., 2009).

Çizelge 1.2. Sığırlarda tespit edilen herpesviruslar ve neden oldukları klinik bulgular (Murphy ve ark., 1999).

Virus	Hastalık
Alphaherpesvirinae Alt familyası	
Bovine herpesvirus 1	Enfeksiyöz Bovine Rhinotracheitis (IBR), Enfeksiyöz Pustuler Vulvovaginitis (IPV), Enfeksiyöz Pustuler Balanopostitis (IPB), Abort
Bovine herpesvirus 2	Bovine Mammillitis, Pseudo-Lumpy Skin Disease
Bovine herpesvirus 5	Buzağılarda Encephalitis
Caprine herpesvirus 1	Genital Hastalığı ve fötal neonatal hastalıkları
Elk herpesvirus 1	Subklinik genital hastalığı
Gammaherpesvirinae Alt familyası	
Alcelaphine herpesvirus 1	Bovine Malignant Kataral Fever
Alcelaphine herpesvirus 2	Bovine Malignant Kataral Fever
Ovine herpesvirus 2	Bovine Malignant Kataral Fever
Bovine herpesvirus 4	Postpartum Metritis, Abort, Mastitis
Bovine herpesvirus 6	Bovine Lymphotropic virus

1.3. Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4)

1.3.1. Etiyoloji

BoHV-4, Herpesviridae familyasının Gammaherpesvirinae alt familyasında ve Rhadinovirus genusunda yer alan bir etkindir. Virus American Type Culture Collection (ATCC) tarafından biyogüvenlik seviyesi 2 patojenler içinde gruplandırılmıştır. BoHV-4'ün dünyada yaygın olarak görülen diğer sığır herpesvirusları ile antijenik ve biyolojik yakınlığı tespit edilmemiştir (Roizman ve ark., 1992). Yapılan serolojik çalışmalarda BoHV-4, BoHV-1 ve BoHV-2 ile antijenik olarak ilişkili bulunmamış; ayrıca BoHV-4'e karşı hazırlanan monoklonal antikorların BoHV-1 ve BoHV-2'ye karşı reaktiviteleri belirlenmemiştir (Gagnon ve ark., 2017).

BoHV-4 ilk olarak 1967 yılında Macaristan'ın batısında büyük bir işletmede, solunum sistemi problemleri ve keratokonjunktivitis görülen 1-4 aylık buzağılardan izole edilmiştir (Bartha ve ark., 1967). İzole edilen bu virus, BoHV-4 Avrupa

referans suşu Movar 33/63 olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Amerika’da solunum sistemi bulguları gözlenen 1.5 yaşında bir boğaya ait nazal swap örneğinden izole edilen BoHV-4 saha suşu, ABD referans suşu DN-599 olarak tanımlanmıştır (Mohanty ve ark., 1971). Ardından virus farklı ülkelerde konjuktivit, pneumonia ve üst solunum sistemi enfeksiyonları (Mohanty ve ark., 1971), deri lezyonları (Bellino ve ark., 2015), mammillitis (Reed ve ark., 1979), enteritis (Eugster, 1979), postpartum metritis (Parks ve Kendrick, 1973; Bilge Dagalp ve ark., 2010), kronik metritis (Wellmans ve ark., 1984) ve mastitis (Wellenberg ve ark., 2002) gibi klinik bulgulara sahip sığırlardan izole edilmiştir.

Virusun Amerika ve Avrupa’da izole edilen saha izolatları, bovine herpesvirus-3 (Eugster, 1979), bovid herpesvirus-4 (Ludwig, 1983), bovine herpesvirus type-5 (Anson ve ark., 1982) ve bovine herpesvirus type 4 (Guo ve ark., 1988) gibi farklı isimlerle tanımlanmıştır. Ancak 1972 yılında Smith yaptığı çalışmasında Movar 33/63, DN-599, FTC-2, DDV-7, V-11, CK-54 ve BPX-11’in farklı olduğunu ve bovine herpesvirus-5 olarak gruplandırılması gerektiğini belirtmiştir.

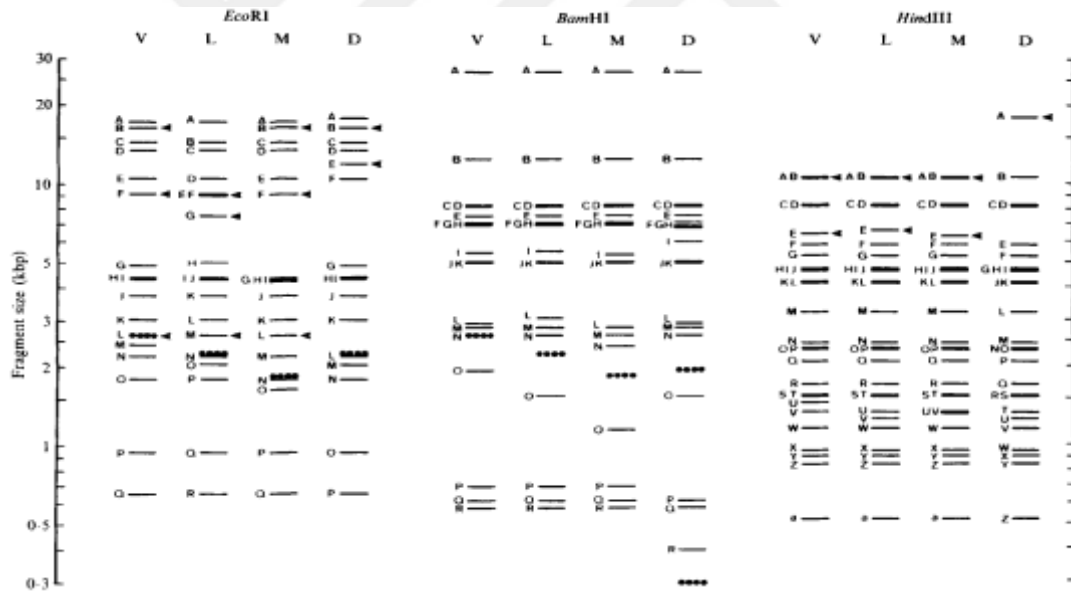
Daha sonra, ikiden fazla suş BoHV-4 grubuna eklenmiştir (Storz ve ark., 1984 ve Todd ve Storz, 1983). Bu izolatlar MCF etkeni BoHV-3’den farklı olduğundan sitomegalovirus olarak (CMV) isimlendirilmiştir. Storz ve ark. (1984), izole ettikleri iki suşu (66-P-347 ve 75-P-2756) diğer BoHV-4 suşları ile karşılaştırmışlar ve bovine CMV olarak nitelendirmişlerdir. Ayrıca Bartha ve ark. (1967), Amerika ve Avrupa’da izole edilen benzer virusları bovine herpesvirus tip-4 olarak isimlendirmiştir. Uluslararası bilimsel kurum (ISC) yeni ismi kabul ederek, söz konusu virusları Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) olarak adlandırmıştır.

Bu virusa ait 40 farklı suş tespit edilmiştir. Referans suşlar DN-599 (Amerika), Movar 33/63-like (Avrupa) ve Avrupa V. test suşları olarak kabul edilmektedir. Farklı BoHV-4 suşlarının ayrımı için Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), genellikle EcoRI, BamHI ve HindIII enzimleri ile yapılmaktadır. Virusun Long Unique (U_L) bölgesinde bulunan ApaI, BamHI, BanI, BglI, EcoRI, HinfI, NaeI, PstI, PvuII, SamI, SstII, StuI enzimleri ile de, polyrepetitive (pr) DNA bölgesinin

ayrımı gerçekleştirilmektedir. Heterolog virus populasyonları nedeniyle, bazen aynı suşun farklı izolatlarının RFLP sonucunda farklı prDNA kesimleri görülebilmektedir (Şekil 1.8; Bublot ve ark., 1990).

Ayrıca filogenetik analizde en sık kullanılan gen bölgeleri olarak ORF 6, 8, 9, 44, 46 ve 61-tüm herpesviruslar da olduğu gibi- bildirilmektedir. Kit ve ark. (1986), tarafından yapılan bir çalışmada izole edilmiş olan Feline herpesvirus-2 suşunun RFLP ve serolojik testler ile BoHV-4 olabileceği bildirilmiştir.

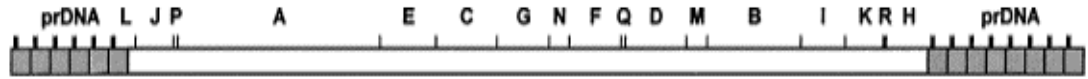
Farklı BoHV-4 suşları arasında immunfloresan testi ile ayırım yapmak imkansızdır (Şekil 1.9). Bu nedenle BoHV-4 suşlarının serolojik olarak aynı antijenlere sahip olduğu ifade edilmiştir (Kruger ve ark., 2015).



Şekil 1.9. BoHV-4'de RFLP tekniği ile suş ayırımı. Şekilde 4 farklı suşun kesimi (V: VL, L: LVR140, M: Movar 33/63 ve D: DN-599) gösterilmektedir (Bublot ve ark., 1990).

1.3.1.1. BoHV-4'ün Genom Yapısı

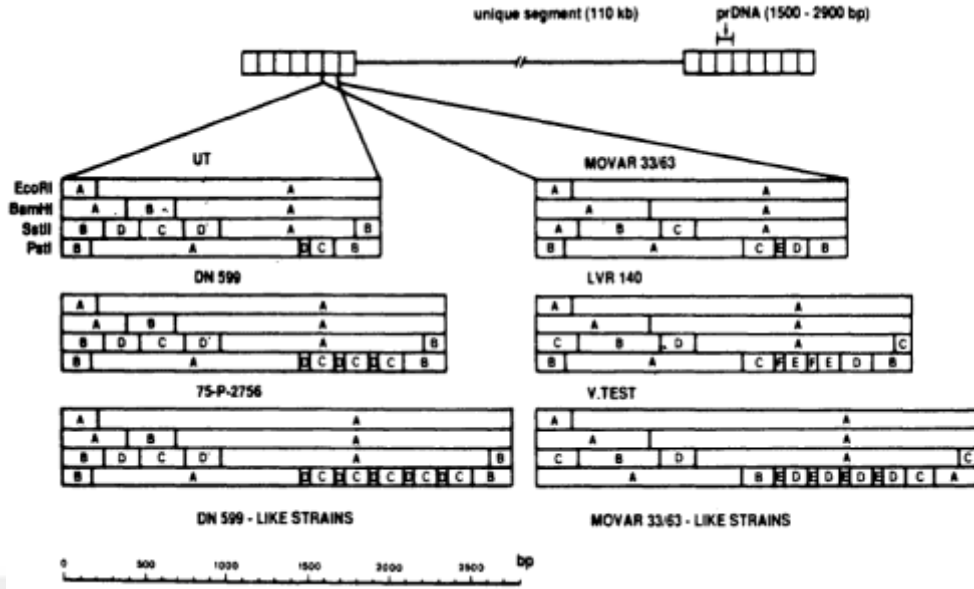
BoHV-4'ün linear çift iplikçikli DNA içeren B-tip genom yapısı 144 ± 6 kb büyüklükte ve 150 nm çapındadır. Ayrıca polyreplicative (pr) DNA da denilen, yüksek guanin-sitozin (G-C) içerikli tandem tekrarlarının çoklu kopyalarının her iki ucuna eşlik ettiği, 110 kb'lık düşük G-C içerikli tek bir merkezi alandan oluşmaktadır (Ehlers ve ark., 1985). Tahmini aminoasit dizinlerinin analizi, diğer herpesvirus genlerine homolog bazı BoHV-4 genlerini eşleştirmeye (mapping) olanak sağlamıştır (Şekil 1.10; Bublot ve ark., 1992).



Şekil 1.10. BoHV-4'ün genomik organizasyonu (Ehlers ve ark., 1985).

BoHV-4 genomunda iki farklı bölge bulunmaktadır:

1- Polyreplicative (pr) DNA elemanı (pac-1 and pac-2 HSV benzeri) ya da H-DNA (tandem repeat): BoHV-4 genomunda ortalama 15 prDNA bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler cleavage ve packaging bölgesi olarak virus replikasyonu için gerekli genlerden oluşmuştur; büyüklüğü 1450-2850 bp ve guanin-sitozin oranı %68 olarak tespit edilmiştir (Şekil 1.11). Bu bölgenin uzunluğu suşa bağlı olarak değişmiştir. Ayrıca prDNA bölgesinde ORF bulunmamaktadır ve latent durumlarda virus bu bölge yoluyla hücresel DNA'ya epizomal şekilde bağlanır. Bazı çalışmalarda bu bölgede oriP (Latency associated replication) bulunmuştur (Ehlers, 1985).



Şekil 1.11. BoHV-4'ün farklı suşlarının prDNA bölgesinin RFLP ile ayrımı (Collins ve ark., 2002).

2- Long unique genom bölgesi (LUR, 108,873 bp) ya da L-DNA: BoHV-4 genomunun LUR bölgesinde en az 79 ORF bölgesi (Viral enzimler, Glikoproteinler, replikasyon orijini, IE transkript ve L transkript) bulunmaktadır. Bu bölgenin G-C oranının düşük olduğu (%42) tespit edilmiştir (Zimmermann ve ark., 2001).

Ayrıca BoHV-4 virusuna ait, OriP (latentik döneminde) ve OriLyt (Litik döneminde: Bo12, Bo11 ve R2b) olarak 2 farklı replikasyon orijini tespit edilmiştir. LUR bölgesinde iki farklı çoklu tekrar bölgeleri- R1 ve R2- bulunmaktadır. R1 bölgesinde 23, 25 ve 65 bp'lik direkt tekrar bölgeleri tespit edilmiştir. Ancak R2 bölgesinde bu direkt tekrar sayısı ikiye (R2a ve R2b) inmektedir. Yapılan araştırmalarda R2b bölgesinde oriLyt, saç tokası ilmek (hairpin loop) yapısında tespit edilmiştir (Collins ve ark., 2002).

BoHV-4 de tüm herpesviruslar gibi ekspresyon zamanına göre 3 farklı gen grupları, çok erken (Immediate-early, IE) genler (IE1 ve IE2), erken (Early, E) genler ve geç (Late, L) genler bulunmaktadır. IE genlerden oluşan proteinler enfekte hücrelerde eksprese olmaktadır ve hücrel transkripsiyon faktörleri ile viral transkripsiyonlar gerçekleştirilmektedir. Bu proteinler E ve L genlerin

transkripsiyonları için gereklidir (Franceschi ve ark., 2011a). E genlerin ekspresyonu ile viral enzimler ve viral DNA replikasyonu için gerekli olan proteinler oluşmaktadır. Geç genlerin arasında bazı yapısal ve yapısal olmayan proteinler (tegument ve glikoproteinler) yer almaktadırlar (Donofrio ve ark., 2009).

BoHV-4 genomunda 79 adet ORF'dan (ORF1-ORF79) 62'sinin diğer rhadinovirüsler ile homolog olduğu tespit edilmiştir; 17'si (Bo1-Bo17) ise sadece BoHV-4'de bulunmaktadır (Sciortino ve ark., 2000). Gammaherpesvirüsler arasında Bo17'nin sadece BoHV-4'de varolduğu ortaya konmuştur. Bu ORF'dan eksprese olan protein viral β -1,6-N-asetilglukozaminiltransferaz (β -1,6GnT), virusun hücrel immun yanıtı kaçmasını sağlamaktadır (Lete ve ark., 2016).

Genel olarak tespit edilen ORF'lardan yapısal (kapsit, tegument ve glikoproteinler) ve yapısal olmayan viral proteinler eksprese olmaktadır. Bugüne kadar BoHV-4 için 9 kapsit proteini bulunmuştur (Şekil 1.12). Kapsit proteinleri ORF17 (minor scaffold protein-proteaz), ORF17.5 (major scaffold protein), ORF19 (capsid vertex-specific complex protein), ORF25 (PF03122 major capsid protein), ORF26 (triplex component), ORF32 (capsid vertex-specific complex protein), ORF43 (capsid portal protein), ORF62 (triplex component) ve ORF65 (small capsomer interacting protein) olarak tespit edilmiştir (Lete ve ark., 2012b).

ORF	Protein description	pK ^c	Gamma-herpesvirinae				Alpha-herpesvirinae		Beta ^b	
			Rhadinoviruses			Maca ^b	Lymph ^b	Simplex ^b	Varicel ^b	Cyto ^b
			KSHV ^d	MuHV-4 ^d	RRV ^d	AIHV-1 ^d	EBV ^d	HSV-1 ^d	PRV ^d	HCMV ^d
<i>Capsids</i>										
ORF 17	minor scaffold protein (protease)	+	ORF17	ORF17	ORF17	ORF17	BVRF2	UL26	UL26	UL80
ORF 17.5	major scaffold protein	+	ORF17.5	ORF17.5	ORF17.5	ORF17.5	BdRF1	UL26.5	UL26.5	UL80.5
ORF 19	capsid vertex-specific complex protein	+	ORF19	ORF19	ORF19	ORF19	BVRF1	UL25	UL25	UL77
ORF 25	major capsid protein	+	ORF25	ORF25	ORF25	ORF25	BcLF1	UL19	UL19	UL86
ORF 26	triplex component	+	ORF26	ORF26	ORF26	ORF26	BdLF1	UL18	UL18	UL85
ORF 32	capsid vertex-specific complex protein	+	ORF32	ORF32	ORF32	ORF32	BGLF1	UL17	UL17	UL93
ORF 43	capsid portal protein	+	ORF43	ORF43	ORF43	ORF43	BBRF1	UL6	UL6	UL104
ORF 62	triplex component	+	ORF62	ORF62	ORF62	ORF62	BORF1	UL38	UL38	UL46
ORF 65	small capsomer interacting protein	+	ORF65	ORF65	ORF65	ORF65	BFRF3	UL35	UL35	UL48.5

Şekil 1.12. BoHV-4' ün kapsit proteinleri (Lete ve ark., 2012b).

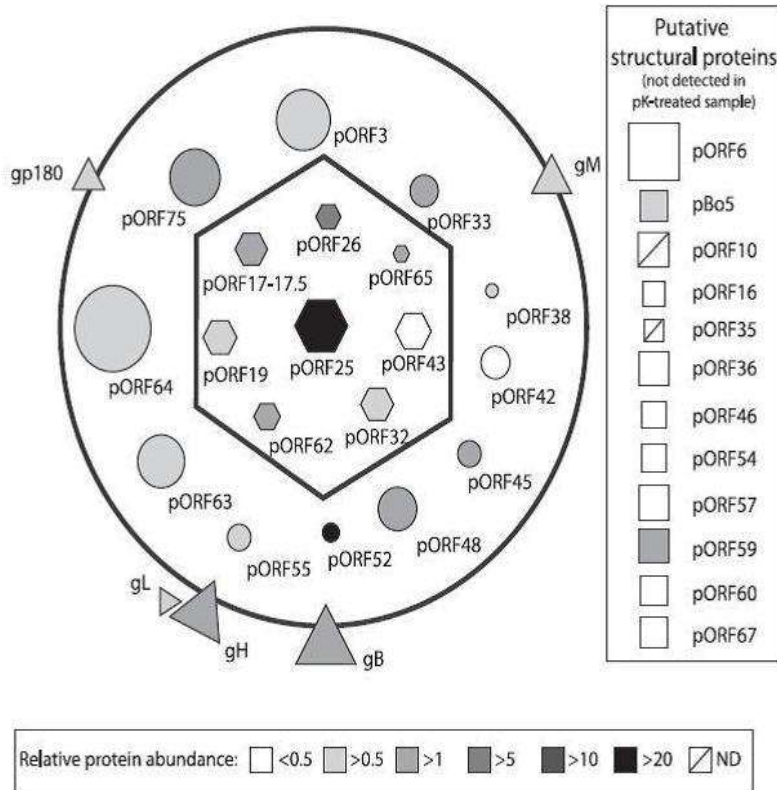
Ayrıca, BoHV-4'ün yapısında 4 major glikoprotein tespit edilmiştir. Birincisi gp6/gp10/gp17 (150kDa/120kDa/51kDa) hücre içersinde gB'nin proteolitik kesimi sonrasında meydana gelmektedir. Bu kompleks proteinde 3 nötralizan antikor domaini tespit edilmiştir. İkinci major glikoprotein olarak gp11/VP24 (120kDa/16,5 kDa) tanımlanmıştır (Dubuisson ve ark., 1989). Üçüncü olarak gp8 (135kDa) hem virusun zarfında, hem de hücre kültürü supernatantında tespit edilebilmektedir. Glikoprotein 8, geç protein olarak antikor yanıtının engellenmesinde rol oynamaktadır. Son olarak gp1 (>300kDa) geç protein olarak isimlendirilmiştir (Dubuisson ve ark., 1991).

Heterodimer yapıdaki glikoprotein B (gB), ORF8 geninden eksprese olurken, hücresel heparan sülfat ile bağlanıp virusun hücreye girmesini sağlamaktadır (Franceschi ve ark., 2013). Glikoprotein 180 (gp180), Bo10 geninden eksprese olmaktadır. Bu glikoproteine ait yoğun glikan miktarının, virüsü nötralizan antikorlara karşı koruduğu bildirilmiştir (Machiels ve ark., 2011). Esansiyel olmayan glikoprotein L (gL), ORF47'den eksprese olmakta ve gH ile dimerik bir yapı oluşturmaktadır. Bu gL-gH dimer yapı, gB gibi hücresel reseptörlere bağlanıp, virusun hücreye girişinde görev almaktadır. Yapılan bir çalışmada, BoHV-4'deki bu gL-gH dimerik yapı, en önemli nötralizasyon hedef bölgesi olarak tespit edilmiştir (Lete ve ark., 2012a). Ayrıca virusun yapısında gH, gM ve gN glikoproteinleri de bulunmuştur (Kurjogi ve Kaliwal, 2014 ve Lete ve ark., 2012a).

Lete ve ark. (2012b), tarafından yapılan bir çalışmada, BoHV-4'e ait 15 farklı tegument proteini tespit edilmiştir (Şekil 1.13). En önemli BoHV-4 tegument proteinlerinin arasında timidin kinaz, ORF52, ORF38 ve ORF42 (UL7-like protein) yer almaktadır (Çizelge 1.3; Lete ve ark., 2012b; Mettenleiter ve ark., 2009 ve Wang ve ark., 2012). Tüm herpesvirusların litik döneminde ORF21 geninden eksprese olan timidin kinaz proteini bir esansiyel tegument proteini olarak kabul edilmektedir (Lomonte ve ark., 1992). Dolayısıyla yabancı gen bölgelerinin aktarılmasında, uygun bir gen bölgesi olarak görülmektedir (Donofrio ve ark., 2008).

Çizelge 1.3. BoHV-4' ün önemli tegument proteinleri.

Viral genler	Rolü
ORF3	Tegument protein
ORF6	Single stranded DNA binding protein
ORF10	dUTPase related protein
ORF16	BORFB2
ORF33	Teg. Myristoylated protein binding protein
ORF35	Potential tegument protein
ORF36	Kinase
ORF38	Tegument myristoylated protein
ORF42	Potential tegument protein
ORF45	IRF7 binding protein
ORF46	Uracyl DNA glycosylase
ORF48	Potential tegument protein
ORF52	Tegument protein
ORF54	dUTPase
ORF55	Tegument palmitoylated protein

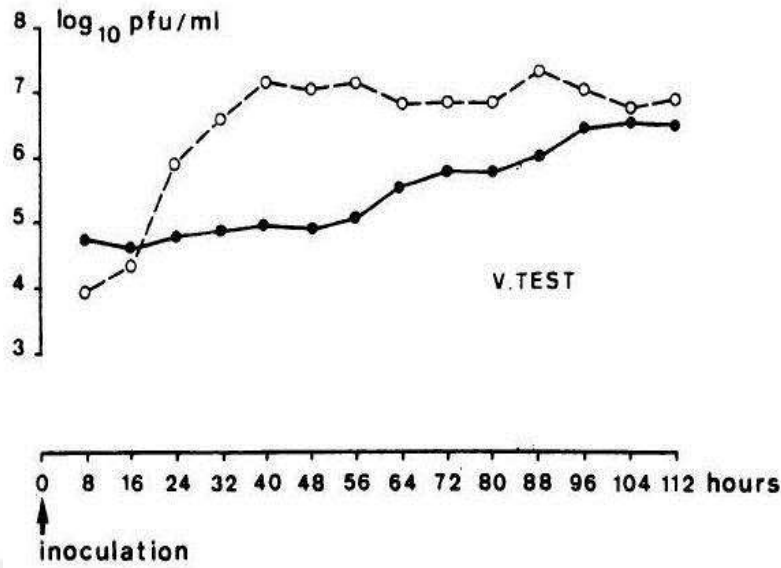


Şekil 1.13. BoHV-4' ün kapsit, tegument ve zarf proteinlerin düzeni (Lete ve ark., 2012b).

1.3.1.2. BoHV-4'ün Fiziksel, Kimyasal ve İnvitro Üreme Özellikleri

BoHV-4 partiküllerinin yoğunluğu %20-65 sukrozda 1.2 g/cm³ olarak tespit edilmiştir. Virus pH.3, %20 eter ve %20 kloroforma karşı duyarlıdır. Ayrıca 50°C'de 30 dakika içerisinde inaktif hale gelmektedir (Bartha ve ark., 1967).

Diğer Beta- ve Gammaherpesvirusların aksine, BoHV-4 çok çeşitli hücre kültürlerinde (sığır, koyun, keçi, köpek, kedi, tavşan, domuz) çoğalabilmektedir (Gillet ve ark., 2005a). BoHV-4 replikasyonu sığır kökenli tüm primer ve devamlı hücre kültürlerinde gerçekleşmektedir. Özellikle böbrek, testis, akciğer, nasal turbinata, B ve T lenfositler, makrofaj kökenli hücreler, Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), Georgia Bovine kidney (GBK) (Şekil 1.14), Bovine Embryonic Kidney (BEK) hücre kültürleri virusu üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca manda, koyun, keçi, domuz, kedi, köpek, tavşan, at ve fare gibi farklı hayvan orijinli hücre kültürlerinde de virus üreyebilmektedir (Bartha ve ark., 1967 ve Markine-Goriaynoff ve ark., 2003). Virusun DN-599 suşu, vizon akciğerinde ve gelincik böbrek hücrelerinde de üreme göstermiştir (Peterson ve Goyal, 1988). Bir çalışmada, virusun insan kökenli hücrelerde de (MRC-5) replike olabildiği tespit edilmiştir (Egyed, 1998). Diğer taraftan virus, makrofaj hücrelerinde (BoMac) persiste olarak bulunmaktadır (Donofrio ve ark., 2001).



Şekil 1.14. BoHV-4'ün V.TEST suşunun GBK (Georgia Bovine Kidney) hücresinde tek basamaklı çoğalma eğrisi (Markine-Goriaynoff ve ark., 2003).

Virus bazı insan kökenli hücrelerde üretilebilmiş ise de, bugüne kadar insanda hastalık yaptığına dair bir bildirim bulunmamaktadır. Virusun hücreye girişinde ilk olarak hücresel heparan sülfat reseptörlerine bağlanması nedeniyle geniş konakçı hücre spektrumuna sahip olabileceği bildirilmiştir (Şekil 1.15; Egyed, 1998).

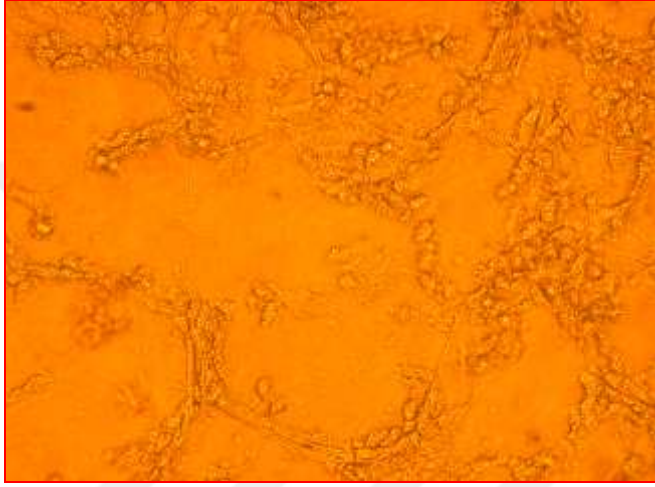
Cell line	ATCC no. or reference	Cell type	BHV-4 growth at PID 7		
			Increase of viral DNA compared to control (PCR)	Titer	Presence of inclusions
MRC-5	CCL 171	Embryonic diploid lungs	10 ⁴	10 ²	+
WI-38	CCL 75	Embryonic lung	10 ⁴	10 ⁴	+
U937	CRL 1593	Histiocytic lymphoma			
THP-1	TIB 202	Monocytic leukemia			
CEM-CM3	TIB 195	Lymphoblastic leukemia			
UAC	17	Amniotic cell			
Jurkat	21	T-cell leukemia			
293	CRL 1573	Embryonic kidney			
CACO-2	HTB 37	Colonic adenocarcinoma			
HeLa	CCL 2	Cervical epithelioid carcinoma			
HEp-2	CCL 23	Epidermoid carcinoma, larynx			
Namalwa	CRL 1432	Burkitt's lymphoma, lymphoblastoid B cell			
SK-N-SH	HTB 11	Neuroblastoma			
McCoy ^a	CRL 1696	Fibroblast			
Brain endothelium ^b					
Glioblastoma giant-cell ^b			10 ⁴	10 ⁴	+
Glioblastoma multiforme ^b 3					
MDBK	CCL 22	Bovine kidney	10 ⁴	10 ⁵	+

^a Mixed McCoy A (human) and B (mouse) cells.

^b Primary cell cultures.

Şekil 1.15. BoHV-4'ün invitro olarak çoğaldığı insan hücreleri (Egyed, 1998).

Yapılan çalışmalarda virusun yavaş replikasyonu, hücre replikasyonu ile ilişkilendirilerek açıklanmaya çalışılmıştır (Storz ve ark., 1984); ayrıca virusun replikasyonu ve geç protein ekspresyonunun hücre replikasyonuna ve S fazına bağlı olduğu ifade edilmiştir. Hücre kültüründe enfeksiyonu izleyen 48-72 saatten itibaren hücre yuvarlaklaşması ile karakterize CPE görülmektedir (Şekil 1.16; Bilge-Dagalp ve ark., 2007).



Şekil 1.16. BoHV-4 CPE' si (İzolat K.339 X 400; 4.gün) (Bilge-Dagalp ve ark., 2007).

Gammaherpesviruslar latent kalmayı litik döneme girmekten daha fazla tercih etmektedirler. Rhadinoviruslarda litik dönemde viral DNA enfekte hücrenin çekirdeğine geçmekte ancak alfa ve beta genlerin transkripsiyonları gerçekleşmemektedir. Bu durumda viral DNA epizomal şekilde hücre nükleusunda barınmaktadır. Hücre bölünmesi sırasında bu sirküler viral epizomlar, bölünen hücrelere de geçmektedirler. BoHV-4'de bu görevi ORF73 tarafından kodlanan protein gerçekleştirmektedir. Yapılan bir çalışmada bu bölgenin viral genomdan uzaklaştırılması (silinme ile-deletion) ile elde edilen mutant virusların, replikasyonda sorun yaşamadıkları ancak latent kalma özelliklerini kayb ettikleri gösterilmiştir (Thirion ve ark., 2010).

1.3.2. Epidemiyoloji

1.3.2.1. Bulaşma

Sığır herpesvirusları genelde horizontal ve vertikal yollar ile bulaşırlar. Horizontal bulaşma, hayvanların nemli ve kontamine yüzeyler ile yakın temasta bulunması ile meydana gelmektedir. Vertikal bulaşma ise, gebelik döneminde virusun plasenta yoluyla fötusa ulaşması sonrasında fötusun enfeksiyonu şeklinde gelişir (Romera ve ark., 2014). Sığır herpesvirusları, vücuttan saçıldıktan sonra kısa sürede güneş ışığı ve kurumayla inaktive olurlar. BoHV-4 üst solunum yollarını hedef olarak seçer ve oküler enfeksiyon da tabloya eşlik edebilir (Bartha ve ark., 1967; Bellino ve ark., 2015 ve Smith ve ark., 1972). Virusun saçılmasında en etkili materyaller nasal, oküler ve vajinal salgılar olarak görülmektedir. BoHV-4 enfeksiyonun diğer olası hedef bölgeleri ürogenital sistem, meme bezleri ve sindirim sistemidir. BoHV-4'ün sütte bulunabildiği ve bu yolla anneden yavruya geçtiği gösterilmiştir (Donofrio ve ark., 2000a). BoHV-4 orchitis ve azospermiye neden olur; dexamethason uygulanmasından sonra epididimisten etken izole edilmiştir (Dubuisson ve ark., 1989). Virusun spermadan izole edilememesine rağmen, bu yolla yayılabildiği düşünülmektedir (Graham ve ark., 2005). Embriyo transferi virusun geçişinde önemli bulunmamıştır (Chastant-Maillard, 2015).

1.3.2.2. Konakçı Spektrumu

BoHV-4 için geniş bir konakçı spektrumu tanımlanmıştır. Virus sığır, Afrika mandası (*Syncerus caffer*), Amerikan bizonu (*Bison bison*), zebu (*Bos indicus*), koyun, keçi, aslan ve kedilerde doğal enfeksiyona neden olmakta; tavşanlarda da deneysel enfeksiyon oluşturabilmektedir. Yapılan çalışmalarda Afrika mandalarında BoHV-4 enfeksiyonunun seroprevalansı yüksek bulunmuş; bu nedenle mandaların BoHV-4 için doğal konakçı olabileceği bildirilmiştir. Deneysel çalışmalarda BoHV-4 replikasyonunu yüksek oranda desteklediği için genel olarak tavşan kullanılmaktadır.

Tavşanda enfeksiyon oluşumu için intravenöz, intravajinal veya konjuktival yollar önerilmektedir (Osorio ve ark., 1982). Hamster, fare, rat, kobay ve civcivlerde yapılan deneysel BoHV-4 enfeksiyonları başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Gibbs ve Rweyemamu, 1977). Çeşitli çalışmalar evcil kedilerin, BoHV-4 ile doğal olarak enfekte olabileceğini göstermiştir (Chiu ve ark., 2017 ve Rich ve ark., 1969). Deneysel olarak BoHV-4 ile enfekte edilmiş kedilerde idrar yolunda klinik belirtiler görülmüş; bu nedenle BoHV-4 ile doğal enfeksiyonun kedilerin alt üriner sistem hastalıkları ile ilişkili olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Troyer ve ark., 2014). Yaban hayvanlarının, BoHV-4'ün epidemiyolojisinde önemli bir role sahip olmadıkları bildirilmiştir (Thiry ve ark., 1989).

1.3.2.3. Coğrafik Yayılım

Virusun ilk izolasyondan bu yana BoHV-4 enfeksiyonu çeşitli ülkelerde tespit edilmiş ve farklı semptomlarla ilişkilendirilmiştir. Enfeksiyonun seroprevalansının sığır populasyonunun %4.2-%30'u olduğu tahmin edilmektedir (Graham ve ark., 2005).

Bilge-Dagalp ve ark. (2007), yaptığı bir çalışmada 2 yaşından küçük sığırlarda seroprevalans oranı %42 olarak tespit edilirken, 2 yaşından büyük sığırlarda %62 olarak belirlenmiş ve BoHV-4 ile ilgili seroprevalans oranının yaşa bağlı olarak arttığı bildirilmiştir.

Zaire'de yapılan bir çalışmada örneklenen sığırların yaklaşık %70'nin BoHV-4 antikorları yönünden pozitif olduğu ortaya konulmuştur (Kruger ve ark., 2015).

Türkiye'de BoHV-4 enfeksiyonunun varlığının ve çeşitli klinik semptomlarda etiyolojik ajan olarak rolünün araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Bilge-Dagalp, 2007, 2008; Gur ve Dogan, 2010; Kale ve ark., 2011; Nak ve ark., 2011; Tuncer-Goktuna ve ark., 2016 ve Yıldırım ve ark., 2011).

Bilge-Dagalp ve ark. (2007), Türkiye’de ilk kez BoHV-4 enfeksiyonunun varlığını serolojik ve virolojik olarak ortaya koymuşlardır. Söz konusu çalışmada, Türkiye'nin üç farklı bölgesinde bulunan ve fertilité problemleri bildirilen 6 süt sığırcılığı işletmesinden alınan 877 sığır kan serum örneği BoHV-4 antikorları yönünden test edilmiş ve %54.3 oranında pozitiflik tespit edilmiştir.

Gur ve Dogan (2010), döl tutmayan 273 inek serumunu BoHV-4 varlığı yönünden test etmişler ve %69 oranında seropozitivite belirlemişlerdir.

Bilge-Dagalp ve ark. (2010), özellikle kronik ve post-partum metritis olguları bildirilen bir sürüde BoHV-4 varlığını serolojik ve virolojik olarak araştırmışlardır. Örneklenen hayvanların %69.6’sı (256/368) BoHV-4 antikorları yönünden pozitif olarak belirlenirken; alınan vajinal swap örneklerinde PCR ile %29.1 (16/55) oranında viral nükleik asit varlığı tespit edilmiştir.

Kale ve ark. (2011), döl tutma problemi olan sürülerden sağladıkları örnekleri ELISA ile BoHV-4 antikor varlığı yönünden test etmişler ve %53,7 oranında seropozitiflik belirlemişlerdir.

Yıldırım ve ark. (2011), Kars ve çevresinde abort yapmış sığırlardan alınan serum örneklerinde BoHV-1, BoHV-4 ve BVDV viruslarının rolünü araştırmışlar ve %52.9 oranında BoHV-4 yönünden seropozitiflik tespit etmişlerdir.

Yine abort yapmış hayvanlarda üç virusun varlığını araştıran başka bir çalışmada kontrol edilen serum örneklerinin % 28.78’sinde BoHV-4 antikor varlığı belirlenmiştir (Tuncer-Goktuna ve ark., 2016).

1.3.3. Patogenez

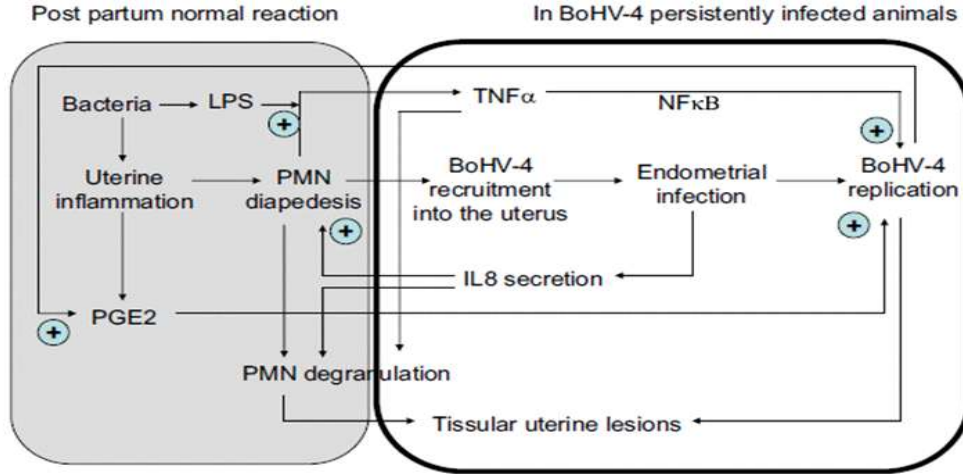
Doğal enfeksiyon solunum ve sindirim sistemi yolu ile oluşmaktadır. Virus organizmaya girdikten sonra ilk olarak larenks, trakea, bronşiyol ve bağırsak epitel hücrelerinde replike olur. Aseptomatik sığırlarda virus aylarca kan lökositleri, dalak ve lenf yumrularından izole edilebilmektedir (Osorio ve ark., 1982).

BoHV-4 ilk replikasyondan sonra periferik kan lökositlerinde, monosit ve makrofaj hücrelerinde çoğalıp, bu hücreler yoluyla vücuda dağılmaktadır. Enfekte hayvanların kanında, enfeksiyondan 10-30 gün sonra viral DNA tespit edilebilmektedir (Egyed ve ark., 1999).

BoHV-4 enfeksiyonlarında her zaman viremi dönemi görülmemektedir. Virusun tercih ettiği replikasyon bölgeleri arasında konjunktiva, üst solunum yolu mukozası ve genital mukoza bulunmaktadır. Laboratuvar koşullarında enfekte tavşanlarda BoHV-4 aktif olarak dalak ve makrofajlarda replike olmaktadır (Donofrio ve ark., 2007b).

Egyed ve ark. (2011), yaptıkları bir çalışmada virusun intrauterin yol ile anneden fetusa geçtiğini ve daha sonra fetusların farklı dokularından izole edildiğini bildirmişlerdir.

Genel olarak virusun postpartum metritisde diğer bakteriler ile birlikte ko-faktör olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Sığır uterus lümeni, çevresel bakteriler (*E. coli* ve *T. pyogenes*) tarafından buzağılamadan kısa bir süre sonra kontamine olur ve Toll Like reseptörler (TLR) tarafından endometrium hücrelerinde bu bakteriler tanınır, inflamasyon sitokinlerinin salınımına neden olur. Bu durumda en önemli sitokinler TNF-alfa ve IL-8 olarak tespit edilmiştir. Salınan sitokinler makrofajların uterus lümenine gelmesini sağlar ve makrofajlar BoHV-4 ile enfekte olduğu durumda ortamda virusun çoğalmasına neden olur (Şekil 1.17; Aslan ve ark., 2015 ve Chastant-Maillard, 2015).



Şekil 1.17. Postpartum dönemde patojen bakterilerin BoHV-4 ile ilişkisi (Chastant-Maillard, 2015).

Alpha ve betaherpesviruslarda olduğu gibi gammaherpesviruslar da, primer olarak enfekte ettiği konakçıda latent olarak kalabilmektedir (Belak ve Palfi, 1974). Virusun latentlik bölgesi olarak lenfoid dokular ve mononükleer kan hücreleri gösterilmektedir (Osorio ve Reed, 1983). Latent viruslar genellikle sinir sistemi, lenf yumruları, üst solunum yolu, akciğerler, kemik iliği ve konjunktivada bulunmaktadır (Boerner ve ark., 1999). Ancak dalak makrofajları latent viruslar için en önemli rezervuar alan olarak kabul edilmektedir. Bu latent durum hem doğal konakçıda, hem de deneysel enfeksiyonlarda tavşanlarda görülmektedir. İn vivo olarak sığırlarda reaktivasyon deksametazon uygulamasıyla gerçekleşebilir ancak tavşanlarda deksametazon ile reaktivasyon tespit edilmemiştir. Enfekte hücre kültüründe latent viruslar, genellikle sirküler epizomal formda bulunmaktadırlar. Bazen bu latent viruslar spontan olarak reaktif olarak enfekte hücrelerin ölmesine neden olabilmektedirler. Latentlik döneminde, hücre kültürlerinin vasatına sodyum bütitrat ya da forbol esterler eklenirse, viruslar reaktif olup litik dönem başlayabilir (Sun ve ark., 1999). BoHV-4, doğum sırasında kan kortizol düzeyinin artışı ve bu periyot ile ilişkili çeşitli streslere bağlı olarak reaktif olmaktadır (Graham ve ark., 2005).

1.3.4. Klinik Belirtiler

BoHV-4 hem farklı klinik belirtiler gösteren hayvanlardan, hem de sağlıklı görünümlü asemptomatik hayvanların çeşitli sekret ve ekskretlerinden izole edilmiştir (Donofrio ve ark., 2007a ve Monge ve ark., 2006). Virus özellikle reproduktif problemlerde sorumlu olarak kabul edilmektedir. Ayrıca BoHV-4, kan mononükleer hücrelerini enfekte ederek vasküler endotel, meme dokusu, endometriyum ve fetal dokular için spesifik bir tropizm gösterir (Donofrio ve ark., 2007a).

Abort problemi bulunan sürülerde BoHV-4'ün seroprevalansının yüksek olduğu tespit edildiğinden, abort problemlerinde virusun etiyolojik ajan olarak rol oynayabileceği bildirilmiştir (Chastant-Maillard, 2015; Czaplicki ve Thiry., 1998; Monge ve ark., 2006 ve Yıldırım ve ark., 2011). Virus aborte fetusların dalak lenfositleri ve monositlerinde, bazen de hepatik Kupfer hücreleri ile renal tübüllerde bulunmuştur (Deim ve ark., 2007). Plasental bulaşma oldukça sınırlı görülmektedir (Egyed ve ark., 2011). Bazı abort olgularında BoHV-4'ün BVDV ile ilişkisi de gösterilmiştir (Bilge-Dagalp ve ark., 2011 ve Reed ve ark., 1979). BoHV-4 üst solunum yollarını hedef olarak seçer ve oküler enfeksiyon da tabloya eşlik edebilir. BoHV-4 enfeksiyonun diğer olası hedef bölgeleri ürogenital sistem, meme bezleri ve sindirim sistemidir (Donofrio ve ark., 2008).

BoHV-4'ün sütte bulunabildiği ve bu yolla anneden yavruya geçtiği gösterilmiştir (Donofrio ve ark., 2007b ve Wellenberg ve ark., 2002). Virusun özellikle subklinik mastitisde rol oynadığı bildirilmiştir. Graham ve ark. (2005), mastitis görülen 10 sürüden 4'ünde mastitisin meydana geldiği sırada devam eden BoHV-4 enfeksiyonu olduğunu tespit etmişlerdir. BoHV-4'ün sığır mastitisindeki rolünü araştırmak için yapılan deneysel bir çalışmada, laktasyondaki ineklerin BoHV-4 ile eş zamanlı intramammar ve intranasal inokulasyonu sonrasında klinik mastitis tespit edilememiştir (Wellenberg ve ark., 2001). İneklerde BoHV-4 antikollarının varlığı ile *S. aureus*un neden olduğu sığır mastitisinin insidansı arasında pozitif bir ilişki kaydedilmiştir (Zadoks ve ark., 2001). Başka bir çalışmada,

mastitisli meme dokusunda PCR ile BoHV-4 viral DNA'sı tespit edilmiştir (Izumi ve ark., 2006). BoHV-4 klinik mastitisin etiyolojisinde primer meme patojeni olarak önemli bir rol oynamasa bile, subklinik mastitis vakalarında indirekt olarak rol oynayabilmektedir (Wellenberg ve ark., 2002).

BoHV-4 ayrıca metritisli hayvanların uterus sıvısından diğer uterus patojenleri olan bakteri türleriyle (*Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.*, *Citrobacter*) birlikte tespit edilmiştir (Nak ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada, BoHV-4 fertilité problemli ineklerin uterusundan %87 oranında izole edilmiştir (Fabian ve ark., 2008). Benzer çalışmaların sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, BoHV-4, uterusda post-partum dönemde inflamasyon gelişmesinde bir ko-faktör olarak düşünülmektedir (Areda ve ark., 2018; Frazier ve ark., 2001; Jacca ve ark., 2013; Klamming ve ark., 2017; Monge ve ark., 2006 ve Nak ve ark., 2011).

Yapılan bir çalışmada DN-599 suşu diyareli bir sığırın gaitasından izole edilmiştir. Bu hayvanda başka bir parazit ya da bakteri bulunmamıştır. Ancak bu izolat kullanılarak yapılan deneysel enfeksiyon çalışmasında aynı sonuç alınamamıştır (Eugster, 1979).

Virusun lenfoid dokulara olan tropizmi bilinmektedir. Bu nedenle bazı çalışmalarda Malignant Catarrhal Fever (MCF) materyallerinden de izole edilmiştir (Todd ve Storz, 1983). Ancak tekrar BoHV-4 ile yapılan deneysel enfeksiyon sonrasında MCF benzeri semptomlar tespit edilememiştir (Bellino ve ark., 2015).

1.3.5. Tanı

1.3.5.1. Virolojik Tanı

BoHV-4 birçok hücre tipine affinite göstermesine rağmen izole edilebilmesi zor olan (Bublott ve ark., 1990 ve Thiry ve ark., 1998) ve diğer herpesvirusların

aksine yavaş üreyen, belirgin bir CPE göstermeyen bir virusdur (Wellenberg ve ark., 2001). Ayrıca virusun dış şartlara dayanıklı olmamasından dolayı laboratuvara ulaştırılınca kadar inaktive olabilmesi, materyallerde enfeksiyöz partiküllerin olmaması, örneklerdeki yoğun kontaminasyonlar (sekonder enfeksiyonlar nedeniyle) ve virus üremesinin hücrenin üreme siklusuna bağımlılık göstermesi gibi nedenler de izolasyon çalışmalarını olumsuz etkileyen diğer faktörlerdir (Naeem ve Goyal, 1990).

Virus izolasyonu amacıyla sığır orijinli hücre kültürlerinden MDBK, bovine turbinata (BT), bovine embriyonal kidney (BEK) hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Virus izolasyonu sonrası, BoHV-4 saha suşları arasındaki farklılığı belirlemek için restriksiyon endonükleaz analizleri kullanılmaktadır (Bublot ve ark., 1990 ve Thiry ve ark., 1998).

BoHV-4 ile enfekte hayvanlarda virus kan mononükleer hücreleri ve lenfoid organlardan izole edilmiştir. Postpartum metritis bulguları saptanan sığırlarda virus uzun zaman uterus sekresyonlarında bulunmaktadır (Wellems ve ark., 1984). Solunum sistemi problemleri hayvanlarda nasal swap virus izolasyonu amacıyla kullanılmaktadır. İzole edilmiş virusların doğrulanması amacıyla direkt IF tekniği ve PCR testlerinden yararlanılmaktadır (Donofrio ve ark., 2008).

Özellikle son yıllarda hızla gelişen moleküler tanı yöntemleri arasında en yaygın kullanılan PCR tekniği ile TK veya gB genlerinin hedeflenmesi suretiyle, viral DNA'nın in vitro amplifikasyonuna dayanan testlerdir (Egyed ve ark., 1998 ve Wellenberg ve ark., 2002). PCR da en çok çalışılan bölge glikoprotein B'yi kodlayan gen bölgesidir (Goltz ve ark., 1994). Wellenberg ve ark. (2001), gB PCR ile, bir klinik örnekte 2-10 BoHV-4 DNA kopyası olduğunda, viral DNA'nın tespit edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada, ayrıca gB PCR ve virus izolasyonunu karşılaştırmalı olarak değerlendirmişler, gB PCR ve virus izolasyon yöntemlerinin sensitivitesini sırasıyla %93 ve %61 olarak belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra Wellenberg ve ark. (2001), süt örneklerinde viral DNA tespiti amacıyla

geliştirdikleri timidin kinaz nested PCR'ın, süt örneklerinde BoHV-4 DNA'sının tespitinde gB PCR'dan 2 kat daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

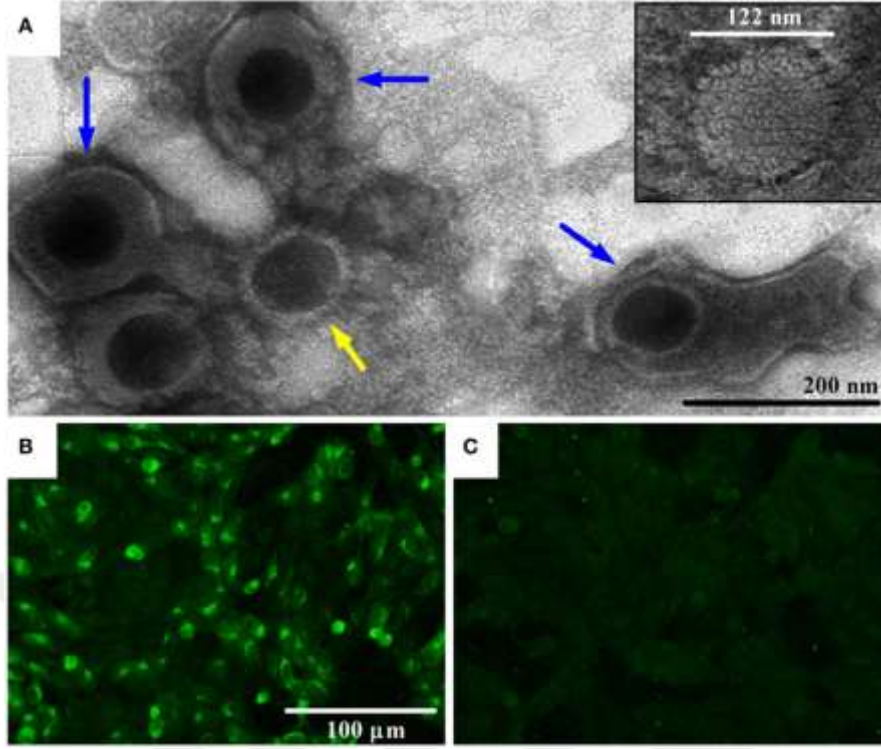
Organ ve dokulardaki viral DNA'nın saptanması için, DNA hibridizasyon metodu kullanılabilse de, rutin tanıda pratik değildir (Galik ve ark., 1993). Virusun 66-p-347 suşunun tam genomu ve diğer BoHV-4 suşlarının timidin kinaz (Lomonte ve ark., 1992), glikoprotein B (Goltz ve ark., 1994), erken genler ve pr-DNA'sı sekanslanmıştır (Zimmermann ve ark., 2001).

1.3.5.2. Serolojik Tanı

Doğal enfeksiyonlarda düşük aviditeli nötralizan antikor oluşumundan dolayı, virus nötralizasyon testi antikor belirlemek için uygun bir metot değildir (Van Opdenbosch ve ark., 1988).

BoHV-4'e karşı spesifik antikorlar komplement fiksasyon, dot immunobinding test, agar jel immunodifüzyon test (AGID), immunfloresan test (IFAT) veya ELISA (Asano ve ark., 2003 ve Guo ve ark., 1988) metotları ile belirlenmiştir (Şekil 1.18; Gagnon ve ark., 2017). Ayrıca, farklı orijinli BoHV-4 izolatları IFAT ile ayırt edilebilmektedir (Dubuisson ve ark., 1988 ve Osorio ve ark., 1982).

Nötralizasyon testi ile BoHV-4 ve BoHV-1 arası ya da BoHV-4 ve BoHV-2 arası antijenik ilişki bulunmamıştır (Osorio ve ark., 1982). BoHV-1 ve BoHV-4 arasında ELISA ile çapraz reaksiyon belirlenmiştir (Kruger ve ark., 2015); ancak Metzler ve ark. (1986), çapraz reaksiyonun nedenini hayvanların hem BoHV-1, hem de BoHV-4 ile enfekte olmasına bağlamışlardır.



Şekil 1.18. BoHV-4'ün tespitinde kullanılan metotlar. (A) BoHV-4'ün elektron mikroskop görüntüsü. (B) Enfekte MDBK hücrelerde İndirek IF testi ile BoHV-4 tespiti. (C) IIF negatif kontrol hücreleri (Gagnon ve ark., 2017).

BoHV-4 enfeksiyonunun serolojik teşhisi amacıyla, Wellenberg ve ark. (1999), tarafından geliştirilen Immunperoksidaz monolayer testi (IPMA) ile tüm alt sınıf immunglobulinler saptanabilmektedir. Bu test ile deneysel enfeksiyonda 16-18 gün sonra virusa karşı oluşan spesifik antikorlar belirlenmektedir.

1.3.6. İmmunité

Genel olarak enfekte sığırlarda BoHV-4'e karşı nötralizan antikor yanıtı oluşmamakta ya da çok az miktarda ortaya çıkmaktadır (Wellemans ve ark.,1986). Etken yavaş üremekte ve humoral immunité standart virus nötralizasyon testleri ile saptanamayacak düzeyde düşük aviditeli nötralizan antikor oluşumu ile karakterize edilmektedir (Thiry ve ark., 1998 ve Wellenberg ve ark., 1999). Bu durum bazı araştırmacılar tarafından önemli nötralizan domainlerin saklanmış olması ve bu nedenle

sınırlı miktarda antikor oluşumuna neden olması ile açıklanmaktadır (Li ve ark., 1991).

IFAT ve ELISA ile primer enfeksiyondan 14-20 gün sonra spesifik antikorlar saptanmaktadır (Dubuisson ve ark., 1987 ve Osorio ve ark., 1982). Latent enfeksiyonun deneysel olarak reaktivasyonundan 7-15 gün sonra spesifik antikorların arttığı tespit edilmiştir. Hücresel immunité, konakta nötralizan antikorların düzeyi düşük olduğundan dolayı, antiviral immunitéde önemli rol oynamaktadır (Dubuisson ve ark., 1989).

Virusa karşı hücresel immun yanıt için araştırmalar halen devam etmektedir. BoHV-4'ün konak immun fonksiyonları üzerine immunsupresif etkisinin önemli nedeni, immun sistem hücrelerinde persiste kalışı ve bu hücrelerden sürekli izolasyonu (dalak makrofajları, lökositler) olarak gösterilse de, BoHV-4'ün immun sistem fonksiyonları üzerine direkt inhibitör olarak etkisini ortaya koyabilecek henüz güçlü bir kanıt bildirilmemiştir (Dewals ve ark., 2005).

1.3.7. Koruma-Kontrol

BoHV-4'ün etiyopatolojik rolü üzerine çalışmalar halen devam etmektedir. Tespit edildiği klinik bulguların oluşumundaki rolü tam olarak ortaya konulamamıştır. Nötralizan antikorların yeterince uyarılamamasından dolayı (Egyed, 1998), şimdiye kadar etkili bir BoHV-4 aşısı üretilmemiştir (Trapp ve ark., 2003).

Bugün için hastalığın eradikasyonu için önerilen yollar; sürü taraması yapıp enfekte bireylerin tespiti ve ayrılması, sürüye hayvan alırken PCR(-) ve sero (-) bireylerin seçilmesi ile yavruların virus (-) annelerin kolostrumu ve sütleriyle beslenmesi olarak söylenebilir. BoHV-4'ün diğer viral ve bakteriyel ajanlar ile birlikte enfeksiyonun şiddetini arttırdığı bilindiğinden enfeksiyonu kontrol altına almak için, diğer enfeksiyonlara karşı etkili tedbirlerin alınması ve latent enfeksiyona

neden olduğu için de, stresin mümkün olduğunca önüne geçilebilmesi uygun olacaktır (Egyed ve ark., 2011).

1.4. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Teknolojisi

Yıllarca büyük DNA viruslarına manipölasyon sadece memeli hücrelerinde rekombinasyona bağlı olarak gerçekleşmekte; bu prosedür ise hem zaman alıcı, hem de yorucu bir metot olarak kabul edilmektedir. Memeli hücrelerinde viral DNA ve viral homolog bölge ve marker gen taşıyan vektörün ko-transfeksiyondan oluşan rekombinant viruslar, uzun purifikasyon basamaklarından sonra elde edilebilmektedir. Bu yöntemde bazen hücreden kaynaklı olarak oluşan rekombinasyonlarda farklı sonuçlarla karşılaşılmakta ve doğru rekombinant virusun seçimi oldukça zorlu süreçleri kapsamaktadır. Dolayısıyla virusların bakteri içersinde manipölasyonu için BAC sistemi virolojide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. BAC, yeast artificial chromosome (YAC) ve mammalian artificial chromosome metotlarının arasında en uygun sistem olarak tanımlanmıştır. Bakteri içersinde bakteriyel polimerazdan dolayı virus genomunda fazla mutasyonlar görülmemektedir. Bazı durumlarda yüksek kopya plazmid taşıyan viruslar, bakteri için toksik gelebilmektedir. Bu nedenle genel olarak düşük kopya plazmidler ve özellikle BAC vektörler bu amaçla kullanılmaktadırlar. Bu metodun en büyük avantajı, bakteride mutasyon oluşturmaya yöneliktir. Dolayısıyla BAC taşıyan virusların bakteride mutasyon oluşturmaları oldukça kolaydır (Kuroda ve ark., 2006).

BAC sistemi ilk olarak 1992 yılında büyük genomik DNA'ların klonlanması için tasarlanmıştır (Shizuya ve ark., 1992). Bu vektörler, büyük olmaları sebebiyle tüm genomik DNA, intron ve/veya ekzon bölgelerin klonlanmasında tercih edilmektedirler. Düşük kopya özelliklerinden dolayı BAC vektörler, kompleks insan DNA ve repetetive DNA klonlamasında yararlı olmaktadır.

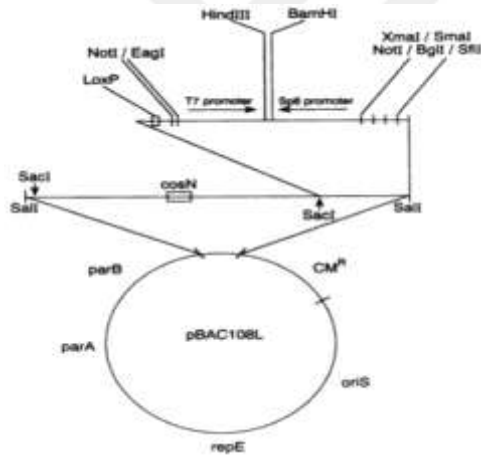
BAC vektörler normalde bir Mini F faktör plazmidten oluşmaktadır. Bu plazmid içersinde 3 önemli gen bölgesi bulunmaktadır:

1- oriS ve repE: Replikasyon orijini.

2- parA-parB-parC: Bu bölgeler plazmidin kopya sayısını kontrol edip, her bakteri içersine 1 ya da 2 plazmid girmesini sağlarlar.

3- Marker gen: Normalde antibiyotik rezistans (kloramfenikol gibi) ya da lacZ gen kullanılmaktadır (Wild ve ark., 2002).

BAC vektörlerin sentezi ilk olarak bakteriyel F faktörün tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır. *E.coli* bakterilerinde F faktörler ekstra kromozomal element olarak DNA transfer ve konjugasyonda rol oynamaktadırlar. İlk tasarlanan BAC vektör Shizuya ve ark. (1992), tarafından tasarlanmış olup, pBAC108L olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. pBAC108L vektörün yapısı (Shizuya ve ark., 1992).

Vektör pBAC108L'nın genom yapısında kloramfenikol rezistans marker gen, HindIII ve BamHI klonlama bölgesi, T7 ve SP6 promoter bölgeleri, bakteriyofaj lambda cosN sitesi ve P1 loxp bölgeleri bulunmaktadır (Shizuya ve ark., 1992).

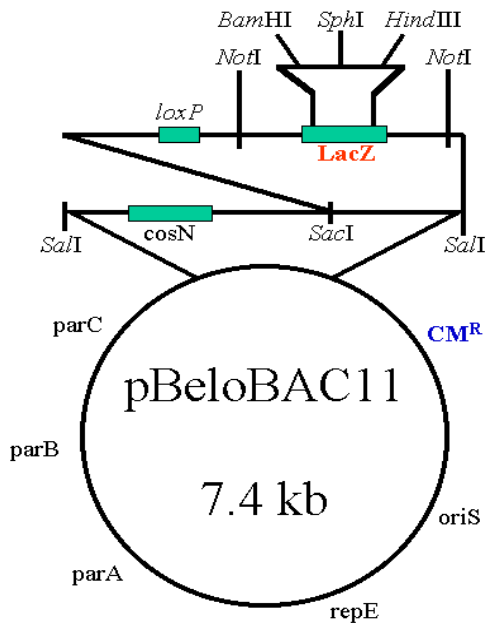
Daha sonra Kim ve ark. (1996), tasarladığı vektörde EcoRI kesim sekansını, multi cloning site (MCS) bölgesine ekleyip, aynı zamanda EcoRI, BamHI ve HindIII ile klonlama gerçekleştirmiştir.

BAC vektörler genel olarak elektroporasyon yöntemi ile bakteriye transforme edilir. Transformasyon etkinliği olarak her 1 mikrogram DNA'nın, 10^6 transformant oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu vektörlerin rekombinasyon negatif (rec-) bakteri suşlarında çoğalması, in vivo rekombinasyon olasılığını oldukça düşürmektedir (Novakova ve ark., 2014).

Loannou ve ark. (1994), BAC vektörlerin stabilitesini uygun bakterilerde 100 pasaj yaparak göstermişlerdir.

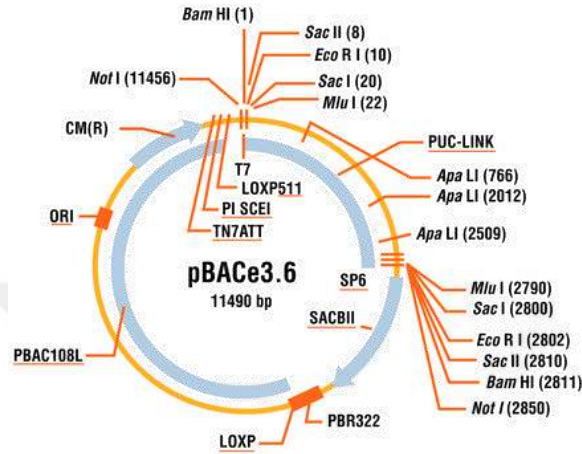
pBAC108L vektörde, rekombinant ve rekombinant olmayan bakterilerde seçim mekanizması olmadığından, yapılan çalışmalarda %90 boş vektör elde edilmekteyken (Shizuya ve ark., 1992); daha sonra rekombinant vektörlerin seçimini kolaylaştırmak için pBeloBAC11 ve pBACe3.6 olarak iki farklı vektör tasarlanmıştır (Frengen ve ark., 1999).

pBeloBAC11 plazmidin klonlama bölgesine (MCS) lacZ geninin eklenmesiyle pozitif bakteri kolonileri X-gal ve IPTG içeren petrilerde beyaz, rekombinant olmayan koloniler ise mavi olarak görülmektedir (Şekil 1.20; Kim ve ark., 1996).



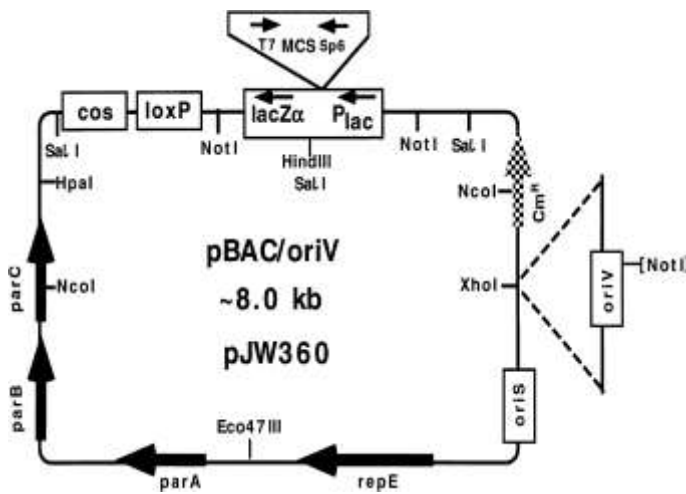
Şekil 1.20. pBeloBAC11 vektörün yapısı (Kim ve ark., 1996).

Daha sonra Frengen ve ark. (1999), tarafından pBACe3.6 plazmidi tasarlanmıştır. Bu vektörde klonlama bölgesi *sacB* bölgesinin içersine eklenmiştir. Dolayısıyla pozitif kolonilerin seçimi sukroz içeren besiyerinde kolaylıkla yapılabilmektedir (Şekil 1.21).



Şekil 1.21. pBACe3.6 vektörün yapısı (Fongen ve ark., 1999).

Wild ve ark. (2002), pBeloBAC vektörü modifiye ederek, vektörün kopya sayısını her hücre için 100'e kadar yükseltmişlerdir. Elde edilen vektör pBAC/oriV olarak isimlendirilmiştir (Şekil 1.22).

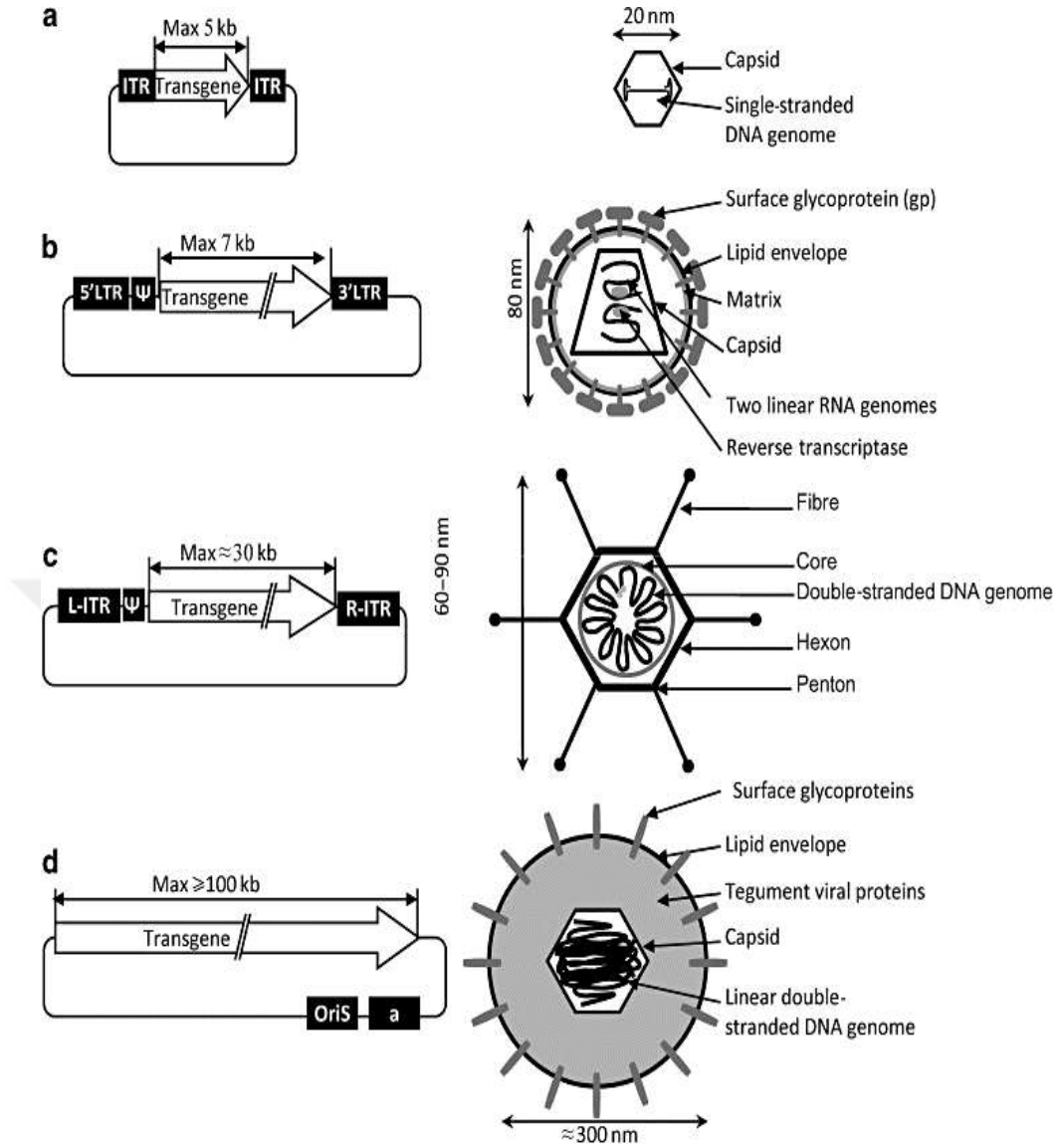


Şekil 1.22. pBAC/oriV vektörün yapısı (Wild ve ark., 2002).

1.5. BAC Sistemi İle Herpesviral Vektör Hazırlanması

Terapötik genlerin yetersizliğinden çok etkili, toksik olmayan bir gen aktarım sisteminin olmaması, in vivo gen terapisinin en büyük zorluğudur. Genel olarak, viruslar konakçı enfekte hücrelerde kendi genomların ekspresyonunu yeterli seviyede sağlarlar. Rekombinant viral vektörler, esansiyel olmayan viral genleri terapötik istenen yabancı genler ile değiştirerek, normalde enfekte edeceği hücre tipinin transdüksiyona neden olabilirler. Heterolog antijenlerin aktarımında vektörler olarak virusların kullanımı dikkatli düşünmeye ihtiyaç duyar; çünkü immun sistem virusları tespit etme ve elimine etmek için gelişmiş bir seri mekanizmayı kullanır. Bir viral vektör yüksek düzeyde intraselüler ekspresyona izin veren konakçı hücreye antijenini direkt olarak aktarır. Böylelikle viral vektörler bir adjuvant ve bir aktarım sistemi olarak görev alır. Etkili bir viral vektör eksprese edilen antijeni bir immun hedef olarak sunmalı ve konakçıda etkili bir yanıtı uyarmak için yeterince uzun kalabilmelidir. Bu nedenlerle, aşıların viral vektöre bağlı patojenite riski viral vektör gelişiminde önemli bir endişedir; atenüasyon viral vektör için istenen bir özelliktir ve çalışmalar büyük oranda atenüe suşların geliştirilmesi üzerinedir (Kelleher ve ark., 1998 ve Kung ve Medveczky, 1996).

Günümüzde farklı viral vektörler hem immunizasyon, hem de kanser terapisinde kullanılmaktadır. Bu amaçlarla en yaygın olarak retro-, adeno-, lenti-, adeno-associated virus gibi viral vektörlerden yararlanılmaktadır (Şekil 1.23). Bu viral vektörlerin hazırlanmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Genel olarak tercih edilen metot invitro hücrede homolog rekombinasyondur. Bu yöntemde bakteriye ihtiyaç duyulmamaktadır. Dolayısıyla BAC sisteminin kullanımı bu viral vektörlerde yaygın değildir (Bouard ve Alazard-Dany, 2009). Ancak bu viral vektörlerin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Rutin olarak kullanılan viral vektörlerin gen aktarma kapasitelerinin düşük olması (maksimum 3-5 kbp, örneğin adeno- ve adeno-associated), konakçı genomuna integrasyon (örneğin retroviral) ve fazla miktarda üretilmemesi gibi dezavantajlar ile karşılaşılmaktadır (Çizelge 1.4; Bouard ve Alazard-Dany, 2009).



Şekil 1.23. Yaygın kullanılan viral vektörler. (a) Rekombinant adeno-associated. (b) Retroviral. (c) Adenoviral. (d) HSV-1 viral vektör (Bouard ve Alazard-Dany, 2009).

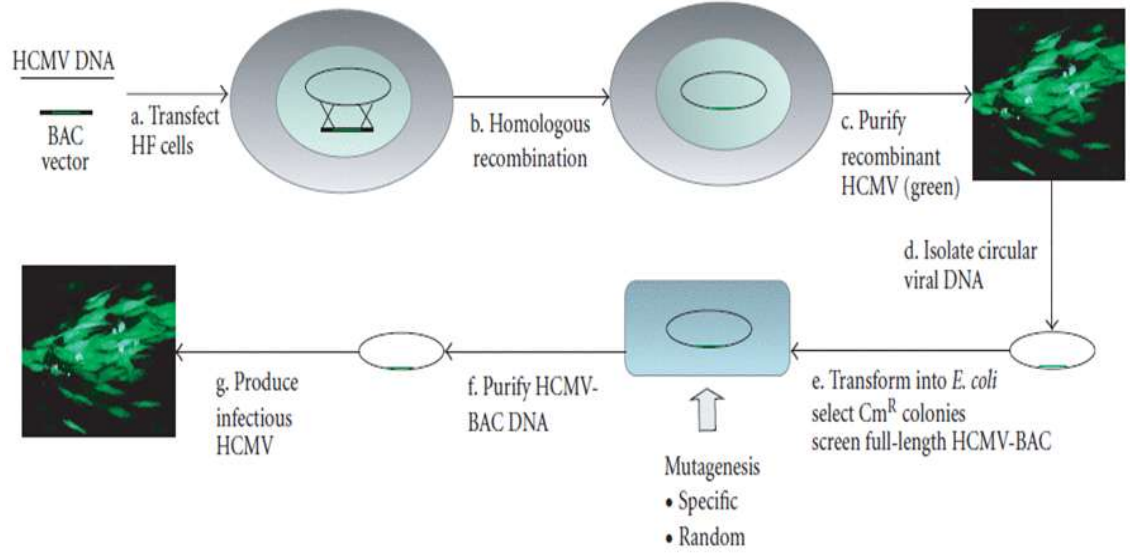
Çizelge 1.4. Çeşitli viral vektörlerin karşılaştırması (Bouard ve Alazard-Dany, 2009).

Vektör	Üretim miktarı (transducing units mL)	İnflamasyon yanıtı	Tropizma	Hücresel genom ile ilişkisi	Ekspresyonu
Retroviral	Orta (10^{10})	Az	Bölünen Hücreler	İntegre	Uzun Süreli (Yıl)
Lentiviral	Yüksek (10^{12})	Yüksek	Sinir sistemi	Epizomal	Kısa Süreli
Adenoviral	Yüksek (10^{12})	Yüksek	Geniş	Epizomal	Kısa Süreli
Adeno- Associated	Yüksek (10^{12})	Az	Geniş	Epizomal (%90) İntegre (%10)	Bilinmiyor

Dolayısıyla dezavantajları en aza indirgenmiş yeni viral vektör geliştirme üzerine arayışlar devam etmektedir. Bu konuda en yoğun çalışmalar herpesviruslar üzerine yapılmaktadır. Herpesviruslar, gen aktarma vektörleri olarak önemli avantajlara sahip olan büyük DNA viruslarıdır. Herpesviral vektörlerin büyük insert kapasitesi ve stabil olarak epizomal formda hücrede kalma özellikleri, bir viral vektör için çok önemli avantajlar olarak kabul edilmektedir (Hukkanen, 2010).

Herpesvirusların genomuna manipülasyon etkinliğini geliştirmek için ilk çalışmalar kosmid olarak bilinen *Escherichia coli* plasmid replikonların kullanımı ile gerçekleşmiştir. *E.coli*'de enfeksiyöz herpesvirus genomlarının klonlanması ve bu genomlara manipüle etmek için tekniklerin geliştirilmesi rekombinantların yapımı ve yenilenmesini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır (Adler ve ark., 2003). Luckow ve ark. (1993), ilk kez suni kromozom (BAC) olarak büyük, çift iplikçikli DNA virusunun komple genomunun klonlanmasını gerçekleştirmiştir. *E.coli*'de viral genomun manipülasyonu, üremeye izin veren ve ardından enfekte virusun serbest kalmasını sağlayan baculovirus genomunun klonlanması ile başarılmıştır. Messerle ve ark. (1997), ardından bir BAC içine murine cytomegalovirusun komple genomunun klonlanması ile herpesvirus familyası için bu tekniği genişletmiştir.

Herpesviral vektörlerin hazırlanmasında genellikle ilk basamak, BAC vektörlerin herpesvirus genomuna aktarılmasıdır. Bu durum homolog rekombinasyon ile memeli hücrelerinde gerçekleştirilmektedir. İkinci basamakta, istenen genin herpesvirus genomuna aktarımı ise bakteride recombineering yöntemi ile yapılmaktadır. Rekombinant virusların daha kolay seçimi için, BAC vektör ile beraber bir marker genin aktarımı gerekmektedir. Günümüzde en yaygın marker olarak yeşil floresan proteini (EGFP) kullanılmaktadır. Bu durumda rekombinant virusların varlığı enfekte hücrelerde yeşil plaklar olarak tespit edilmektedir (Şekil 1.24; Warden ve ark., 2011).



Şekil 1.24. Herpesviruslarda BAC sistemi ile viral vektör hazırlanması (Warden ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda herpesviral vektörlerin iyi bir aşı tabanı olduğu ortaya konulmuştur (Esaki ve ark., 2013; Schrijver ve ark., 1997 ve Trapp ve ark., 2005).

Herpesviral vektörler uygulamalarına göre onkolitik viral vektörler, rekombinant viral vektörler ve aşılama/gen transferi amacıyla geliştirilen viral vektörler olarak üç ana gruba ayrılırlar (Paredes ve Yu, 2012).

Herpesviruslar arasında en yoğun çalışmalar HSV-1-BAC üzerine yapılmaktadır. Bu rekombinant virus hem aşılama, hem de kanser terapisinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır (Bedadala ve ark., 2014; Feng ve ark., 2007 ve Suter ve ark., 1999). BAC sisteminin kullanımı, insan herpesvirusları olan sitomegalovirus, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), Epstein-Barr (EBV) ve insan herpes simpleks 2 (HSV-2) gibi viruslarda, onkogenik potansiyelleri olduğundan çok sınırlıdır (Brulois ve ark., 2012; Feederle ve ark., 2010; Meseda ve ark., 2004 ve Paredes ve Yu, 2012).

Bugün için insan ve veteriner hekimlik açısından önemli en azından 20 herpesvirus, BAC teknolojileri kullanılarak enfeksiyöz klonları oluşturmak üzere geliştirilmiştir (Şekil 1.25; Rosas ve ark., 2007).

Virus Common name*	Acronym*	Taxon name	Genome size
Herpesviridae			
<i>Alphaherpesvirinae</i>			
Bovine herpesvirus 1	BoHV-1	<i>Bovine herpesvirus 1</i>	135 kbp
Canine herpesvirus	CHV	<i>Canid herpesvirus 1</i>	160 kbp
Equine herpesvirus 1	EHV-1	<i>Equid herpesvirus 1</i>	150 kbp
Equine herpesvirus 4	EHV-4	<i>Equid herpesvirus 4</i>	146 kbp
Felid herpesvirus 1	FeHV-1	<i>Felid herpesvirus 1</i>	136 kbp
Herpes simplex virus 1	HSV-1	<i>Human herpesvirus 1</i>	152 kbp
Herpes simplex virus 2	HSV-2	<i>Human herpesvirus 2</i>	155 kbp
Herpesvirus of turkey	HVT	<i>Meleagrid herpesvirus 1</i>	160 kbp
Marek's disease virus	MDV	<i>Gallid herpesvirus 2</i>	178 kbp
Pseudorabies virus	PRV	<i>Suid herpesvirus 1</i>	142 kbp
Simian varicella virus	SVV	<i>Cercopithecine herpesvirus 9</i>	125 kbp
Varicella-zoster virus	VZV	<i>Human herpesvirus 3</i>	125 kbp
<i>Betaherpesvirinae</i>			
Guinea pig cytomegalovirus	GPCMV	<i>Caviid herpesvirus 2</i>	220 kbp
Human cytomegalovirus	HCMV	<i>Human herpesvirus 5</i>	229 kbp
Human herpes virus 6A	HHV-6A	<i>Human herpesvirus 6</i>	159 kbp
Mouse cytomegalovirus	MCMV	<i>Murid herpesvirus 1</i>	230 kbp
Rhesus cytomegalovirus	RhCMV	<i>Macacine herpesvirus 3</i>	221 kbp
<i>Gammaherpesvirinae</i>			
Bovine herpesvirus 4	BoHV-4	<i>Bovine herpesvirus 4</i>	171 kbp
Epstein-Barr virus	EBV	<i>Human herpesvirus 4</i>	172 kbp
Herpesvirus saimiri	HVS	<i>Saimiriine herpesvirus 2</i>	113 kbp
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	KSHV	<i>Human herpesvirus 8</i>	137 kbp
Murine gammaherpesvirus 68	MHV-68	<i>Murid herpesvirus 4</i>	119 kbp
Rhesus lymphocryptovirus	rhLCV	<i>Macacine herpesvirus 4</i>	171 kbp
Rhesus rhadinovirus	RRV	<i>Macacine herpesvirus 5</i>	133 kbp
<i>Unassigned</i>			
Duck enteritis virus	DEV	<i>Anatid herpesvirus 1</i>	158 kbp
Alloherpesviridae			
Channel catfish herpesvirus	CCV	<i>Ictalurid herpesvirus 1</i>	134 kbp
Koi Herpesvirus	KHV	<i>Cyprinid herpesvirus 3</i>	295 kbp

Şekil 1.25. Farklı herpesviruslarda BAC kullanımı ile rekombinant virus hazırlanması (Rosas ve ark., 2007).

Son yıllarda hayvan herpesviruslarından yararlanılarak farklı viral antijenlerin aktarılmasıyla yeni vektör aşılar geliştirilmeye çalışılmıştır. BAC tekniği, Bovine Viral Diarrhoea (BVDV) yapısal proteini olan E2 ve Batı Nil virusu (BNV) pRM ve E proteinlerini eksprese eden equine herpesvirus tip 1 (EHV-1) rekombinantlarının üretimi için uygulanmıştır. BNV için hazırlanan rekombinantlar, atların immunizasyonundan sonra BNV'a karşı nötralizan antikor yanıtını uyarmıştır (Rosas ve ark., 2007). Sığırların EHV-1/BVDV rekombinantıyla aşılması, BVDV

challenge enfeksiyonundan sonra BVDV spesifik nötralizan antikor yanıtını uyarmış, ayrıca viremi ve klinik belirtilerin azaldığı da gözlenmiştir. Bu da EHV-1 vektörlerin sığırların aşılınması için uygun olduğunu ve son zamanlarda BVDV gpE2 veya BoHV-1 gD eksprese eden rekombinant BoHV-4 virusları gibi sığır viruslarından elde edilen canlı vektör aşılardan, antikor varlığı durumunda da uygulanabileceğini ortaya koymaktadır (Donofrio ve ark., 2007b).

1.6. İyi Bir Gen Aktarım Vektörü Olarak BoHV-4'ün Özellikleri

BoHV-4'ün iyi bir gen aktarım vektörü olarak kullanılabileceği ilk kez Gillet ve ark. (2005a), tarafından önerilmiştir. Daha sonra yapılan bir çalışmada, Donofrio ve ark. (2006), neomisin-dirençli gen taşıyan bir rekombinant BoHV-4'ün insan rhabdomyosarcoma hücre hattını (RD-4) CPE yapmadan, epizomal viral DNA içeren persiste enfekte ilaca dirençli hücrelerin seçimine olanak verecek şekilde, enfekte edebildiğini göstermişlerdir. Bu, BoHV-4'ün bir viral vektör olarak potansiyelini araştırmak üzere yapılmış konak çeşitliliği ile ilgili ilk bildirimdir. İlk yapılan çalışmalarda rekombinant BoHV-4 üretimi için, plazmidlerin rekombinasyonunun yapımını gerçekleştiren bir plazmid vektör sistemi geliştirilmiştir. Oluşan rekombinantın BoHV-4EGFPΔTK'in 94 bp TK (timidin kinaz) gen delesyonu vardır ve geri kalan TK geni yeşil floresan protein (EGFP) ekspresyon kaseti ile yer değiştirmiştir (Donofrio ve ark., 2008).

Daha sonra BoHV-4 üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarına göre BoHV-4'ü iyi bir gen aktarım vektörü olarak tanımlayan birçok özelliği belirlenmiştir.

BoHV-4 hem doğal konakçıda, hem de deneysel çalışmalarda sınırlı patojeniteye sahip ya da apatojen olarak gösterilmiştir (Castrucci ve ark., 1987a, 1987b, 2004; Thiry ve ark., 1989, 1998 ve Wellemans ve ark., 1986, 1989). Böylece BoHV-4 vektör olarak kullanıldığında, çok sayıda genin kesilmesi veya parçalanması gibi manipülasyonlara ihtiyaç yoktur; çünkü daha fazla mutasyon virusun yeterli düzeyde immun yanıtı uyarma yeteneğini sınırlandırabilir.

BoHV-4'ün genomu bazı herpesviruslara göre daha az kompleks yapıdadır. Bu özellik virusun genomuna yapılabilecek manipölasyonları kolaylaştırmaktadır (Zimmermann ve ark., 2001).

BoHV-4'ü bir potansiyel gen aktarım vektörü olarak istenilir kılan bir diğer özelliği ise, onkojenitesine ilişkin bir tespitin olmamasıdır. Gammaherpesvirinae alt ailesinde olan diğer herpesviruslar-Epstein-Barr virus (EBV), Herpesvirus Saimiri (HVS), İnsan Herpesvirus-8 (HHV-8), ve Murine Gammaherpesvirus-68 (MHV-68) hücre transformasyonuna neden olmaktadır (Jung ve ark., 1999).

Diğer gammaherpesviruslar ile karşılaştırıldığında BoHV-4, hücrenin üreme özelliğini değiştiren çok az hücresel genlerle homolog genler taşır (Zimmermann ve ark., 2001). BoHV-4 tarafından taşınan homolog hücresel genlerin hücreleri apoptosisden koruduğu ve BoHV-4 enfeksiyonunda apoptosisin bazı hücre hatlarında engellendiği gösterilmesine rağmen; bazı karsinoma hücre hatlarını da içeren birçok hücre tipinde apoptosisin virus tarafından uyarıldığı da gösterilmiştir (Gillet ve ark., 2005a). Bu durum, virusun özellikle bazı kanser türlerinde tedavi amaçlı kullanımını desteklemektedir. Bir alphaherpesvirus olan HSV-1'in -özellikle sinir sistemi için- gen terapisinde bir vektör olarak gelişimiyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Glorioso ve ark., 1995). Her ne kadar sitotoksitesini azaltmak için genetik değişimler yapılmış olsa da, HSV-1'in önemli bir dezavantajı, nöronlar da dahil pek çok hücre çeşiti için sitotoksik olmasıdır (Glorioso ve ark., 1984). Buna karşın, BoHV-4'ün nöral hücreler de dahil sitotoksite olmadan çeşitli hücre çeşitlerini enfekte edebileceği gösterilmiştir. BoHV-4 nörotropik bir virus olarak düşünülmesi de, persiste enfeksiyon sırasında sıklıkla perifer ve/veya merkezi sinir sistemi dokularında görülmektedir (Krogman ve Mcadaragh, 1982 ve Lopez ve ark., 1996). Bu gözlemler BoHV-4'ün sinir sistemi için gen aktarım vektörü olarak kullanımının uygun olabileceğini önermektedir.

Birçok gammaherpesvirusun aksine BoHV-4 *invivo* ve *invitro* olarak çok geniş konakçı türünde replike olabilir (Thiry ve ark., 1998).

Birçok genin esansiyel olmaması nedeniyle herpesvirus genomları en az 40 kb yabancı gen dizini barındırabilmektedir (Glorioso ve ark., 1995). Bu da kullanılan basit enhancer-promoter sistem yerine yüksek seviyede, dokuya özel ve gelişimsel açıdan stabil gen ekspresyonu taşıması gereken kompleks regülatör bölgelerin kullanımına olanak verebilir. BoHV-4 de diğer gammaherpesviruslarda olduğu gibi önemli oranda heterolog genetik bilgi taşıma kapasitesine sahiptir.

Diğer herpesviruslar gibi BoHV-4 de doğal ve deneysel konakçıda persiste enfeksiyon oluşturur (Dubuisson ve ark., 1987, 1989, 1991; Egyed ve ark., 1998; Krogman ve Mcadaragh., 1982 ve Naeem ve Goyal., 1990). Bu durum, özellikle BoHV-4 tabanlı bir vektör aşı için uzun süre konakçıda heterolog antijenin ekspresyonu açısından önemli bir avantajdır. Birçok dokuda persiste enfeksiyon gösterilmesine rağmen, BoHV-4'ün hedef hücreleri monosit/makrofaj hücre hattıdır (Dubuisson, 1989; Egyed ve ark., 1998 ve Krogman ve Mcadaragh, 1982). BoHV-4'ün bu özelliği vektör aşı gelişiminde çok istenilir bir özelliktir. Çünkü makrofajlar profesyonel antijen sunan hücrelerdir ve BoHV-4'ün doğal hedefleridir. Dalak ve lenf nodülleri gibi lenfoid organlar için BoHV-4 ile persiste enfekte makrofajların hedefi bulmasından sonra, immun yanıtın yükselmesini izleyerek aktarılan heterolog antijen direkt olarak işlem görür ve immun sisteme sunulur (Donofrio ve ark., 2007b).

Diğer gammaherpesviruslar gibi BoHV-4 genomu da persiste enfekte hücrelerde epizomal formda bulunur (Donofrio ve ark., 2000a). Dolayısıyla BoHV-4 genomunun konakçı hücre genomuna entegrasyonu virusun devamlılığında gerekli değildir. Böylece, rekombinant BoHV-4 teorik olarak viral bir aktarım sisteminin etkinliğini yapay bir kromozomla kombine edebilir ve gen ekspresyonunda konakçıya entegrasyonun konumunu kolaylaştırabilir.

Vektör aşı geliştirmede önemli endişelerden biri, konakçı organizmada daha önceden varolan antivektör immunitedir. BoHV-4 kullanıldığı durumda, bu bir problem olarak görülmemektedir. Çünkü BoHV-4 doğal olarak serum nötralizan antikor üretimini etkili bir şekilde uyarmamaktadır. Yapılan bir çalışmada BoHV-

1'in gD bölgesi aktarılan BoHV-4 vektör aşının antikor yanıtı her iki virus yönünden irdelenmiş; BoHV-1'e karşı istenilen düzeyde serum nötralizan (SN) aktivitesi tespit edilirken, BoHV-4'e karşı SN aktivitesi gösterilememiştir. Bu durum, BoHV-4'ün hücre penetrasyonunda diğer herpesviruslardan farklı bir modele sahip olmasıyla açıklanmaktadır (Donofrio ve ark., 2006).

BoHV-4 –BAC sisteminden yararlanılarak BVDV E2, BoHV-1 gD, Mavidil virüsü (BTV) VP2, peste des petits ruminants virus (PPRV)-Hemagglutinin, Ebola GP ve Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) gD antijenleri eklenerek geliştirilen rekombinant vektör aşılar çeşitli deneme hayvanlarında başarıyla uygulanmıştır (Donofrio ve ark., 2006, 2007b, 2013; Franceschi ve ark., 2011b; Macchi ve ark., 2018 ve Rosamilia ve ark., 2016). Ayrıca glioma ve meme kanseri gibi kanser türlerinde terapötik olarak söz konusu viral vektör kullanım alanı bulmuştur (Jacca ve ark., 2016 ve Redaelli ve ark., 2010).

Viruslar, doğal olarak konakçı hücrelere genlerini aktarabilen gelişmiş taşıyıcılardır. Bu özellik onları genlerin aktarımında vektör sistemler olarak cazip kılmaktadır. Günümüzde birçok virus, yabancı genetik materyalleri taşıma ve etkili olarak bu genleri aktarma kapasitelerinden dolayı gen aktarım vektörleri olarak kullanılabilmektedir. Bu anlamda, son yıllarda immunizasyon ve kanser terapisinde kullanım alanı bulan herpesviruslardan Gammaherpesvirinae alt grubunda yer alan BoHV-4, diğer vektör viruslar ile karşılaştırıldığında biyolojik ve moleküler özellikleri açısından birçok avantaja sahip görülmektedir (Donofrio ve ark., 2003).

Bu özellikler arasında patojenitesinin az veya olmaması, onkojenitesinin olmaması, büyük miktarda yabancı genetik materyal barındırma kapasitesi, bölünen hücrelerde epizomal formda kalabilmesi, değişik hayvan türlerinden elde edilen pek çok hücre çeşitini enfekte edebilme ve başkalaşım süresince transgen ekspresyonunu sürdürebilme olarak sayılabilir (Donofrio ve ark., 2007a). İyi bir viral vektör, seçici immunizasyonu sadece spesifik patojene karşı göstermelidir ki, BoHV-4 bunu gerçekleştirebilen nadir viruslardandır.

Herpesviral vektörlerin geliştirilmesi amacıyla, bir esansiyel viral genin delesyonu gerçekleştirilerek replikasyonu sınırlı vektörler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin başarısı 2 faktörle sınırlanabilir. Bunlardan biri, duyarlı hücrelerde virusun genlerine yalnızca homolog rekombinasyonla manipülasyon yapılabilir. Bu yaklaşımı başarıyla kullanmak için hücreler, yabancı genetik materyali sunmaya uygunlukta olmalıdır. İkinci olarak, virus replikasyonu için gerekli olmayan genlerin delesyonu ya da değiştirilmesiyle mutant virus elde etmek kolay değildir. Bu genellikle yardımcı virusların kullanımıyla ya da ilgilenilen genin ekspresyonunu sağlayan sağlam transforme hücre hatlarının dengeli üretimiyle sağlanır. Bu sınırlamaların sonuçları olarak, yeni vektörlerin gelişimi ve gen fonksiyonları üzerine yapılan çalışmaların zaman alıcı prosesler olmasıyla birlikte, bu konuda çalışmalar yapılması yararlı olacaktır (Tomanin ve Scarpa, 2004).

Bu bilgiler ışığında planlanan bu çalışmada, BoHV-4 Movar 33/63 suşunun bir gen aktarım vektörü olarak kullanılabilmesinde, herpesviruslar için geliştirilen ve son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan Bacterial Artificial Chromosome (BAC) olarak klonlanması ve çalışmanın uzantısında özellikle ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan patojenlere ait çeşitli immundominant antijenlerin aktarımı ile farklı hayvan türlerinde immunizasyon ve kanser terapisi amacıyla yararlanılması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında, BoHV-4 Movar 33/63 Avrupa referans suşu kullanılarak, BAC kasetin yerleşmesi için, virusun en stabil bölgesi olarak tespit edilen ORF2 (Bo2), ORF3 (Bo3) gen bölgeleri seçilmiştir. Marker gen olarak yeşil floresan protein eksprese eden kaset ve genetisin antibiyotik direnç sağlayan gen bölgesi pEGFP-C1 plazmidinden alınmıştır. Memeli hücrelerinde homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi için virusun replikasyonu gerekmektedir. ORF2 ve ORF3 genleri virusun Long Unique Bölge'sinde (LUR) yer almakta olup, virusun replikasyonunda herhangi bir role sahip değildirler. Homolog rekombinasyondan sonra BoHV-4 genomunda sadece insersiyon oluşumu sağlanacaktır. Homolog rekombinasyonu gerçekleştirmek için BoHV-4 Movar 33/63 suşu ile enfekte hücrelerin transformasyonu, hazırlanan pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3

plazmidi ile yapılarak, MDBK hücresinde de novo rekombinasyonla gerçekleştirilecektir. Yeşil floresan protein ekspresyonu ve genetikine karşı direnç özelliklerinin, BoHV-4 Movar suşuna 2 farklı kaset halinde aktarımının sağlanmasıyla, rekombinant olmayan virusların ortamdan elimine edilmesi gerekmektedir. Rekombinant virusun DH10B bakteriye aktarılması için, bu virusu sirküler şekilde hücre çekirdeğinde yakalamak gerekmektedir. Bu durumda en iyi yöntem olarak Hirt yöntemi kullanılacaktır. Bu metot kullanılarak elde edilen sirküler rekombinant viral DNA, bakteriye transforme edilerek, bakteride stabilitesi ortaya konulacaktır. DH10B bakteriye aktarılmış olan rekombinant virus, daha sonra özellikle ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan ve/veya atenuë suşların geliştirilmesinde başarısızlık, inaktif virusun immun yanıtın uyarılmasında yeterli olamaması, purifiye viral proteinlerin immunojenik ya da nötralizan antikor yanıtına neden olamaması gibi nedenlerden kaynaklı olarak başarılı bir aşı geliştirilememiş ve/veya zoonoz etkenlere karşı immunizasyon ve kanser terapisi çalışmalarında recombineering yöntemi ile istenilen genlerin aktarımında ve ekspresyonunda kullanılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Virus

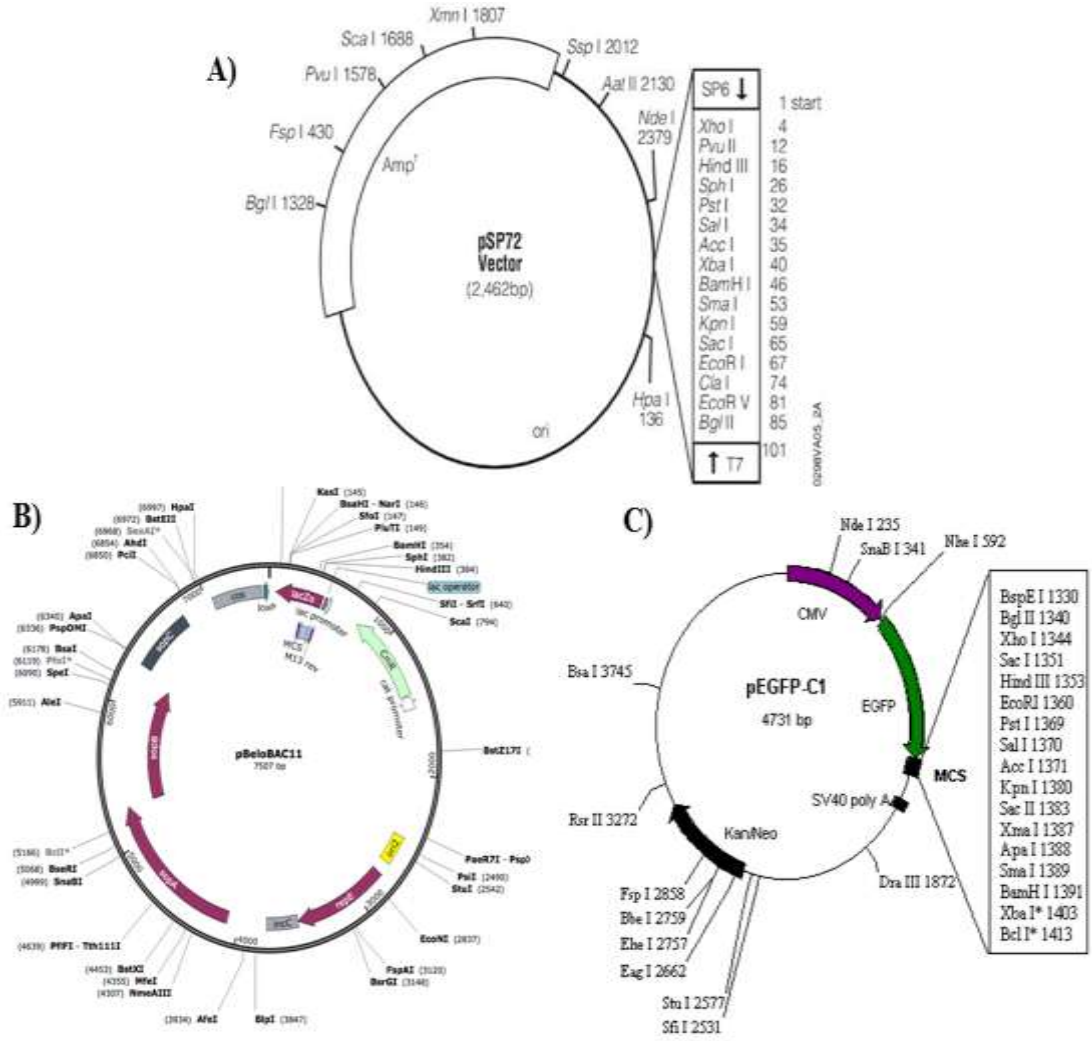
Bu çalışmada BoHV-4'ün Movar 33/63 referans suşu kullanıldı. Bu referans suş Prof. Dr. L.Egyed'dan (Budapeşte Üniversitesi, Macaristan) temin edildi.

2.1.2. Hücre Kültürü

BoHV-4 Movar 33/63 suşunun üretilmesi ve BoHV-4-BAC'ın homolog rekombinasyon ile elde edilmesinde Anabilim Dalı stoklarında yer alan Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) ve Prof. Dr. G. Donofrio'dan (Parma/İtalya) temin edilen Bovine Embryonic Kidney (BEK) hücre kültürleri kullanıldı. Ayrıca, pBeloBAC11-EGFP konstraktının in vitro protein ekspresyonun doğrulanması için Anabilim Dalı stoklarında mevcut olan insan Embryo Böbrek (HEK293IQ ve HEK293FT) hücre kültürleri kullanıldı.

2.1.3. Plazmidler

İlk klonlama basamağında pSP72 plazmidi (Promega, ABD) ORF2, ORF3 ve BAC-CMV-EGFP kasetin klonlanması için kullanıldı. Ayrıca, pBeloBAC11 plazmidi (E. coli K12 ER2420/pBeloBAC11, ABD) ticari (New England Biolab; NEB) olarak elde edildi. Bu plazmid BAC vektör olarak seçildi. Marker kaseti (CMV-EGFP-Neo), pEGFP-C1 plazmidinden (Clontech, ABD) alındı. pEGFP-C1 ve pSP72 plazmidleri Viroloji Anabilim Dalı stoğundan temin edildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan plazmidlerin genom haritası. (A) pSP72, (B) pBeloBAC11 ve (C) pEGFP-C1 vektörler.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Enzimler

Klonlama çalışmasında kullanılan tüm enzimler aşağıda verildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kullanılan kesim enzimleri ve markası.

Kesim Enzimler	Marka
FD-EcoRI	ThermoScientific/ABD
FD-XhoI	ThermoScientific/ABD
FD-KpnI	ThermoScientific/ABD
AseI	ThermoScientific/ABD
ApaLI	ThermoScientific/ABD
MluI	ThermoScientific/ABD
HF-HindIII	New England Biolab/ABD
Taq DNA polimeraz	ThermoScientific/ABD
Phusion Taq DNA polimeraz	ThermoScientific/ABD
T4 DNA ligaz	ThermoScientific/ABD
T4 DNA polimeraz	ThermoScientific/ABD

2.1.5. Kullanılan *E.coli* Suşları

Tez çalışmasında genel klonlama amacıyla *E.coli* Max Efficiency DH5-alfa (F^- *endA1 gln V44 thi-1 recA1 rel A1 gyrA96 deoR nup G pur B20* ϕ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), λ^-) ve viral vektörün klonlaması için DH10B (F^- *endA1 deoR^+ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL* Δ (*lac*)X74 ϕ 80*lacZ* Δ M15 *araD139* Δ (*ara,leu*)7697 *mcrA* Δ (*mrr-hsd RMS- mcrBC*) $Str^R \lambda^-$) suşları kullanıldı.

2.1.6. Bakteri Besiyerleri

Bu tez çalışmasında bakteri besiyeri olarak Super Optimal Broth (SOC), Luria Bertani (LB) broth ve agar kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Bakteri besiyerlerinin hazırlanması.

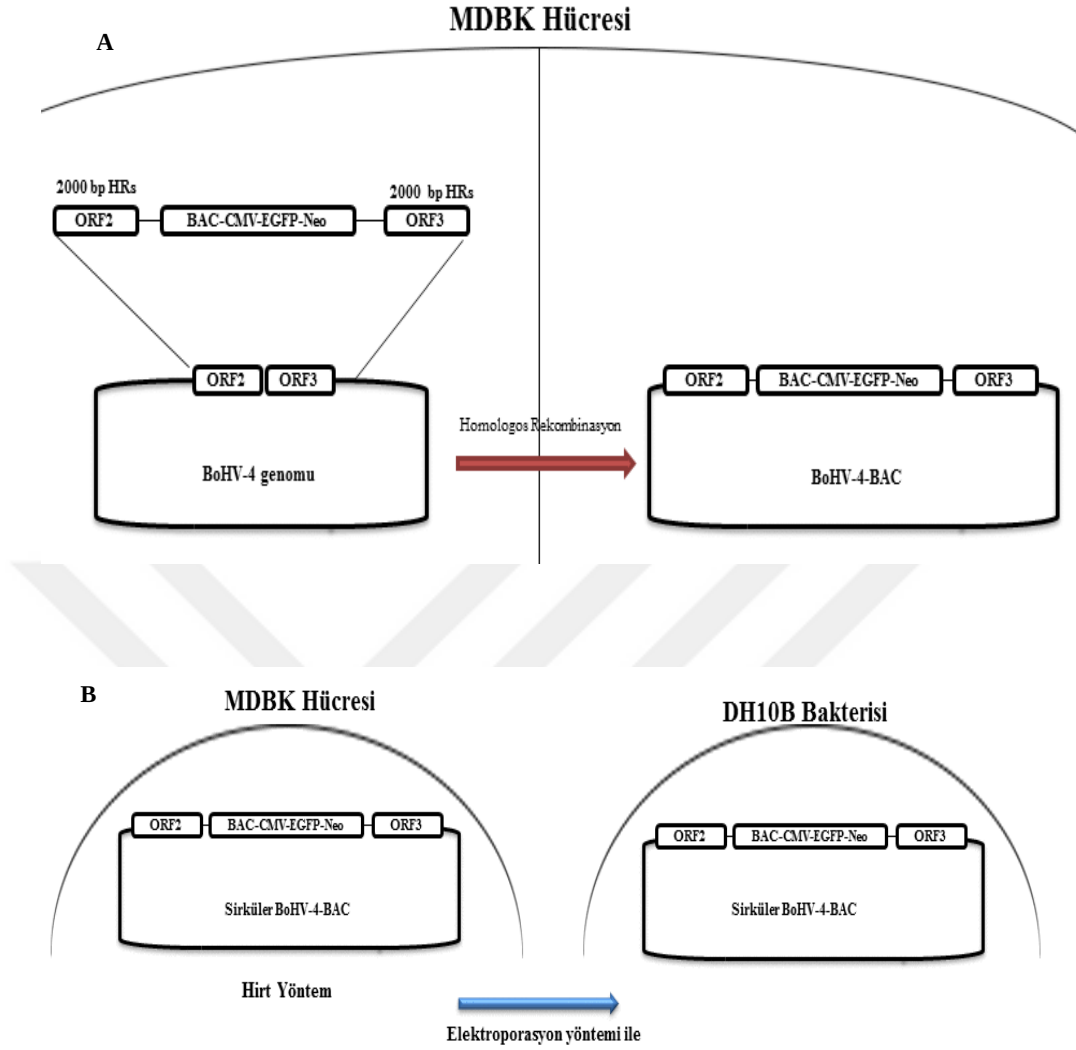
LB broth		LB agar		SOC	
Kimyasal Madde	Miktar	Kimyasal Madde	Miktar	Kimyasal Madde	Miktar
Tryptone	10 g	Agar	20 g	Tryptone	2% (w/v)
Yeast extract	5 g	Tryptone	10 g	Yeast extract	0.5% (w/v)
NaCl	10 g	Yeast extract	5 g	NaCl	10 mM
distile su	1 litre	NaCl	10 g	KCl	2.5 mM
		distile su	1 litre	MgCl ₂	10 mM
				Glucose	20 mM

2.2. Yöntem

Planlanan bu çalışmada hedefler anahatlarıyla şöyledir:

- Yeni bir viral vektör geliştirmek adına bu çalışmada BoHV-4'ün Movar referans suşu kullanıldı.
- Bu çalışmada, büyük genoma sahip olan herpesvirusları klonlamak amacıyla geliştirilen BAC sisteminden yararlanıldı.
- BAC vektörün klonlanması için virusun replikasyon için gerekli olmayan ORF2 ve ORF3 bölgesi seçildi.
- Bu amaçla, ORF2 ve ORF3 genleri PCR ile amplifiye edilip, pSP72 vektöre klonlandı.
- BAC ile birlikte marker gen olarak yeşil floresan proteini (EGFP) ve antibiyotik olarak genetisin (Neo geni) seçildi.

- Oluşan pSP72-ORF2-ORF3 vektöre BAC-EGFP-Neo klonlandı ve bu şekilde BoHV-4 için homolog kollar içeren vektör hazırlandı.
- Elde edilen pSP72-ORF2-BAC-EGFP-Neo-ORF3 vektörü, BoHV-4 Movar suşu ile enfekte MDBK hücrelerine homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi amacıyla transfekte edildi.
- Rekombinant virusların seçimi yeşil floresan plak yöntemi ve genetisin direncine bağlı olarak yapıldı.
- Hirt metodu ile elde edilen sirküler viral DNA DH10B bakteriye transforme edildi ve stabilitesi bakteride kesim enzimi ile doğrulandı.
- Daha sonra bakteriden ekstraksiyonu yapılan rekombinant virus, MDBK hücrelerinde transfeksiyondan sonra yeni rekombinant virus olarak istenilen amaca göre kullanılabilecektir.



Şekil 2.2.Çalışmada uygulanan metotların şematik özeti. A) MDBK hücresinde homolog rekombinasyon. B) Hirt yöntemi ile elde edilen sirküler BoHV-4-BAC'ın DH10B bakteriye transformasyonu.

2.2.1. Hücre Hattının Üretilmesi

MDBK ve BEK hücreleri % 10 FDS, 2mM glutamine, 100U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin ilave edilmiş olan Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM; Sigma, ABD) içinde üretildi. Hücreler, %70-90 kapladığında subkültürü yapıp, 37°C'de, %5 CO₂'li inkubatörde inkubasyona bırakıldı. Ayrıca, farklı plazmid konstraktların ekspresyon doğrulaması için insan embriyo böbrek

(HEK293IQ ve HEK293FT) hücreleri kullanıldı. HEK hücrelerinin üretilmesinde Alfa-MEM (ThermoScientific, ABD) vasatı tercih edildi.

2.2.2. Virusun Üretilmesi

BoHV-4 Movar 33/63 suşunu üretmek amacıyla MDBK hücre kültüründen yararlanıldı. Virus 175 cm²'lik hücre kültürü şişesinde üretilen ve %70-80 kaplamış olan MDBK hücre kültürüne, içlerindeki hücre üretme vasatı döküldükten sonra, şişe hacminin %1'i oranında inokule edildi. Virus inokule edilmiş hücre kültürü şişelerine, 37°C'lik inkubatörde 1 saat inkubasyonun ardından, şişe hacminin %5-10'u oranında, %2 fetal dana serumu (FDS) içeren virus üretme vasatı (DMEM) konuldu. Hücre kültürleri 5-7 gün süre ile 37°C'de inkubasyona bırakılıp, her gün sitopatik değişiklikler yönünden kontrol edildi.

2.2.3. DNA Ekstraksiyonu

Virus inokulasyonu yapılan hücrelerde en az %90 CPE görülmesinin ardından, virus toplandı ve 3 kez dondurma/çözme işleminden sonra 4°C'de, 3000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant, 2 saat boyunca 61.000 x g'de 4°C'de aynı şekilde santrifüj edilip, pelet 12 ml TE tamponu (10Mm Tris-HCl, 1mM EDTA, pH:7.4) bulunan bir tüpte resüspanse edildi. Daha sonra % 40'lık, 3 ml sukroz üzerinde tabakalanması sağlandı. 4°C'de, 4 saat boyunca 61.000 x g'de santrifüjden sonra elde edilen virus peleti, 550 µl moleküler su içinde resüspanse edildi. 35 µl %20' lik SDS ve 40 µl proteinaz K (ThermoScientific, #AM2548, 20 mg/ ml) eklendikten sonra, 37°C'de 1 saat boyunca inkube edildi. İki kere fenol-kloroform (ThermoScientific, #AM9730) 25:24:1 (625 µl) ile yıkanıp, daha sonra oda ısısında 3-5 dakika, 12,000 x g'de santrifüj edildi. Sıvı faz yeni bir tüpe alınıp, 1/10 oranında 3M sodyum asetat, 2 hacim %95 etanol (EtOH) eklenerek karıştırılıp, en az 1 saat boyunca -80°C'de tutuldu. 12,000 x g' de, 4°C' de 30 dakika boyunca santrifüjden sonra, sıvı faz ayrıldı. 4°C' de, 12,000 x g' de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan

sonra, 300 µl % 70 lik EtOH eklenip, viral pelet 20 µl moleküler su içinde resüspanse edildi. BoHV-4 DNA'sının doğrulanması için gB spesifik primerler ile PCR yapıldı (Çizelge 2.5; Goltz ve ark., 1994).

2.2.4. pSP72-ORF2-ORF3'ün Oluşturulması

ORF2 (Bo2, Gen bankası No.NC002665- 2000 bp) ve ORF3 (Bo3, Gen bankası No.NC002665- 2000 bp) primerleri ve PCR koşulları Donofrio ve ark. (2009) bildirdiği şekilde uygulandı.

Virusun ORF2 ve ORF3 bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. Aşağıda verilen tablolarda PCR reaksiyonunda kullanılan primer çiftleri ve PCR reaksiyonu şartları verildi (Çizelge 2.3 ve 2.5).

Çizelge 2.3. Bu çalışmada kullanılan primerlerin dizi, hedef bölgesi ve ürün büyüklüğü.

Primer kodu	Primer dizini (5'→3')	Ürün büyüklüğü	Literatür
ORF2-F ^a	CCG CTCGAG ACGCGTGCCAAT TTCAACAGAATATCATAC	2000 bp	Donofrio ve ark., 2009
ORF2-R	GCCGGTACCTATGTTATGGGG GTCCATCAAAG		
ORF3-F	CGGGGTACCGCCATTCTCCAG AGGATGATAAAA	2000 bp	Donofrio ve ark., 2009
ORF3-R ^b	GCC GAATTC GTTAGGTACAGC ATTGAGTTTGTG		
gB-F	CCCTTCTTTACCACCACCTACA	615 bp	Goltz ve ark., 1994
gB-R	TGCCATAGCAGAGAAACAATGA		

^a : XhoI ve ^b : EcoRI kesim enzimlerin dizisi koyu çizgi ile gösterildi.

Çizelge 2.4. BoHV-4 gB PCR için miks bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı Döngüleri
10 X Taq DNA polimeraz buffer	3	94 °C'de 3 dk 94 °C'de 30 s } 30 siklus 50 °C'de 20 s } 72 °C'de 45 s } 72 °C'de 10 dk
10 mM dNTP mix	0.5	
Primer F (10 pmol/µl)	0.5	
Primer R (10 pmol/µl)	0.5	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0.3	
Nükleaz Free Su	19.8	
DNA (5ng/µl)	3	
Toplam	30	

Çizelge 2.5. BoHV-4 ORF2 ve 3 için PCR miks bileşenleri ve programı.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı döngüleri
5 X phusion HF buffer	10	98 °C'de 30 s 98 °C'de 10 s } 30 siklus 55 °C'de 15 s } 72 °C'de 32 s } 72 °C'de 10 dk
10 mM dNTP mix	1	
Primer F (10 pmol/µl)	0,3	
Primer R (10 pmol/µl)	0,3	
Phusion DNA polymerase (2u/µl)	0.5	
Nükleaz Free Su	34.9	
DNA (5ng/µl)	3	
Toplam	50	

Elde edilen ORF2 PCR ürünü ve pSP72 vektörünün fastdigest XhoI (ThermoScientific, # FD0694) ve fastdigest KpnI (ThermoScientific, #FD0524) ile kesilip (Çizelge 2.6), T4 DNA ligaz enzimi ile (ThermoScientific, #EL0014) ligasyonları yapıldı. Aşağıda PCR ürününün enzim ile kesim protokolü verildi (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.6. pSP72 ve ORF2 PCR ürünlerin kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
DNA (ORF2 PCR ürünü yada pSP72) (1µg)	1	37°C de 15 dk
Fastdigest 10X buffer	2	
XhoI fastdigest	1	
KpnI fastdigest	1	
Nükleaz Free Su	13	
Toplam	20	

Çizelge 2.7. pSP72 ve ORF2 için T4 ligaz ile ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
pSP72 vektör ^a	2	22°C de 1 saat
ORF2 insert ^a	4	
10X T4 ligaz buffer	1	
T4 ligaz enzimi	2	
Nükleaz Free Su	11	
Toplam	20	

^a: Vektör-insert oranı 3:1 olarak hesaplandı.

Kesim gerçekleştikten sonra kit (GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit; ThermoScientific, #K0831) yardımıyla DNA clean-up yapıldı. DNA miktarı su ile 200 µl'ye kadar tamamlandı. Daha sonra 100 µl binding buffer eklenip, ardından 300 µl %100 EtOH ilave edildi. Karışım filtreli tüpe eklenip, 14,000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. 700 µl wash buffer eklenip, 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Son olarak 30 µl Elüsyon buffer eklenip, santrifüjden sonra DNA toplandı. Daha sonra DH5-alfa competent bakteriye (DH5-alpha Competent cells, ThermoScientific, #18265017) ligasyon ürünlerinin transformasyonu gerçekleştirildi.

2 µl ligasyon ürününden alınıp, 50 µl hacminde hazırlanan DH5-alfa kompetent bakteriye eklendi. Daha sonra bakteri 30 dakika buzda bekletildi. Ardından 42°C'de 30 saniye bekletilip, son basamakta 600 µl Super Optimal Brothdan (SOC) bakteriye eklenip, 37°C de 1 saat 250 rpm'de santrifüjün ardından,

ampisilin içeren LB agar tablette (100µg/µL) gece boyunca 37°C’de çoğaltıldı. Pozitif bakteri kolonilerinin seçimi için koloni PCR tekniği kullanıldı. Koloni PCR için, aşağıda verilen PCR şartları ve primerleri kullanıldı (Çizelge 2.8).

Pozitif koloniler 37°C’de 16 saat Luria-Bertani (LB) Broth içersinde (Ampisilin 100µg/µL) çoğaldıktan sonra, plazmid ekstraksiyon kiti (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, ThermoScientific, #K0502) ile ekstraksiyonu yapıldı ve ikinci doğrulama için KpnI ile restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirildi. Plazmid ekstraksiyonu için tek koloni seçilip, 5 ml 100 µg/µl ampisilin içeren LB brothda 37°C’de, 250 rpm’de gece boyunca çoğaltıldı. Elde edilen bakteriler, 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilip, üstteki sıvı atıldı. 250 µl resüspansiyon solüsyonu ile pelet çözüldü. Daha sonra 250 µl lizis buffer eklenip, oda ısısında 5 dakika bekletildi. Ardından 350 µl nötralize solüsyondan ilave edilip, 5 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi. Üstteki sıvı alınıp, filtreli tüplere aktarıldı ve tekrar 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. 500 µl yıkama solusyonu ile iki kere yıkandı. Son olarak 50 µl elüsyon buffer içinde plazmidler toplandı.

Çizelge 2.8. BoHV-4’ün ORF2 ve 3 için koloni PCR miks bileşenleri ve programı

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı döngüleri
10 X Taq buffer	3	94 °C’de 10 dk 94 °C’de 1 dk 50 °C’de 30 s 72 °C’de 2 dk 72 °C’de 10 dk 25siklus
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	
10 mM dNTP mix	0,5	
T7 Primer F (10 pmol/µl) 5’-TAATACGACTCACTATAGGG-3’	0,5	
SP6 Primer R (10 pmol/µl) 5’-ATTTAGGTGACACTATAG-3’	0,5	
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0.25	
Nükleaz Free Su	19,85	
Toplam	27	

Virusun ORF3 bölgesi aynı PCR şartları ile çoğaltıldı (Çizelge 2.3 ve 2.5). Daha sonra ORF3 PCR ürünü ve pSP72-ORF2 plazmidi fastdigest KpnI (ThermoScientific, #FD0524) ve fastdigest EcoRI (ThermoScientific, #FD0274) ile aynı protokole uygun olarak kesilip (Çizelge 2.9), ligasyonları gerçekleştirildi (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.9. pSP72-ORF2 plazmid ve ORF3 PCR ürünlerinin kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
DNA (ORF3 PCR ürünü ya da pSP72-ORF2) (1µg)	1	37°C de 15 dk
Fastdigest 10X buffer	2	
EcoRI fastdigest	1	
KpnI fastdigest	1	
Nükleaz Free Su	13	
Toplam	20	

Çizelge 2.10. pSP72-ORF2 ve ORF3 için T4 ligaz ile ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
pSP72-ORF2 vektör ^a	2	22°C de 1 saat
ORF3 insert ^a	4	
10X T4 ligaz buffer	1	
T4 ligaz enzimi	2	
Nükleaz Free Su	11	
Toplam	20	

Ligasyon ürünleri DH5-alfa bakterisine transforme edildi. Koloni PCR ile aynı koşullarda doğrulama gerçekleştirildi (Çizelge 2.9); daha sonra pozitif kolonilerin plazmid ekstraksiyonu kit ile yapıldı. Elde edilen pSP72-ORF2-ORF3 plazmidi EcoRI ile kesildi ve doğrulandı.

2.2.5. pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo Plazmidin Hazırlanması

CMV-EGFP-Neo kaseti pEGFP-C1, (Clontech, #6084-1) plazmidten AseI

(ThermoScientific, #ER0911) ve ApaLI (ThermoScientific, #ER0041) enzimleri kullanılarak çıkartıldı. Kesim protokolü aşağıda verildi (Çizelge 2.11).

Çizelge 2.11. pEGFP-C1 plazmidin kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
pEGFP-C1 plazmid (300ng)	3	37°C de 2 saat
ApaLI enzimi	1	
AseI enzimi	1	
10X Tango buffer	2	
Nükleaz Free Su	13	
Toplam	20	

Kesimden elde edilen CMV-EGFP-Neo kasetinin jel ekstraksiyon kiti (GeneJET Gel Extraction and DNA Clean-up Micro Kit, ThermoScientific, #K0831) ile ekstraksiyonu yapıldı. İstenilen bant, UV ışığı altında jelde görüntülendikten sonra kesildi. Her 100 g DNA içeren agaroz jel için 100 µl binding buffer eklendi ve 60°C’de, en az 10 dakika çözülene kadar bekletildi. Üzerine 300 µl %100 EtOH eklenip, filtreli santrifüj tübe aktarıldı. 14000 rpm’de 1 dakika santrifüjden sonra yıkama solusyonu eklenip, tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi. Son olarak 30 µl elüsyon buffer eklenip, tekrar santrifüj edilip, DNA toplandı. Daha sonra T4 DNA polimeraz (ThermoScientific, #EP0061) enzimi ile aşağıda verilen protokole uygun olarak küt (blunt) uçlar elde edildi (Çizelge 2.12).

Çizelge 2.12. CMV-EGFP-Neo kasetin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
5× reaksiyon buffer	4	11°C de 20 dk, 75°C de 10 dk inaktivasyon
dNTP 2mM	1	
T4 DNA polimeraz	0.2	
Linear CMV-EGFP-Neo (300ng)	3	
Nükleaz Free Su	11.8	
Toplam	20	

BAC plazmidi HindIII (NEB, #R0104S) enzimi ile aşağıda bildirilen yönteme uygun olarak kesilip linear hale getirildi (Çizelge 2.13).

Çizelge 2.13. pBeloBAC11 plazmidin kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
pBeloBAC11Plazmid (100ng)	10	37°C de 15 dk
10X NEB 3.1 buffer	5	
HindIII enzimi	1	
Nükleaz Free Su	34	
Toplam	50	

Kesilmiş pBeloBAC11 plazmide, GeneJET kit ile clean-up yapıldı ve aynı şekilde T4 DNA polimeraz ile küt uçlar elde edildi (Çizelge 2.14).

Çizelge 2.14. Linear pBeloBAC11 plazmidin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
5× reaksiyon buffer	4	11°C de 20 dk, 75°C de 10 dk inaktivasyon
dNTP 2mM	1	
T4 DNA polimeraz	0.2	
Linear pBeloBAC11 plazmid (100ng)	10	
Nükleaz Free Su	4.8	
Toplam	20	

Elde edilen uçların BAC plazmid ve CMV-EGFP-Neo kasetin, T4 Ligaz enzimi ile aşağıda bildirilen şekilde ligasyonu yapıldı (Çizelge 2.15).

Çizelge 2.15. Linear BAC ve CMV-EGFP-Neo kasetin T4 ligaz ile ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
Linear pBeloBAC11 ^a	2	22°C de 1 saat
CMV-EGFP-Neo Kaset ^a	2	
T4 Ligaz 10× Buffer	2	
T4 Ligaz enzimi	1	
PEG4000	2	
Nükleaz Free Su	11	
Toplam	20	

^a: Vektör-insert oranı 3:1 olarak hesaplandı.

Ligasyon ürünü DH5-alfa kompetent hücreye transforme edildi ve transformasyondan sonra kloramfenikol (15µg/µL) içeren tablette çoğaltıldı. Bu konstraktın doğrulaması için restriksiyon kesimi, fastdigest XhoI ile yapıldı ve jelde görüntüldü. Ayrıca bu konstrakt 293FT hücreye transfekte edilip, EGFP ekspresyonu doğrulandı. Transfeksiyondan 24 saat önce HEH293IQ hücreleri, 24 gözlü tablette hazırlandı. Transfeksiyon için Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (ThermoScientific, #L3000015) kullanıldı. 125 µl opti-MEM (ThermoScientific, #31985062) vasatın içine, 2.5 µg pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo plazmid ve 5µl p3000 reagentdan eklendi. Aynı zamanda 125 µl opti-MEM vasatın içinde 5 µl Lipofectamine 3000'den eklenip, daha sonra bu karışım DNA içeren tüpe aktarıldı. Oda ısısında 10-15 dakika beklendikten sonra karışım, %90 kaplamış İnsan Embryo Böbrek (HEK293IQ) hücre kültürüne inokule edildi. İnokulasyondan 6 saat sonra vasat alınıp, üzerine High Glucose DMEM eklendi ve 72 saat sonra floresan mikroskopda EGFP ekspresyonu doğrulandı.

2.2.6. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 Plazmidin Hazırlanması

pSP72-ORF2-ORF3 plazmidi, fastdigest KpnI enzimi kullanılarak linear hale getirildikten sonra (Çizelge 2.16), T4 DNA polimeraz ile küt uçlu yapı oluşturuldu (Çizelge 2.17).

Çizelge 2.16. pSP72-ORF2-ORF3 plazmidin kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
pSP72-ORF2-ORF3 Plazmid (500ng)	2	37°C de 15 dk
10X Fastdigest buffer	2	
KpnI enzimi	1	
Nükleaz Free Su	15	
Toplam	30	

Çizelge 2.17. pSP72-ORF2-ORF3 plazmidin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
5× reaksiyon buffer	4	11°C de 20 dk, 75°C de 10 dk inaktivasyon
dNTP 2mM	1	
T4 DNA polimeraz	0.2	
Linear pSP72-ORF2-ORF3 plazmid (1µg)	1	
Nükleaz Free Su	13.8	
Toplam	20	

Aynı zamanda pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo plazmidi de MluI enzimi (ThermoScientific, #ER0561) ile linear hale getirilip (Çizelge 2.18), aynı şekilde T4 DNA polimeraz kullanılarak küt uçlu olması sağlandı (Çizelge 2.19). İki linear konstraktın ligasyonu T4 Ligaz ile yapıp (Çizelge 2.20), bu ligasyon ürünü DH5-alfa kompetent hücrelere (NEB, #C3019I) aynı protokol ile transforme edildi.

Çizelge 2.18. pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo plazmidin kesim protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo Plazmid (100ng)	10	37°C de 2 saat
10X Tango buffer	2	
MluI enzimi	1	
Nükleaz Free Su	7	
Toplam	30	

Çizelge 2.19. pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo plazmidin T4 DNA polimeraz ile küt uç elde etme protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
5× reaksiyon buffer	4	11°C de 20 dk, 75°C de 10 dk inaktivasyon
dNTP 2mM	1	
T4 DNA polimeraz	0.2	
Linear pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo plazmid (100ng)	5	
Nükleaz Free Su	9.8	
Toplam	20	

Çizelge 2.20. Linear pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo ve pSP72-ORF2-ORF3 plazmidlerin T4 ligaz ile ligasyon protokolü.

Bileşen	Konsantrasyon (µl)	Isı
Linear pBelo-BAC11-CMV-EGFP-Neo ^a	2	22°C de 1 saat
pSP72-ORF2-ORF3 ^a	2	
T4 Ligaz 10× Buffer	2	
T4 Ligaz enzimi	1	
PEG4000	2	
Nükleaz Free Su	11	
Toplam	20	

^a: Vektör-insert oranı 1:1 olarak hesaplandı.

Transformasyondan sonra pozitif koloniler ampicilin (100µg/µL) ve kloramfenikol (15µg/µL) içeren LB agardan seçildi. Plazmid ekstraksiyonu GeneJET kit ile yapıldı. Bu konstraktın doğrulaması için restriksiyon kesimi fastdigest XhoI ile yapıldı ve ardından agaroz jelde görüntülendi. Konstraktın yeşil floresan protein (EGFP) ekspresyonu, HEK293FT hücrelerinde Lipofectamine 3000 ile yukarıda verilen protokole göre doğrulandı. Ayrıca bu konstraktın dizinini kontrol etmek için yeni nesil sekanslama yapıldı ve Integrative Genomics Viewer (IGV) programı ile analiz edildi.

2.2.7. MDBK Hücresinde Homolog Rekombinasyon İle BoHV-4-BAC-EGFP Hazırlanması

Rekombinant virusun üretilmesi için T75 hücre kültürü şişesinde üretilen MDBK hücresi, BoHV-4 Movar suşu ile 1 moi olarak enfekte edildi. Virus inokulasyondan 24 saat sonra pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidi elektroporasyon ile hücreye verildi. Elektroporasyon için hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 2 kere 1X fosfat buffer saline (PBS) ile yıkanıp, 1000 rpm’de, 5 dakika santrifüj edildi. Hücre peleti 5×10^6 oranında, 750 µl 1X PBS ile resüspanse edildi. Sirküler pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidi ve 30 µgr Salmon Sperm DNA (ThermoScientific, #AM9680) ile birlikte 50 µl olarak hücreye eklendi. Hücre ve DNA karışımı 0.4 mm küvete aktarıldı ve elektroporasyon CelljecT Duo (ThermoScientific, ABD) elektroporasyon cihazı ile 270 µV, 1500 F’de gerçekleştirildi. Elektroporasyonun ardından hücreler tekrar % 2 FDS içeren DMEM ilave edilmiş, T75 hücre kültürü şişelerine aktarılaraq 37°C’ye kaldırıldı. EGFP ekspresyonu her gün floresan mikroskop ile takip edildi. Elektroporasyondan 7 gün sonra %90 CPE gösteren hücreler ve supernatant 3 kez dondurulup/çözdürüldü. Daha sonra 3000 rpm’de, 4°C’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant rekombinant virus içeren materyal olarak -80°C’de donduruldu. Ayrıca hücre transfeksiyonu Lipofectamine 3000 (Donofrio ve ark., 2009) ile de denendi ve rekombinasyonun gerçekleşmesinde elektroporasyon metodu ile karşılaştırıldı.

2.2.8. Rekombinant Virus Seçimi

Altı gözlü hücre kültürü tabletlerinde (Greiner, Almanya) MDBK hücresi hazırlandı. Hücreler %70-80 oranında kapladıktan sonra, elde edilen rekombinant ve rekombinant olmayan karışım viruslar hücreye adsorbsiyona bağlı yöntem ile inokule edildi. Adsorbsiyon için viruslar, 2 saat 37°C’de inkube edildi ve plak test için hücrelerin üzerine agar eklendi. Agar hazırlamak için %2 UltraPure Low Melting Point Agarose, (ThermoScientific, #16520050) eşit hacimde 2x DMEM ile 37°C de karıştırıldı ve hücreye eklendikten sonra oda ısısında 15 dakika, donması için bekletildi. Daha sonra viruslar 37°C’de, %5 CO₂’li inkubatörde tutuldu. 7-10 gün sonra oluşan yeşil plaklar floresan mikroskop altında seçilip toplandı ve 250 µl DMEM içersinde, 4°C’de gece boyunca virusun serbest kalması için bekletildi. Elde edilen viruslar -80°C’lik derin dondurucuya kaldırıldı.

2.2.9. Rekombinant Plakların Pürifikasyonu

Toplanan yeşil floresan proteini eksprese eden viruslar, tekrar aynı protokol ile 8 kere plak pürifikasyonuna tabi tutuldu. Elde edilen yeşil floresan proteini eksprese eden viruslar, 3 kere BEK hücrelerinde 500µg/µl genetisin (G418) antibiyotik içeren DMEM vasatta pasajlandı. Bu yöntemde T75 flaskta hazırlanan %90 oranında kaplamış BEK hücrelerine adsorbsiyonlu metot ile virus inokule edildi. Daha sonra G418 içeren DMEM vasatı hücrelere eklendi. İnokulasyondan 5 gün sonra %90 CPE gösteren hücreler toplandı. Üçüncü pasajdan sonra toplanan viruslar saf rekombinant virus olarak kabul edilerek, -80°C’de stoklandı.

2.2.10. Hirt Metodu ile Sirküler BoHV-4-BAC-EGFP Elde Edilmesi

Elde edilen saf rekombinant yeşil parıldama veren viruslar, tekrar MDBK hücresine yukarıda bildirilen yöneme göre ekildi ve stok virus -80°C’de tutuldu. Hirt metodu için, ilk olarak MDBK hücresi hazırlandı ve hücreler %80 kapladığında virus

100 moi olarak inokule edildi. Virus inokulasyondan 6 saat sonra enfekte hücreler tripsin ile toplandı ve Hirt ekstraksiyonu gerçekleştirildi (Hirt, 1967). Elde edilen hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı ve 500 µl resüspanسیون buffer içinde çözüldü (Çizelge 2.21). Daha sonra 500 µl lizis buffer eklenip (Çizelge 2.22), 10 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından 660 µl 5M NaCl eklenip, 4°C de gece boyu tutuldu. Karışım 14000 rpm de, 4°C’de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası üstteki sıvı toplandı. 800 µl izopropanol ile presipitasyon gerçekleştirildi. 14000 rpm’de tekrar 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet 1 ml %70’lik etanol ile yıkandı ve kuru pelet 50 µl TE bufferda çözüldü.

Çizelge 2.21. Hirt yönteminde kullanılan Buffer I (resüspanسیون buffer).

Bileşen	Konsantrasyon
50mM Tris, pH 7.5(1M)	1.25 ml
10mM EDTA(0.5M)	0.5 ml
50µg/ml RNase A(50 mg/ml stok)	25 µl
Nükleaz Free Su	23.2 ml
Toplam	25ml

Çizelge 2.22. Hirt yöntemde kullanılan Buffer II (lizis buffer).

Bileşen	Konsantrasyon
1.2% SDS(10% SDS stoktan)	3 ml
Nükleaz Free Su	22 ml
Toplam	25ml

2.2.11. Sirküler Rekombinant BoHV-4-BAC-EGFP Transformasyonu

Hirt metodu ile hazırlanan sirküler rekombinant BoHV-4-BAC-EGFP, 10 µl hacimde DH10B bakterisine (ThermoScientific, #12033015) elektroporasyon ile transforme edildi. Elektroporasyon 0,1 ml küvette (BioRad, #1652089) gerçekleştirildi. 100 µl bakteri küvette aktarıldı ve üzerine 10 µl Hirt ekstraksiyonundan elde edilen DNA eklendi. Elektroporasyon MicroPulser Electroporator (BioRad, ABD) cihazında Ec1 programı (1.8 kV) kullanılarak yapıldı. Elektroporasyondan sonra 1 ml SOC vasattan eklenip, 37°C’de 250 rpm’de santrifüj

edildi. 150 µl alınan bakteriden, 12.5 µg/µl kloramfenikol içeren LB agara ekilip, agar 37°C’de gece boyu inkubasyona bırakıldı. Çıkan koloniler ekstraksiyondan sonra EcoRI kesim enzimi ile doğrulandı. Ayrıca bakteri transformasyonu için kalsiyum klorid (CaCl₂; Sambrook ve Russel, 2000) metodu da transformasyonun gerçekleşmesinde elektroporasyon metodu ile karşılaştırıldı.

2.2.12. MDBK Hücresinde Rekombinant Virus Eldesi

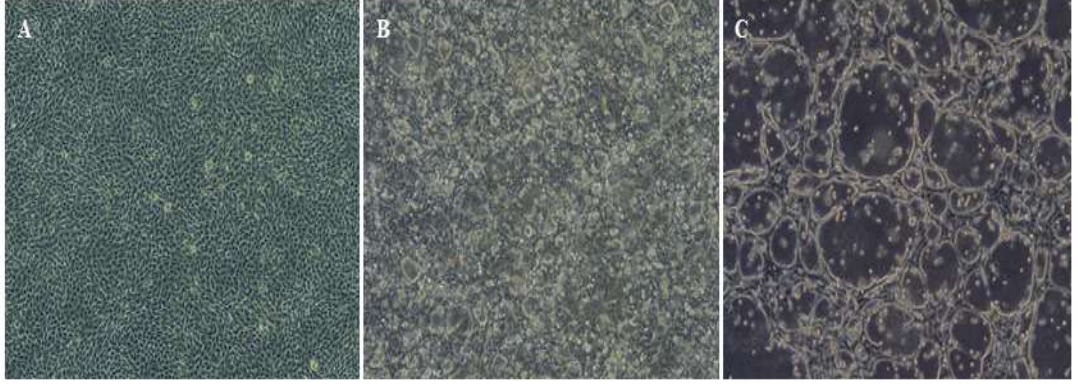
Plazmid ekstraksiyonundan elde edilen rekombinant viral DNA, 6 gözlü tablette üretilen MDBK hücresinde Lipofektamin 3000 ile transfekte edildi ve rekombinant virusun oluşması için 37°C’de 10 gün bekletildi. Oluşan viruslar 3 kere dondur/çözden sonra -80°C ye kaldırıldı.



3. BULGULAR

3.1. BoHV-4'ün Hücre Kültüründe Çoğaltılması

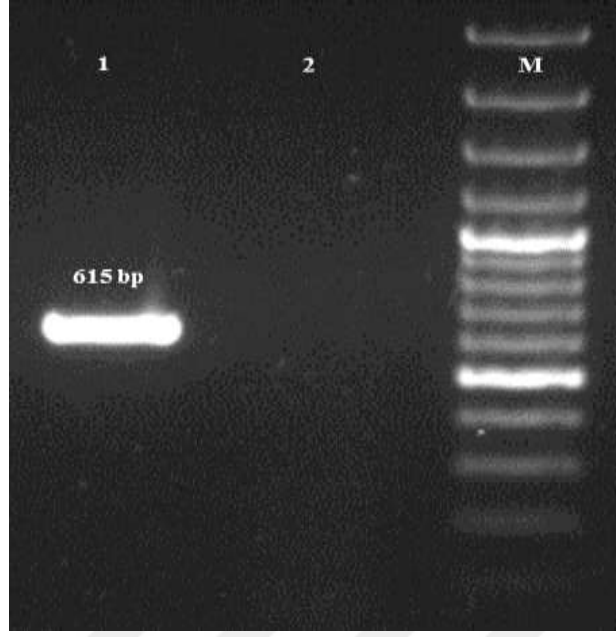
Virus çoğalması MDBK hücrelerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla virus %50 kaplanmış hücreye inokule edildiğinde, daha yüksek titre elde edildi. Genel olarak sitoliz, hücre yuvarlaklaşması ve hücre dökülmesi ile karakterize CPE inokulasyondan 72 saat sonra başladı. Beşinci-6. günde tüm hücreler enfekte oldu ve üreyen viruslar toplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. BoHV-4'ün MDBK hücrelerinde çoğalması. (A) Negatif kontrol. (B) İnokulasyondan 72 saat sonra. (C) 5-6. günde tespit edilen CPE.

3.2. DNA Ekstraksiyonu

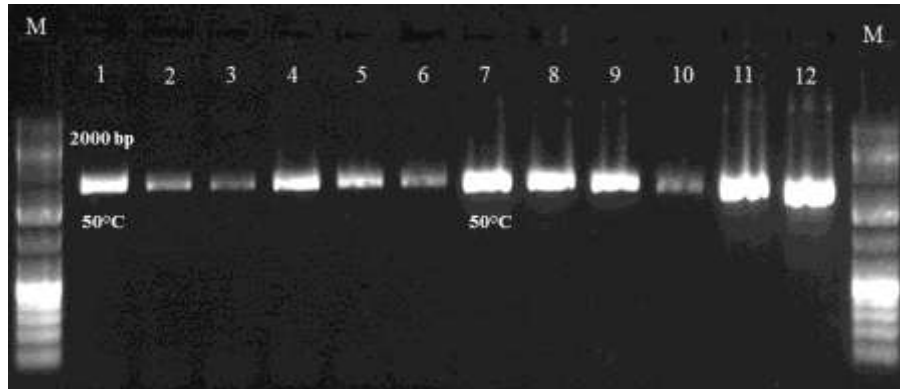
DNA ekstraksiyonu amacıyla tasarlanan protokol ile her T75 hücre kültürü şişesinden yaklaşık 1.5- 2 µg olacak şekilde saf viral DNA (260/280 oranı: 1.8-2) elde edildi. Elde edilen viral DNA, BoHV-4'ün gB bölgesine yönelik spesifik primerler ile doğrulandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. BoHV-4 gB PCR sonucu. 1: Pozitif bant (615 bp) ve 2: negatif kontrol. Merdiven (M): 100 bp ladder (ThermoScientific, SM0241).

3.3. pSP72-ORF2-ORF3'ün Oluşturulması

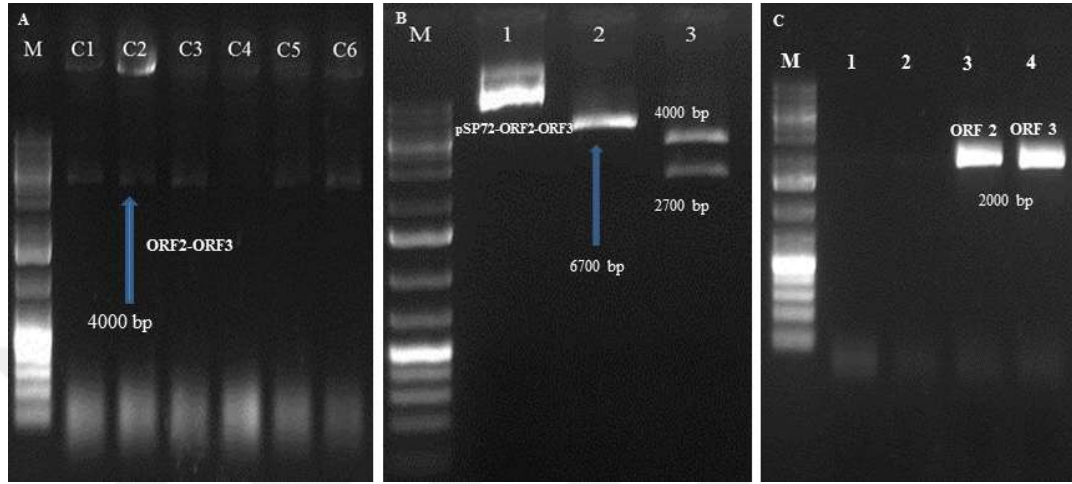
BoHV-4 ORF2 ve ORF3 Phusion enzimi ile belirlenen koşullarla çoğaldı. En uygun bağlanma derece ise 50°C olarak tespit edildi (Şekil 3.3).



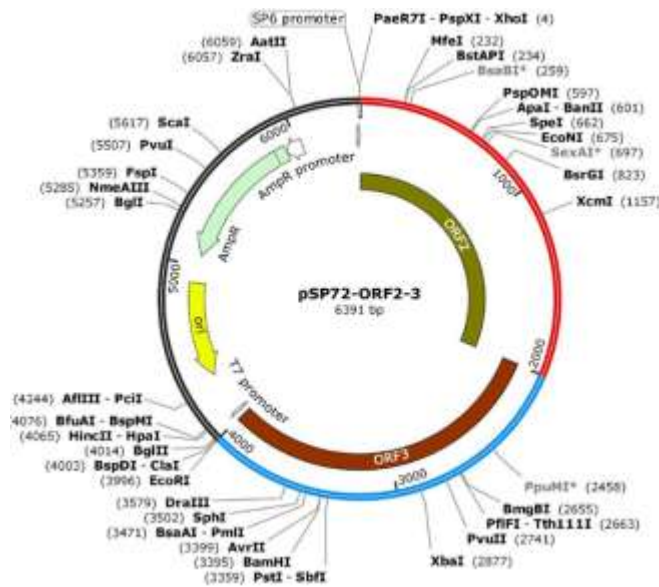
Şekil 3.3. ORF2 ve 3 için gradient PCR (50-60°C) sonuçları. 1-6: ORF2 için gradient PCR ve 7-12: ORF3 için gradient PCR. Merdiven (M): 1 kbp plus ladder (ThermoScientific, SM1331).

Daha sonra ORF2 ve ORF3 PCR ürünleri, pSP72 vektöre klasik yöntem ile klonlandı ve elde edilen pSP72-ORF2-ORF3 plazmid (Şekil 3.5) koloni PCR ile

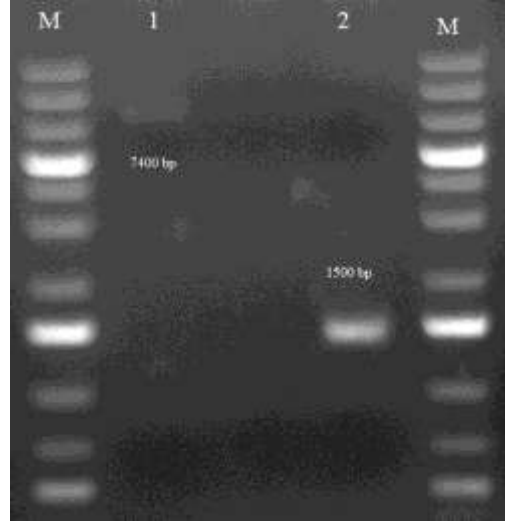
transforme bakterilerden seçildi. Pozitif koloniler plazmid ekstraksiyonundan sonra XhoI enzimi ve daha sonra XhoI ve EcoRI ile kesildi ve doğrulandı (Şekil 3.4B). Ayrıca ORF2 ve ORF3 varlığı PCR ile tespit edildi (Şekil 3.4A ve C).



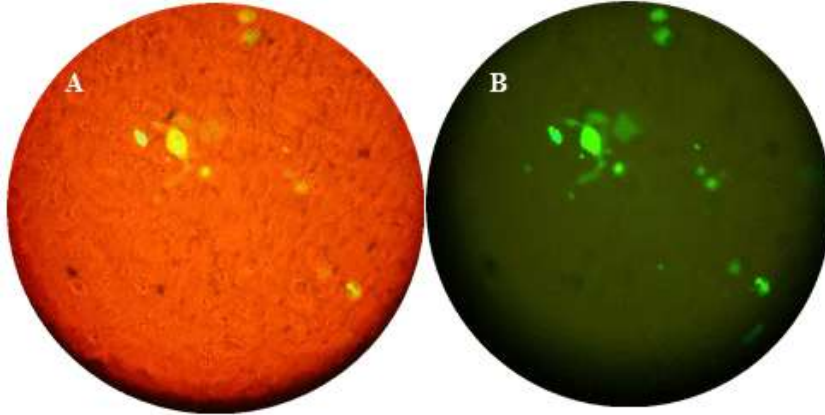
Şekil 3.4. pSP72-ORF2-ORF3 konstraktın doğrulanması. (A) koloni PCR ile yapılan doğrulamada 4000 bp spesifik ORF2 ve -3' içeren bant. Toplam 6 koloniden (C1-6) hepsi pozitif olarak tespit edildi. M: merdiven (1kb plus, ThermoScientific). (B) Doğrulama plazmid ekstraksiyonundan sonra kesim enzimleri ile yapıldı. Tek kesim (1) için KpnI ve çift kesim (2) için EcoRI ve XhoI seçildi. Tek kesimde tek bant 6700 bp ve çift kesimde 4000bp insert ve 2700bp vektör jelde görüntüldü. Kesilmemiş vektör (3) plazmid kontrolü olarak görüntüldü. (C) Ayrıca, izole edilmiş plazmidlerden ORF2 ve -3'e spesifik primerler ile bu genlerin varlığı tespit edildi (3 ve 4). Plazmid içermeyen reaksiyonlar (1 ve 2) negatif kontrol olarak belirlendi. Merdiven (M): 1 kbp plus ladder (ThermoScientific, SM1331).



Şekil 3.5. pSP72-ORF2-ORF3 vektörün genom haritası.



Şekil 3.7. BamHI ile kesilmiş pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo ve oluşan (1) BAC (7400 bp) ve (2) EGFP (1500 bp) bantları. Merdiven (M): 1 kbp plus ladder (ThermoScientific, SM1331).

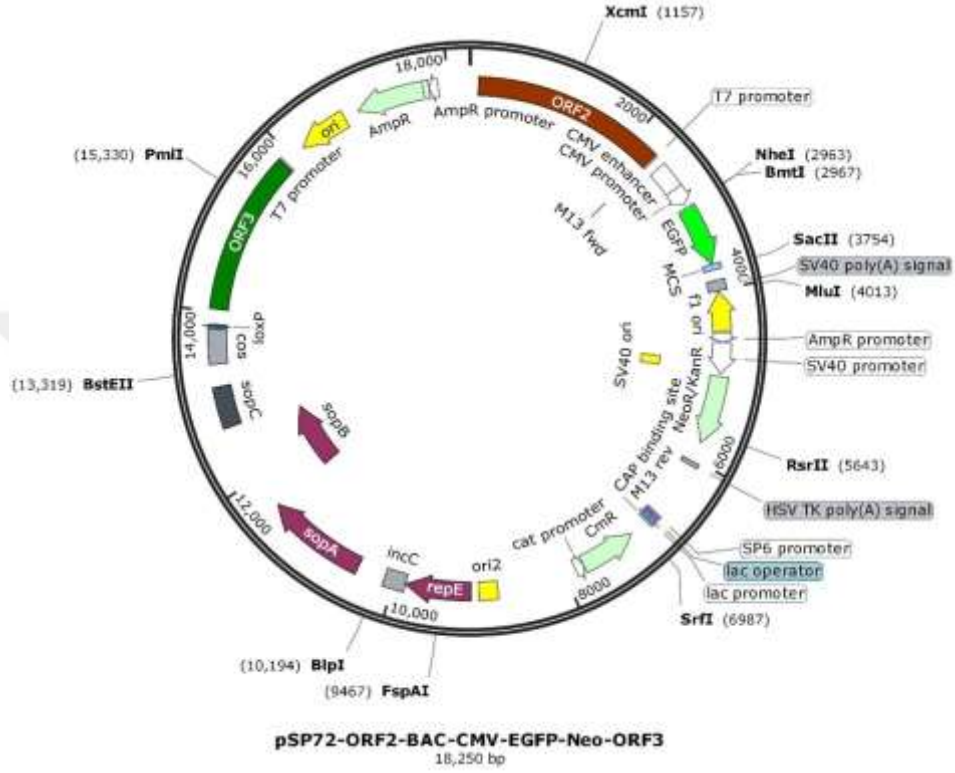


Şekil 3.8. Transfeksiyondan 72 saat sonra HEK293IQ hücrelerinde pBeloBAC-CMV-EGFP-Neo plazmidin EGFP ekspresyon doğrulaması. A: Faz kontrast ve B: floresan görüntü.

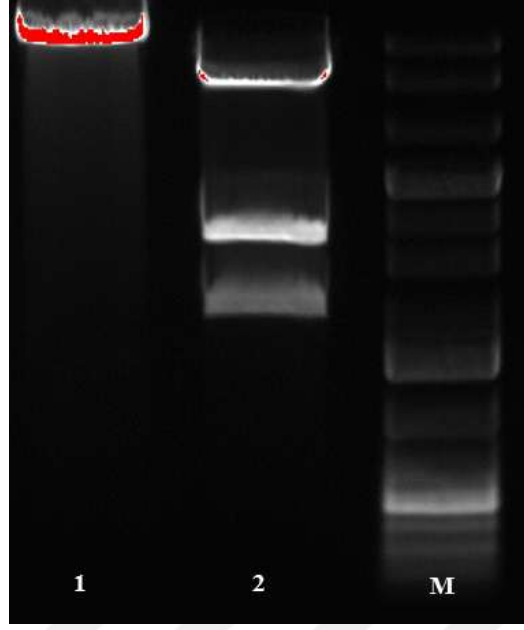
3.5. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 Plazmidin Hazırlanması

pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 konstraktı (Şekil 3.9) pBeloBAC11-CMV-EGFP-Neo plazmidin pSP72-ORF2-ORF3'e aktarımı ile hazırlandı. Bu plazmidin doğrulaması ekstraksiyondan sonra XhoI kesimi ile gerçekleştirildi (Şekil 3.10). HEK293FT hücrelerinde yeşil floresan protein ekspresyonu

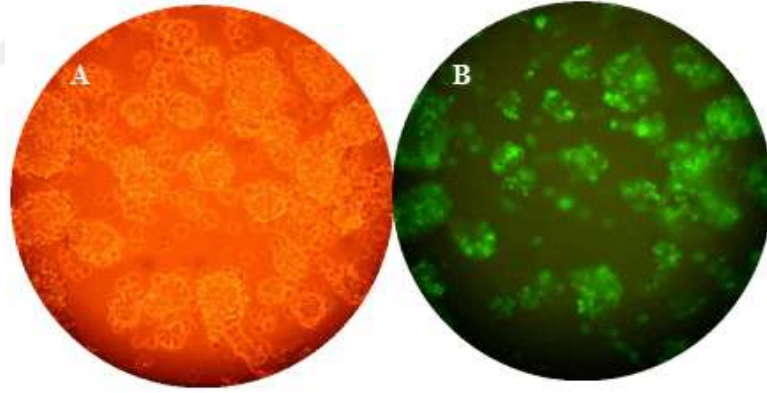
tespit edildi (Şekil 3.11). Son basamak olarak bu konstraktın dizini yeni nesil sekanslama ile kontrol edildi. Yeni nesil sekansın sonuçları IGV programı ile analiz edildi ve mutasyon bulunmadı (Şekil 3.12).



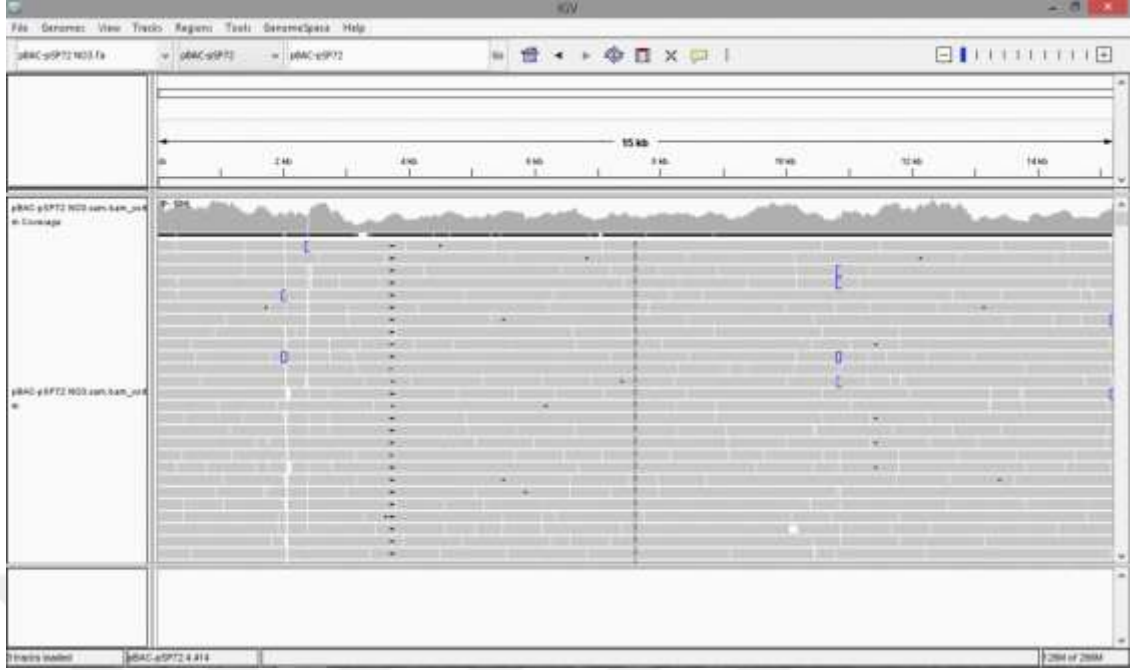
Şekil 3.9. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 vektörün genom yapısı.



Şekil 3.10. pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-ORF3 vektörün XhoI ile kesimi ve doğrulaması. (1) kesilmemiş vektör ve (2) XhoI ile kesilmiş vektör. Merdiven (M): 1 kbp plus ladder (ThermoScientific, SM1331).



Şekil 3.11. Transfeksiyondan 72 saat sonra HEK293FT hücresinde pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidin EGFP ekspresyon doğrulaması. A: Faz kontrast ve B: floresan görüntü.



Şekil 3.12. IGV programı ile pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidin yeni nesil sekanslama analizi.

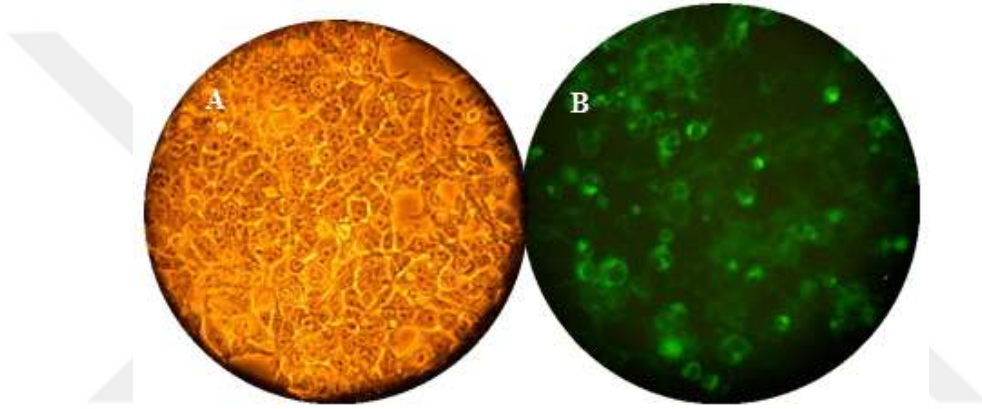
3.6. MDBK Hücresinde Homolog Rekombinasyon ile BoHV-4-BAC-EGFP Hazırlanması

Homolog rekombinasyon için MDBK hücresi kullanıldı. Transfeksiyon metodu olarak elektroporasyon metodu, kimyasal metoda (Lipofectamine 3000) göre daha etkili bulundu. Enfekte hücrelerde pSP72-ORF2-BAC-CMV-EGFP-Neo-ORF3 plazmidin transfeksiyonundan sonra, ilk CPE 5. günde tespit edildi ve virusun üremesi 12. güne kadar devam etti. Transfeksiyondan sonra hemen hemen tüm hücrelerde yeşil floresan proteinin ekspresyonu tespit edildi. Birinci virus pasajında rekombinant virus oranı düşüktü ancak yapılan pasajlar ile bu oran artırıldı.

3.7. Rekombinant Virus Seçimi ve Pürifikasyonu

Rekombinant virusların seçimi için plak pürifikasyon yöntemi tercih edildi. Birinci plak pürifikasyonda sadece 4-5 adet rekombinant yeşil enfekte hücre tespit

edildi. Rekombinant virusun replikasyon hızı normal viruslara göre daha yüksek bulundu. Enfekte yeşil hücrelerin oranı plak pürifikasyon sayısı arttığında çoğaldı. Rekombinant virus oranını arttırmak adına, virus seçimine BEK hücrelerinde ve genetisin antibiyotik içeren vasat ile devam edildi. Genetisinin letal dozunu bulmak için enfekte olmayan BEK hücresi, farklı G418 dozları ile karşılaştırıldı. En düşük letal doz olarak 500µg/µl seçildi. Rekombinant viruslar 3 kere BEK hücrelerinde 500µg/µl G418 ile pasajlandı ve son pasajda rekombinant virus oranı en az %80-90 olarak tespit edildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Rekombinant yeşil virusların BEK hücrelerinde 3. pasajdan sonra üremesi. A: Faz kontrast ve B: floresan görüntü.

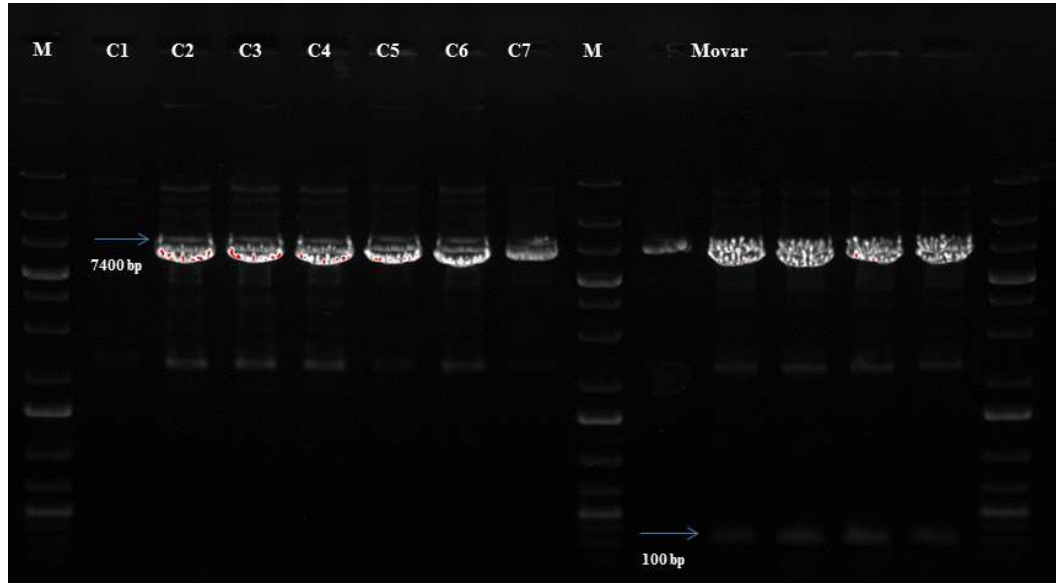
3.8. Hirt Metodu ile Sirküler BoHV-4-BAC-EGFP Elde Edilmesi

Genel olarak, herpesviruslar hücreye girdikten sonra hemen çekirdekte sirküler hale gelip replikasyona hazırlanırlar. Bu özellikten yararlanabilmek için farklı zamanlarda rekombinant BoHV-4 ile enfekte hücreler toplandı ve sirküler viral DNA'nın varlığı bakteri transformasyonu ile denendi. Sirküler viral DNA'yı yakalamak için en uygun zamanın inokulasyondan 6 saat sonra olduğu tespit edildi. Ayrıca bu yöntemde enfekte hücre sayısı önemli role sahiptir. Yapılan denemelerde bakteri transformasyonu gerçekleşti. En uygun virus titresi ise 100 moi olarak tespit edildi.

3.9. Sirküler Rekombinant BoHV-4-BAC-EGFP'ın, BH10B Bakteriye Transformasyonu

Hirt ekstraksiyonundan elde edilen sirküler BoHV-4-BAC-EGFP, DH10B bakteriye elektroporasyon ile transforme edildi. Transformasyon metodu olarak elektroporasyon metodu, kimyasal metoda (CaCl_2) göre daha etkili bulundu. Transformasyondan 24 saat sonra ilk koloniler LB agarda üredi ve hepsi pozitif olarak tespit edildi. Doğru kolonilerin seçimi, plazmid ekstraksiyonundan sonra EcoRI kesim enzimi ile gerçekleştirildi. Rekombinant virus, kontrol olarak Movar suşu ile karşılaştırıldı. Kesim enzimi analizinde rekombinant virusda bir ekstra 7400 bp bant ve Movar'a göre eksik bir 100 bp'lik bant tespit edildi (Şekil 3.14).

Ekstraksiyondan sonra rekombinant virus DNA'sı MDBK hücrelerine Lipofectamin 3000 ile transfekte edildi ve hücrede rekombinant virusun oluşması sağlandı. Birinci pasajda virusun üremesi 10 günde gerçekleşti ve enfekte hücrelerde Movar suşuna benzer CPE tespit edildi.



Şekil 3.14. DH10B bakteriden elde edilmiş 7 farklı rekombinant virusun EcoRI ile kesim doğrulaması ve Movar referans suşu ile karşılaştırılması. Merdiven (M): 1 kbp plus ladder (ThermoScientific, SM1331).

4. TARTIŞMA

Viruslara karşı elde edilen klasik nitelikteki aşılar inaktif veya attenüe olarak hazırlanmaktadır. İnaktif aşılar, tamamen öldürülmüş virus veya spesifik viral proteinlerden (subunit) oluşur. Subunit aşılar da kullanılan proteinlere karşı immun yanıtın sınırlı olmasından dolayı farklı proteinler kombine olarak kullanılmaktadırlar. Attenüe aşılar da ise, viral virulans oldukça azaltılmış ancak virus canlı olarak bulunmaktadır. İnaktif aşılar a karşı immunitenin kısa süreli ve yeterli olamaması, canlı aşılar da aşı virusunun saçılması, abort ve anomali gibi bazı patolojilere neden olabilmesi, reassortment olasılığı gibi nedenler birçok hastalıkta klasik türde hazırlanan aşıların kullanımını sınırlamaktadır (Estivariz ve ark., 2011; Lindsey ve ark. 2008; Rha ve ark., 2014 ve Stauffer ve ark., 2006).

Klasik tekniklerle hazırlanan aşıların zamanla ortaya çıkan dezavantajları düşünülerek, günümüzde rekombinant stratejiler kullanılarak yeni jenerasyon aşılar üretilmeye çalışılmaktadır.

Aşılama ve kanser hücrelerini hedef alarak humoral ve hücre sel immunit eyi arttırmak adına, antijen taşıyan yeni vektörlerin tasarımı için farklı çalışmalar ortaya konulmuştur (Donnelly ve ark., 1997 ve Krieg, 2002).

Taşıyıcı vektörler olarak görev yapan mevcut bakteriyel plazmidler güvenlik, kolay tasarım ve seri üretim, enfeksiyon riskinin az olması, konakçı hücre genomuna entegre olmama, ve uzun süren immun yanıt gibi özellikle hücre sel yanıtı uyarma gibi avantajlara sahiptir. Ancak yeterli bir humoral bağışıklık tepkisi yaratmak için bir adjuvanta ihtiyaç duyulması özellikle büyük hayvanlar da dezavantaj olarak kabul edilmektedir (Lewis ve ark., 1999; Liu ve ark., 1997 ve Van Drunen Littel ve ark., 2009). Genellikle, DNA aşıları konakçı hücrelere girdikten sonra oluşan immun yanıtın düzeyi, hedef hücrelerdeki antijen ekspresyonunun ardından oluşan transfeksiyon verimliliğinden direkt etkilenir. Dolayısıyla DNA aşılarının in vivo

düşük etkinliği, konakçı hücreye bağlı bazı faktörlere de- örneğin endonükleazlar ve çekirdek kor kompleksi gibi- bağlıdır (Ferraro ve ark., 2011).

Viruslar, doğal olarak konakçı hücrelere genlerini aktarabilen gelişmiş taşıyıcılardır. Bu özellik onları genlerin aktarımında vektör sistemler olarak cazip kılmaktadır. Belirli viruslar, yabancı genetik materyalleri taşıma ve etkili olarak bu genleri aktarma kapasitelerinden dolayı gen aktarım vektörleri olarak kullanılabilmektedir (Liu ve ark., 1997).

Viral vektörler ilk kez Rogers ve ark. (1973), tarafından kullanılmış ve antikör tepkisini uyaran adjuvantlara olan ihtiyacı ortadan kaldırması bakımından da, birçok aşı çeşidine göre daha avantajlı bulunmuştur. Ancak hayvanlarda ve insanlarda viral vektör kullanımını sınırlayan birçok faktör vardır.

Günümüzde araştırmalar rekombinant adeno associated virus (AAV) vektör, retroviral vektör, adenoviral vektör ve HSV-1'den köken alan ampikon vektörü olmak üzere dört ana viral vektöre odaklanmıştır. Bununla birlikte, bu viral vektörlerin kullanımının farklı avantaj/dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin retroviral vektörlerin konakçı hücrelere entegre olma potansiyeli vardır ve entegrasyon yerlerine bağlı olarak bazı problemlere neden olabilmektedirler. Ayrıca rastgele mutagenез oluşumu bu vektörlerde sıklıkla tespit edilmektedir (Bouard ve ark., 2009). Adenoviral vektörler düşünüldüğünde ise en büyük engel, konakçıda daha önceden adenovirusa karşı gelişmiş immunitenin varlığıdır (Wold ve Toth, 2013). Dolayısıyla araştırmacılar yeni, çok daha etkili ve daha az dezavantaja sahip viral vektör geliştirmek için adeta bir yarışa girmişlerdir.

Diğer viral vektörler ile karşılaştırıldığında, herpesviral vektörlerin kullanımının birçok avantajı vardır. Son yıllarda herpesviral vektörler üç farklı grupta incelenmektedir. İlki onkolitik herpesviruslar olup, replikasyon kompetent HSV-1 türevi rekombinant viruslardan oluşmaktadır. Örneğin Talimogene laherparepvec (T-VEC), bir rekombinant HSV-1 tabanlı viral vektör olarak melanom kanserini hedefleyerek, insan granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörünü (GM-

CSF) eksprese etmek üzere tasarlanmıştır (Rehman ve ark., 2016). İkinci grup, rekombinant aşı hazırlamada kullanılmaktadır. Üçüncü grupta ise büyük gen transferi için kullanılan herpesviral vektörler tasarlanmıştır (Jerusalinsky ve ark., 2012).

HSV-1 ve 2, Varicella Zoster, Epstein Barr ve Bovine Herpes Virus 1 (BoHV-1) dahil olmak üzere bu ailede bulunan çok sayıda virus, tatmin edici sonuçlara sahip aşılama ve kanser terapisinde kullanılmak üzere viral vektörler olarak tasarlanmıştır (Hukkanen, 2010).

Herpesviral vektörlerin en büyük dezavantajı, affinite gösterdiği alanlarda latent kalabilme özelliğidir. Ayrıca, bu viral vektörleri kullanarak toksik viral genler ve onları manipüle etmeyi zorlaştıran büyük genom da dahil olmak üzere bazı engellerle karşılaşmaktadır (Lachmann, 2004).

Herpesvirus toksisitesini engellemek için atenüe mutantlar, replikasyon defektif vektörler ve amplikon vektörleri dahil bazı stratejiler kullanılmıştır. Örneğin, zayıflatılmış HSV-1 viral vektörleri oluşturmak için, bölünen hücrelerde viral replikasyon için gerekli olmayan fakat nöronlar gibi hücrelerde gerekli olan TK geni seçilmiştir. Bu viral vektör, nöron hücrelerini hedefleme potansiyeline sahiptir (Lachmann, 2004).

Son yıllarda viral vektör olarak üzerinde çalışılan ve diğer viral vektörlerle karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip olduğu bildirilen BoHV-4, sığır populasyonlarında yaygın görülen bir etkindir. Virus abort, metritis, pnömoni, diyare, solunum yolu enfeksiyonu ve meme püstüler dermatit belirtileri gösteren sığırlardan izole edildiği gibi, sağlıklı görünümlü hayvanların farklı materyallerinden de izole edilmiştir. Deneysel enfeksiyon oluşturabilen çalışmalar sınırlı sayıda olduğundan bu hastalıklarda BoHV-4'ün rolü tam olarak ortaya konulamamıştır (Thiry ve ark., 1989).

BoHV-4, rhadinovirus genusunda yer alan diğ er herpesviruslardan farklı olarak birçok hücre kültüründe çoğalma potansiyeline sahiptir. Ayrıca daha az kompleks genomu sahip olduğu için manip lasyonu daha kolaydır.

Yeni bir viral vektörün gelişimi sırasında göz önüne alınması gereken konulardan biri, konakçı hücrelerde replikasyon sırasında viral vektöre ait olan potansiyel risktir. Bu nedenle viral vektörün gelişimi sırasında söz konusu virusun atenüe olması önemlidir. Bununla birlikte, BoHV-4 tabanlı viral vektör söz konusu olduğunda, konakçıda patojenitesinin düşük olması ya da patojenitesinin olmaması nedeniyle, bu durum endişe yaratmamaktadır (Thiry ve ark., 1998).

Epstein-Barr virus (EBV), herpesvirus saimiri (HVS), insan herpesvirus 8 (HHV-8) ve murin gammaherpesvirus-68 (MHV-68) gibi diğ er gammaherpesvirusların onkogenik potansiyelleri olmasına rağmen, BoHV-4' n şimdiye kadar bu tür etkileri görülmemiştir (Lomonte ve ark., 1997).

Retroviral vektörlerin in vitro avantajlarından birisi, konakçı hücrenin genomuna entegrasyonundan dolayı kalıcı olarak proteinlerin ekspresyonudur. Bununla birlikte, bu özellik in vivo deneyler sırasında dezavantaj olarak düşünülmektedir. Donofrio ve ark. (2010), tarafından rekombinant EGFP-BoHV-4 ile yapılan bir çalışmada, BoHV-4' n bazı hücrelerde epizomal kalabilme özelliğini göstermişlerdir. Dolayısıyla bu viral vektör, hücrelerde entegrasyon olmadan korunabilir ve ilgili geni uzun süre eksprese edebilir. Aynı çalışmada kalıcı olarak enfekte olmuş konakçı hücre kromozomuna BoHV-4 DNA'larının entegrasyonu da gösterilmiştir.

Viral vektörlere yönelik en büyük problemlerden biri, hedef konakçı hücrede vektör virusa karşı daha önceden gelişmiş olan immunitedir. Bu adenoviral vektörlerde karşımıza çıkan en önemli engellerdendir. BoHV-4'e karşı oluşan antikorlar çok zayıf nötralizan etki göstermektedirler (Dubuisson ve ark., 1987). Dolayısıyla BoHV-4 tabanlı viral vektörlerde nötralizan antikorların etkin üretimine dair bir bildirim yoktur (Kit ve ark., 1985 ve McGregor ve ark., 1985). Bu nedenle,

BoHV-4 kullanıldığında konakçıda spesifik olarak hedeflenen virusa karşı immunité gelişmektedir.

Yeni viral vektörün gelişimi sırasında düşünülmesi gereken en önemli konulardan biri, viral vektörü test etmek için in vitro ve in vivo ortamların var olmasıdır. Daha önce belirtildiği üzere BoHV-4 primer ve devamlı hücreler de dahil olmak üzere çok çeşitli hücre hatlarında çoğalabilmektedir. Deneme hayvanı olarak fare, tavşan ve keçide etken üretilebilmektedir (Donofrio ve ark., 2013).

BoHV-4, in vitro ve in vivo ortamlarda makrofaj ve monosit hücrelerine affinite göstermektedir. Donofrio ve Van Santen (2001), virusun makrofajlarda persiste kalmasını destekleyebilen, BoHV-4 tarafından latent sığır makrofaj hücre kültürü olan BOMAC'ı oluşturmuşlar; böylece BoHV-4 kökenli vektörün kanser tedavisinde kullanımını kolaylaştırmışlardır.

Kanser tedavisinde kullanılan viral vektörler iki grupta toplanmaktadır. Bazı viruslar direkt onkolitik özelliğe sahip olduğu için kanser hücrelerinde replikasyon potansiyeli vardır. Ancak diğer onkolitik virus grubunda bir onkolitik ya da proliferasyon supresor genin aktarımı nedeniyle kanser hücreleri hedeflenmektedir. BoHV-4 virusu insan kökenli kanser hücrelerinde replike olup, apoptozise neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, BoHV-4'ün apoptozis etkisi insan kanser hücrelerinde incelenmiş ve onkolitik virus olduğu ortaya konulmuştur (Gillet ve ark., 2005b).

HSV-1 tabanlı viral vektör, nörotropizma nedeniyle sinir sistemini hedef almak için kullanılmıştır. Ancak bu viral vektör, sinir hücrelerinde toksisiteye neden olmaktadır. HSV-1 tabanlı viral vektörlerin aksine, BoHV-4 toksik etkileri olmayan sinir sistemi hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli hücreleri enfekte etme potansiyeline sahip bir viral vektör adaydır (Lopez ve ark., 1996).

Virusun kısaca bahsettiğimiz biyolojik ve moleküler özellikleri göz önünde tutularak son yıllarda viral vektör olarak aşılama ve gen terapisinde yaygın bir kullanım alanı bulunduğu görülmektedir. Virus BoHV-1, Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Mavidil virus (BTV) ve Ebola virusa (Donofrio ve ark., 2006, 2007b; Franceschi ve ark., 2011b ve Rosamilia ve ark., 2016) ait immundominant antijenlerin aktarılmasında immunizasyon amaçlı kullanımının yanı sıra, kanser çalışmalarında da kullanılmaya başlanmıştır (Jacca ve ark., 2016).

BoHV-4'ün bir viral vektör olarak potansiyelini göstermek için Donofrio ve ark. (2006), BoHV-1'in immundominant proteini olan gD eksprese eden bir rekombinant BoHV-4 tabanlı aşı virusu tasarlamışlardır. Bu aşıyı tavşan modelinde test etmişler ve laboratuvar hayvanlarında tatmin edici bir serum-nötralizan antikor yanıtı elde etmişlerdir.

Yine aynı düşünceden hareketle BoHV-4 vektör tabanlı Mavidil (BTV-8) ve CpHV-1'e ait immundominant antijenlerin aktarımıyla geliştirilen aşılarda deneme hayvanlarında immunitiyi uyardığı bildirilmiştir (Donofrio ve ark., 2013 ve Franceschi ve ark., 2011b).

Donofrio ve ark. (2007b), BVDV yapısal glikoproteini E2'yi kullanarak geliştirdikleri BoHV-4CMV-IgKE2-14ΔTK olarak düzenlenen BoHV-4 tabanlı vektör aşıyı tavşan ve koyun modellerinde kullanmışlar ve humoral yanıtın koruyucu seviyede olduğunu belirlemişlerdir.

Rosamilia ve ark. (2016), Ebola virusa ait aşı geliştirmek amacıyla BoHV-4'e dayalı viral vektörü kullanmışlar; hazırlanan BoHV-4-syEBOVgD106ΔTK olarak elde edilen aşıyı keçilerde denemişler ve kuvvetli bir humoral yanıt geliştiğini belirlemişlerdir. Genel olarak Ebola'ya karşı geliştirilen aşılarda viral vektör tabanlıdır. Farklı viral vektörler hazırlanmış ancak virusa karşı iyi düzeyde immun yanıt tespit edilememiştir. Dolayısıyla yeni geliştirilen BoHV-4 viral vektör bu virusa karşı denenmiş ve çalışmada Ebola virusa karşı keçilerde yeterli düzeyde nötralizan antikor yanıtı oluşmuştur.

Bu konu üzerine yapılan başka bir çalışmada, rekombinant BoHV-4 vektöre, optimize edilmiş peste des petits ruminants virus (PPRV)-Hemagglutinin genine ait ORF klonlanmış ve üretilen BoHV-4-A-PPRV-H-ΔTK aşısının immunojenik etkisi C57BL/6 farelerinde değerlendirilmiştir. BoHV-4-A-PPRV-H-ΔTK-immunizasyonu spesifik T hücresi, sitotoksik T lenfositlerini uyararak, PPRV'a karşı iyi bir hücresel ve humoral immun yanıt geliştirmiştir (Macchi ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada, BoHV-4'ün onkolitik etkisi in vitro olarak insan glioma hücre hatlarında ve aynı zamanda in vivo şartlarda ratlarda glioma kanserinde gösterilmiştir. Bu araştırmada virusun replikasyonu sadece kanser hücrelerinde tespit edilmiş ve sağlam hücrelerde virus üremesi saptanmamıştır (Redaelli ve ark., 2010).

BoHV-4'ün kanser üzerine etkisine yönelik başka bir çalışmada, Jacca ve ark. (2016), fareleri Her-2⁺ meme kanserine karşı profilaksi amacıyla BoHV-4-RHuT-gD kullanmışlardır. Bu çalışmada Her-2 eksprese eden BoHV-4 viral vektörün etkisi meme kanser terapisinde denenmiştir. Genel olarak BoHV-4 bir onkolitik virus olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla bu araştırmada hem bu viral vektörün onkolitik özelliği, hem de Her-2 ekspresyonundan yararlanılmıştır.

Bu bilgiler ışığında planlanan bu çalışmada, ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan etkili aşılardan üretilemediği ve/veya zoonoz enfeksiyonlara yönelik olarak immunizasyon ve ayrıca hayvan ve insan kanser terapisinde kullanımı söz konusu olabilecek BoHV-4 tabanlı bir vektör geliştirilmesi planlanmıştır.

Bu amaçla, herpesviruslar için geliştirilen ve kullanılmakta olan Bacterial Artificial Chromosome (BAC) olarak virusun klonlanması düşünülmüştür. Çalışmada BoHV-4'ün farklı yerel saha suşları denenmiş ancak BoHV-4 suşlarının yapılan full genom analizlerine dayanılarak %99'un üzerinde benzerlik göstermesi sonucundan hareketle, mutasyon oranı çok düşük olan bu viruslar içinde BoHV-4'ün Avrupa referenz suşu olan Movar kullanılarak rekombinant vektör gelişimi sağlanmıştır.

BAC vektörü (bakteri seçici ajan olarak) ve EGFP ekspresyon kaseti (memeli hücre seçme ajanı olarak) klonlamak için seçilen BoHV-4 gen alanı, Donofrio ve ark. (2005), bildirdiği yönteme uygun olarak ORF2 (Bo2) ve ORF3 (Bo3) bölgeleri arasındadır. ORF2 (Bo2) ve ORF3 (Bo3) bölgelerinin seçilmesinin nedeni, BoHV-4 genomunun Long Unique Repeat (LUR) bölgesinde yer alması ve bu alana yabancı DNA yerleştirilmesinin viral replikasyon üzerine herhangi bir etkisinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu araştırmada da aynı şekilde, bu alanda yapılan klonlamanın, virus replikasyonuna hiçbir etkisinin olmadığı ve rekombinant virusların, saha virusları ile aynı şekilde çoğaldığı görülmüştür.

Hücre içi ekstra kromozomal homolog rekombinasyonun (HR) düşük olması nedeniyle (yaklaşık %3), in vitro rekombinant herpesvirusların oluşturulması çok zaman alıcıdır. Hücrelerdeki HR oranı hücrelerin pasaj sayısı, primer veya devamlı hücre olması ve hücresel p53 geninin ekspresyon miktarı gibi bazı faktörlere bağlıdır. P53 genini eksprese eden bir plazmidin ko-transfeksiyonu ile yapılan bazı araştırmalarda HR oranı artmıştır (Arias-Lopez ve ark., 2006). Öte yandan, hücrelerdeki HR oranının transfeksiyon oranı ile ilişkisi vardır (Bandyopadhyay ve ark., 1984).

Transfeksiyon ve transformasyon yöntemlerinde rekombinant virusların üretimi ve bakteriye aktarımında kimyasal ve elektroporasyon metotları karşılaştırılmış; MDBK hücreleri Lipofectamine 3000 ve elektroporasyon ile transfekte edilmiş ve benzer bir çalışmada bildirildiği üzere elektroporasyon metodunun bu amaç için en iyi metot olduğu gösterilmiştir (Sharifi-Tabar ve ark., 2015). Ayrıca rekombinant virusun bakteriye transformasyonunda CaCl_2 yöntemi (Sambrook, 2009) aynı şekilde elektroporasyon metodu ile karşılaştırılmış ve elektroporasyon metodu kimyasal metoda göre daha iyi sonuç vermiştir.

Bu çalışmada rekombinant virusların seçiminde marker olarak yeşil floresan protein ekspresyonu ve genetisin antibiyotik direnci kullanılmıştır. Genellikle taşıyıcı vektörde sadece EGFP marker varsa, rekombinant virusların seçimi yeşil plak saflaştırma yöntemi ile yapılabilir. Ayrıca ilk virus stoğunda saha suşu

virusların baskın olmasından dolayı, plak saflaştırma adımının ilk turunda yeşil plak bulunması oldukça nadirdir. Ayrıca, bu araştırmada kullandığımız Movar suşunun belirgin plak oluşum potansiyeline sahip olmaması nedeniyle ortaya çıkan plakların, agaroz jel altında küçük ve tespit edilmesi zor olduğu görülmüştür. Bu problemin aşılması amacıyla, yeşil plakların seçiminde genetisin ikinci bir marker olarak kullanılmıştır.

Genetisin antibiyotik markeri kullanılarak, rekombinant virusların popülasyonu artırılmış ve rekombinant olmayan virus içeren enfekte hücrelerin virus replikasyonundan önce ölmesi sağlanmıştır. Ancak rekombinant virus oluşturulmasında bir seçim markeri olarak genetisinin kullanılmasının dezavantajı vardır. Bu antibiyotiğin hücrelerin protein sentezi üzerindeki etkisi, iki mitozdan sonra ortaya çıkmaktadır; bu nedenle, yüksek titreli saha viruslarının çoğalmak için yeterli zamanı olmaktadır (Gillet ve ark., 2004). Dolayısıyla hem virus, hem de antibiyotik hücre ölümünü yaratabilmektedirler. Bu anlamda başka antibiyotiklerin denenmesinin de süreci kısaltmak adına ileride kullanılabileceği düşünülmektedir.

Donofrio ve ark. (2005), rhabdomyosarkoma hücre hattı olan RD-4 hücresinin BoHV-4'ü epizomal formda tutma potansiyeline sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece, genetisin gibi antibiyotikleri kullanarak persiste bir hücre dizisi oluşturmak mümkün olabilecektir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, hücre kültüründe yeni viral vektörlerin hazırlanmasının bu antibiyotiklerin kullanımıyla kolaylaştığı düşünülmektedir.

Tüm herpesviral vektörlerin konakçı hücrelere bazı toksik genleri vardır ve bu da onları güvensiz kılmaktadır. Bu genlerin silinmesi ya da inaktivasyonu ile sorun ortadan kaldırılabilir. Daha önce belirtildiği gibi BoHV-4 ORF71 geni enfekte hücrelerde TNF- α ile indüklenen apoptosise neden olur. Bu genin inaktivasyonu ile daha güvenli bir viral vektör üretme şansına sahip olabileceği bildirilmiştir (Gillet ve ark., 2005b).

Herpesviral vektörlerin en önemli dezavantajlarından biri, enfekte hücrelerde latent kalma özelliğidir. BoHV-4 viral vektör tasarımı, ORF50'nin over-ekspresyonu veya ORF73'ün silinmesi ile latent kalma özelliğinin ortadan kalkabileceği önerilmektedir (Fowler ve Efstathiou, 2004).

Rekombinant virusun seçimi MDBK ve BEK hücresinde gerçekleştikten sonra, Hirt metodu ile enfekte hücre çekirdeğinde var olan sirküler DNA yakalanmış ve bakteriye aktarılmıştır. Alphaherpesvirusların hızlı replikasyonundan dolayı Hirt ekstraksiyonu genellikle virus inokulasyondan 1 saat sonra gerçekleştirilmektedir (Liu ve ark., 2011). Gammaherpesviruslarda ise, replikasyon hızının düşük olması adına bu süre daha uzun olmaktadır. Sirküler DNA'nın yakalanması için BoHV-4 ile enfekte hücreler farklı zamanlarda (3, 6, 8, 12, 24 saat) toplanmış ve sirküler DNA'nın ekstraksiyonu için en uygun zaman 6. saat olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada maksimum sirküler DNA 24 ve 48. saatlerde tespit edilmiştir (Donofrio ve ark., 2000a). Bu farklılığın nedeni, virus titresinin düşük veya yüksek oluşuna bağlanmaktadır. Bu çalışmada Hirt ekstraksiyonu için hücreler 100 moi ile enfekte edilmiştir. Böylece, fazla sayıda virusun hücreye girmesinden dolayı sirküler DNA daha hızlı olarak enfeksiyonun ilk saatlerinde maksimum seviyeye ulaşmıştır.

E. coli, çoğunlukla metile olmuş sirküler DNA'yı çoğaltabilme yeteneğine sahip değildir. Bu çalışmada Hirt ekstraksiyonundan elde edilen sirküler viral DNA, DH10B bakterisine klonlanmıştır. Bu bakteri, iki önemli özelliğe sahip olduğu için tercih edilmiştir. DH10B bakterisi genetik modifikasyondan dolayı metile olmuş DNA'yı çoğaltabilmektedir. Ayrıca bu bakteri herpesvirus gibi büyük yabancı DNA materyalinin transformasyonu için uygundur. DH10B bakterisi rekombinasyon negatiftir. Dolayısıyla BoHV-4-BAC-EGFP stabil olarak bakteri içinde kalabilmektedir (Gillet ve ark., 2005a). Genel olarak büyük DNA'lar bakteri içinde rekombinasyondan dolayı stabil değildirler. Bu nedenle, bu çalışmada rekombinasyon negatif (rec-) suşlar tercih edilmiştir. Yapılan bir çalışmada BoHV-4 rekombinant virusun stabilitesi bakteride 10 pasaja kadar gösterilmiştir (Donofrio ve ark., 2009). Ayrıca BAC vektör çok az kopya sayısına sahip olduğu için, BoHV-4-BAC-EGFP plazmidinin bakteriye toksik etkisi yoktur.

Bakteri transformasyonu için elektroporasyon yöntemi tercih edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda, BAC gibi büyük DNA'ların elektroporasyon koşulları (kV ve F) belirlenmiştir (Sheng ve ark., 1995 ve Zhang ve ark., 2007). Ancak bu çalışmada, elektroporasyon cihazının önerdiği protokol kullanılmış ve transformasyon etki oranı istenilen düzeyde gerçekleşmiştir.

Bakteriden elde edilen sirküler viral DNA rekombinant virus oluşturmak için MDBK hücrelerine transfeke edilmiştir. Transfeksiyondan 10 gün sonra yeşil rekombinant viruslar ortamda tespit edilmiştir. Böylece, rekombinant virusun bakteride stabil halde kalması, rekombinasyon ve reassortmanın oluşmadığı ortaya konulmuştur.

Bu aşamadan sonra istenen genlerin viral vektöre aktarımı bakteride recombineering yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir. Bakteri içersinde rekombinasyon (recombineering) hücreye göre daha kolay ve daha hızlı gerçekleşen bir prosedürdür. Bu metotta rekombinasyon oranı daha yüksek ve yaklaşık %100 olarak tespit edilmektedir.

Viral vektörlerin 1973 yılında ilk kullanımının ardından farklı viral vektörler geliştirilmiş; avantaj/dezavantajları düşünüldüğünde, hayvanlarda ve insanlarda kullanımını sınırlayan birçok faktör zaman içinde ortaya çıkmıştır (Bouard ve Alazard-Dany, 2009).

Hedeflenen amaçlar doğrultusunda, olumsuzlukları en aza indirgenmiş ve başarılı bir viral vektör arayışları sonrasında, farklı virusların kullanımı ve rekombinant virusun üretilmesinde yeni tekniklerin geliştirilmesiyle günümüzde viral vektör üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Sahip olduğu biyolojik ve moleküler özellikleri açısından son yıllarda birçok virusa ait immundominant antijenlerin aktarılması ile immunizasyon ve ayrıca kanser

terapisi amaçlarıyla kullanılan BoHV-4, diğer viral vektörler ile karşılaştırıldığında oldukça avantajlı görülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen BoHV-4-BAC viral vektörün, daha önceki çalışmalarda da bildirilen avantajlarından dolayı hem immunizasyon, hem de kanser terapisinde kullanılabilme potansiyeli olduğu ortaya konularak, bu bağlamda ileride yapılması planlanan ülkemizde önemli ekonomik kayıpların nedeni ve/veya zoonoz karakterde etkenlere yönelik aşılamalarda ve başta glioma olmak üzere birçok kanserin terapisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Türkiye’de ilk olarak BoHV-4 tabanlı bir rekombinant viral vektör geliştirilmiştir.

BoHV-4’ün farklı saha izolatları ve referens suşlarından biri olan DN-599 kullanılarak Donofrio ve ark. (2007) ile Gillet ve ark. (2005) tarafından BoHV-4 tabanlı vektör geliştirilmiştir. Bu çalışmada ilk defa virusun Movar suşu kullanılarak viral vektör hazırlanmıştır.

BoHV-4 kullanılarak geliştirilen viral vektör Bacterial Artificial Chromosome (BAC) plazmidi olarak klonlanmış ve herpesviral vektör geliştirmede başarılı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, BAC sisteminin bu nitelikte yapılacak çalışmalar için kullanılabilirliği bir kez daha ortaya konmuş ve bu konu üzerine çalışacak araştırmacılar için önemli bir basamak gerçekleştirilmiştir.

BAC plazmidin BoHV-4 genomuna aktarımında memeli hücresinde homolog rekombinasyon tekniği kullanılmış ve rekombinant virusun seçiminde yeşil floresan protein ekspresyonu ve genetisin antibiyotik direncinden yararlanılmıştır. Hirt metodu ile enfekte hücre çekirdeğinde var olan sirküler DNA yakalanmış son basamakta DH10B bakterisine aktarılmıştır.

BAC vektörü (bakteri seçici ajan olarak) ve EGFP ekspresyon kaseti (memeli hücre seçme ajanı olarak) klonlamak için seçilen BoHV-4 gen alanı, ORF2 (Bo2) ve ORF3 (Bo3) bölgeleri arasındadır. ORF2 (Bo2) ve ORF3 (Bo3) bölgelerinin seçilmesinin nedeni, BoHV-4 genomunun Long Unique Repeat (LUR) bölgesinde yer alması ve bu alana yabancı DNA yerleştirilmesinin viral replikasyon üzerine herhangi bir etkisinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu araştırmada da aynı şekilde, bu alanda yapılan klonlamanın, virus replikasyonuna hiçbir etkisinin

olmadığı ve rekombinant virusların, referens virusla aynı şekilde çoğaldığı görülmüştür.

Virusun enfekte hücrelerde plak oluşturma yeteneğinin düşük olması nedeniyle, rekombinant virusların seçiminde yeşil floresan protein ekspresyonunun yanı sıra genetisinin antibiyotik direncinden yararlanılmıştır. Ancak söz konusu antibiyotiğin etkisinin görülmesi için hücrede en az 2 pasaj gerekmektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda farklı antibiyotiklerin-higromisin vb. gibi.- denenmesi süreyi kısaltma adına faydalı olacaktır.

Transfeksiyon ve transformasyon yöntemlerinde rekombinant virusların üretimi ve bakteriye aktarımında kimyasal ve elektroporasyon metotları karşılaştırılmış; MDBK hücreleri Lipofectamine 3000 ve elektroporasyon ile transfekte edilmiş ve benzer bir çalışmada bildirildiği üzere elektroporasyon metodunun bu amaç için en iyi metot olduğu gösterilmiştir (Sharifi-Tabar ve ark., 2015). Ayrıca rekombinant virusun bakteriye transformasyonunda CaCl_2 yöntemi (Sambrook ve Russel, 2000) aynı şekilde elektroporasyon metodu ile karşılaştırılmış ve elektroporasyon metodu kimyasal metoda göre daha iyi sonuç vermiştir.

Sirküler DNA'nın yakalanması için BoHV-4 ile enfekte hücreler farklı zamanlarda (3, 6, 8, 12, 24 saat) toplanmış ve sirküler DNA'nın ekstraksiyonu için en uygun zaman 6. saat olarak belirlenmiştir.

Söz konusu viral vektör, biyolojik ve genetik özellikleri açısından diğer viral vektörlere göre daha avantajlı görülmektedir. Bu özellikleri kısaca: daha az kompleks genoma sahip olduğu için manipülasyonunun kolay olması, patojenitesinin az ya da olmaması, enfekte hücrelerde transformasyona neden olmaması, geniş konakçı spektrumuna sahip olması, insanlarda replikasyon potansiyelinin tespit edilmemesi, monosit/makrofaj hücrelerinde persiste kalabilmesi olarak sayılmaktadır.

Elde edilen BoHV-4-BAC viral vektörün, yukarıda belirtilen avantajlarından dolayı hem immunizasyon, hem de kanser terapisinde kullanılabilme potansiyeli olduğu ortaya konularak, bu bağlamda ileride yapılması planlanan ülkemizde önemli ekonomik kayıpların nedeni ve/veya zoonoz karakterde etkenlere yönelik aşılamalarda ve insan ve hayvanlarda birçok kanserin terapisinde söz konusu vektörün yararlı olabileceği düşünülmektedir.



ÖZET

Aşılama Stratejilerinde Bir Gen Aktarım Vektörü Olarak BoHV-4 Movar Suşu ile BAC-BoHV-4 Elde Edilmesi

BoHV-4, herpesviridae ailesinin gammaherpesvirinae alt ailesinde ve rhadinovirus cinsinde yer alan bir etkidir. Virus solunum sistemi enfeksiyonunda, vulvovaginitis, endometritis, mastitis, abort, metritis, dermatitis olgularında tespit edilmiştir. Ayrıca sağlıklı görünümlü hayvanların çeşitli materyallerinden de etken izole edilmiştir. Son yıllarda, BoHV-4 farklı patojenlere ait immundominant antijenlerin aktarımında ve kanser terapisinde yeni bir viral vektör olarak sunulmaktadır. BoHV-4'ün biyolojik ve moleküler özellikleri, onu diğer viral vektörlerden daha avantajlı kılmaktadır. Bu çalışmada, BoHV-4'ün Movar suşu kullanılarak bir viral vektör geliştirilmesi planlanmıştır. Rekombinant virus oluşturmak için, virusun ORF2 ve ORF3 gen bölgelerinin arası BAC-EGFP-Neo kasetin klonlanması için tercih edilmiştir. Hücrede gerçekleştirilen homolog rekombinasyondan sonra, rekombinant viruslar yeşil floresan protein ekspresyonuna bağlı olarak bir antibiyotik olan genetisin direncine göre seçilmiştir. Hirt yöntemi kullanılarak elde edilen rekombinant sirküler viruslar DH10B bakterisine transforme edilmiştir. Son basamakta, bakteriden ekstraksiyonu yapılan BoHV-4-BAC-EGFP, MDBK hücrelerine transfekte edilmiş ve rekombinant virus hazırlanarak stabilitesi DH10B bakterisinde doğrulanmıştır. Elde edilen BoHV-4-BAC viral vektörün, sahip olduğu özelliklere dayanarak, bu bağlamda ileride yapılması planlanan ülkemizde önemli ekonomik kayıpların nedeni ve/veya zoonoz karakterde etkenlere yönelik aşılamalarda ve başta glioma olmak üzere insan ve hayvanlarda birçok kanserin terapisinde kullanımının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bacterial Artificial Chromosome (BAC), Bovine Herpesvirus 4, Homolog Rekombinasyon, Memeli Hücre, Viral Vektör

SUMMARY

BAC-BoHV-4 Obtaining With BoHV-4 Movar Strain As a Viral Gene Delivery Vector For Vaccination Strategies

BoHV-4 is a member of herpesviridae family, Gammaherpesvirinae subfamily and rhadinovirus genus. The virus has been detected from respiratory infections, vulvovaginitis, endometritis, mastitis, abortion, metritis and dermatitis. In addition, this virus has been isolated from different samples of the healthy animals. During the last years, BoHV-4 has been used as a new viral vector in the immunodominant antigen transfer and cancer therapy. Due to biological and molecular characteristics, BoHV-4 has more advantages in comparison to other viral vectors. In this study, we have planned to create a viral vector based on BoHV-4 Movar strain. To create recombinant virus, ORF2 and ORF3 genes have been selected to insert BAC-EGFP-Neo cassette. After homologous recombination in the cells, recombinant viruses have been selected based on the green fluorescence protein expression and geneticin antibiotic resistance. By performing Hirt method, circular recombinant viruses transformed into DH10B bacteria. In the last step, extraction of BoHV-4-BAC-EGFP from bacteria has been done and transfected into MDBK cells to verify the stability of recombinant virus in the bacteria. By considering the characteristics of this viral vector, we have planned to use BoHV-4-BAC vector in vaccine production against diseases that cause economic losses and/or are zoonotic and to use in some cancer therapy especially glioma in humans and animals.

Keywords: Bacterial Artificial Chromosome (BAC), Bovine Herpesvirus 4, Homologous Recombination, Mammalian Cell, Viral Vector

KAYNAKLAR

- ABAITUA F, HOLLINSHEAD M, BOLSTAD M, CRUMP CM, O'HARE P (2012). A nuclear localization signal in herpesvirus protein VP1-2 is essential for infection via capsid routing to the nuclear pore. *Journal of Virology*, **86 (17)**: 8998–9014.
- ADAIR R, DOUGLAS ER, MACLEAN JB, GRAHAM SY, AITKEN JD, JAMIESON FE, DARGAN DJ (2002). The products of human cytomegalovirus genes UL23, UL24, UL43 and US22 are tegument components. *Journal of General Virology*, **83 (6)**: 1315–1324.
- ADLER H, MESSERLE M, KOSZINOWSKI UH (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Reviews in Medical Virology*.
- ANSON MA, BENFIELD DA, MCADARAGH JP (1982). Bovine herpesvirus-5 (DN599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. *Can J Comp Med*, **46 (3)**: 334–337.
- AREDA D, CHIGERWE M, CROSSLEY B (2018). Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: Risk factors and phylogenetic analysis. *Epidemiology and Infection*, **10**: 1-9.
- ARIAS-LOPEZ C, LAZARO-TRUEBA I, KERR P, LORD CJ, DEXTER T, IRAVANI M, ASHWORTH A, SILVA A (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Reports*, **7 (2)**: 219–224.
- ASANO A, INOSHIMA Y, MURAKAMI K, IKETANI Y, YAMAMOTO Y, SENTSU H (2003). Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain B11-41, in bovine nervous tissues. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, **65 (1)**: 87–93.

- ASLAN ME, AZKUR AK, GAZYAGCI S (2015). Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and Brucella spp. infections in cattle in Turkey. *Journal of Veterinary Medical Science*, **77 (11)**: 1371–1377.
- BANDYOPADHYAY PK, WATANABE S, TEMIN HM (1984). Recombination of transfected DNAs in vertebrate cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81 (11)**: 3476–3480.
- BARTHA A, JUHASZ M, LIEBERMANN H, HANTSCHHEL H, SCHULZE P (1967). Isolation and properties of a bovine herpesvirus from a calf with respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Arch Exp Veterinarmed*, **21 (2)**: 615–623.
- BEDADALA G, CHEN F, FIGLIOZZI R, BALISH M, HSIA V (2014). Construction and Characterization of Recombinant HSV-1 Expressing Early Growth Response-1. *ISRN Virology*, 629641.
- BELAK S, PALFI V (1974). Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated bovine kidney cell culture. *Acta Vet Acad Sci Hung*, **24**: 249-53.
- BELLINO C, IUSSICH S, BIASATO I, PELETTI S, CARUSO C, GIANELLA P, CAGNASSO A, D'ANGELO A. (2015). Potential pathogenetic role of bovine herpesvirus 4 in two dairy cows with dermatitis-pyrexia-hemorrhagic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, **53 (8)**: 2763–2767.
- BESWICK TSL (1962). The origin and the use of the word herpes. *Medical History*, **6 (3)**: 214–232.
- BILGE-DAGALP S, DEMIR AB, GUNGOR E, ALKAN F (2007). The seroprevalence of Bovine Herpes Virus Type 4 (BHV4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders. *Revue de Medecine Veterinaire*, **158 (4)**: 201–205.

- BILGE-DAGALP S, GUNGOR E, DEMIR A, PINAR-MUZ D, VILMAZ V, OGUZOGLU TC, ATASEVEN VS, ALKAN F (2010). The investigation of the presence of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) in cows with metritis in a dairy herd. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **57 (18)**: 87–91.
- BILGE-DAGALP S, OGUZOGLU TC, FARAJI AM, TIMURKAN MO, Alkan F (2011). The Investigation of BVDV, BoHV-4 and BoHV-1 as a possible aetiological agents in abortion and neonatal death cases in cattle. 8. ESVV Pestivirus Sempozyumu, Hannover-Germany.
- BOEHMER PE, NIMONKAR AV (2003). Herpes Virus Replication. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, **55 (1)**: 13–22.
- BOERNER B, WEIGELT W, BUHK HJ, CASTRUCCI G, LUDWIG H (1999). A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. *Journal of Virological Methods*, **83 (1–2)**: 169–180.
- BOUARD D, ALAZARD-DANY N, COSSET FL (2009). Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*, **157 (2)**: 153–165.
- BROWN JC, NEWCOMB WW (2011). Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. *Current Opinion in Virology*, **1 (2)**: 142–149.
- BRULOIS KF, CHANG H, LEE ASY, ENSSER A, WONG LY, TOTTH Z, LEE SH, LEE HR, MYOUNG J, GANEM D, OH TK, KIM JF, GAO SJ, JUNG JU (2012). Construction and Manipulation of a New Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Bacterial Artificial Chromosome Clone. *Journal of Virology*, **86 (18)**: 9708–9720.
- BUBLOT M, VAN BRESSEM MF, THIRY E, DUBUISSON J, PASTORET PP (1990). Bovine herpesvirus 4 genome: Cloning, mapping and strain variation analysis. *Journal of General Virology*, **71 (1)**: 133–142.

- BUBLOT M, LOMONTE P, LEQUARRE AS, ALBRECHT JC, NICHOLAS J, FLECKENSTEIN B, PASTORET PP, THIRY E (1992). Genetic relationships between bovine herpesvirus 4 and the gammaherpesviruses epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Virology*, **190 (2)**: 654–665.
- CAI W, SCHAFFER PA (1992). Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells. *Journal of Virology*, **66 (5)**: 2904–2915.
- CASTRUCCI G, FRIGERI F, FERRARI M, CILLI V, ALDROVANDI V, RAMPICHINI L, GATTI R (1987a). A study of the pathogenesis of bovid herpesvirus-4 in calves. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **34**: 473–479.
- CASTRUCCI G, FRIGERI F, FERRARI M, PEDINI B, ALDROVANDI V, CILLI V, RAMPICHINI L, GATTI R (1987b). Reactivation in calves of latent infection by Bovid herpesvirus-4. *Microbiologica*, **10 (1)**: 37–45.
- CASTRUCCI G, FERRARI M, MARCHINI C, SALVATORI D, PROVINCIALI M, TOSINI A, PETRINI S, SARDONINI Q, LO DICO M, FRIGERI F, AMICI A (2004). Immunization against bovine herpesvirus-1 infection. Preliminary tests in calves with a DNA vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **27 (3)**: 171–179.
- CHASTANT-MAILLARD S (2015). Impact of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transboundary and Emerging Diseases*. **62 (3)**:245-251.
- CHIU E, TROYER RM, LAPPIN MR, VANDE WOUDE S (2017). Bovine herpesvirus 4 DNA is not detected in free-ranging domestic cats from California, Colorado or Florida. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **19 (2)**: 235–239.
- COLLER KE, LEE JIH, UEDA A, SMITH GA (2007). The Capsid and Tegument of the Alphaherpesviruses Are Linked by an Interaction between the UL25 and VP1/2 Proteins. *Journal of Virology*, **81 (21)**: 11790–11797.

- COLLINS CM, MEDVECZKY MM, LUND T, MEDVECZKY PG (2002). The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. *Journal of General Virology*, **83 (9)**: 2269–2278.
- CZAPLICKI G, THIRY E (1998). An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Preventive Veterinary Medicine*, **33 (1–4)**: 235–240.
- DAVISON AJ (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*, **143 (1)**: 52–69.
- DEIM Z, SZEREDI L, EGYED L (2007). Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in aborted bovine fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, **71 (3)**: 226–229.
- DEWALS B, GILLET L, GERDES T, TARACHA ELN, THIRY E, VANDERPLASSCHEN A (2005). Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Veterinary Microbiology*, **110 (3–4)**: 209–220.
- DONNELLY JJ, ULMER JB, SHIVER JW, LIU MA (1997). DNA vaccines. *Annual Review of Immunology*, **15**: 617–648.
- DONOFRIO G, CAVIRANI S, VAN SANTEN VL (2000a). Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. *Journal of General Virology*, **81**: 1807–1814.
- DONOFRIO G, FLAMMINI CF, SCATOZZA F, Cavirani S (2000b). Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **38 (12)**: 4668–4671.
- DONOFRIO G, VAN SANTEN VL (2001). A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *Journal of General Virology*, **82 (5)**: 1181–1185.

- DONOFRIO G, CAVIRANI S, SIMONE T, VAN SANTEN VL (2002). Potential of bovine herpesvirus 4 as a gene delivery vector. *Journal of Virological Methods*, **101 (1–2)**: 49–61.
- DONOFRIO G, MARTIGNANI E, CAVIRANI S, FLAMMINI CF (2005). Exploiting persistent infection for selection of bovine herpesvirus 4 recombinants. *Journal of Virological Methods*, **128 (1–2)**: 6–13.
- DONOFRIO G, CAVIRANI S, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L, FLAMMINI CF (2006). Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. *Clinical and Vaccine Immunology*, **13 (11)**: 1246–1254.
- DONOFRIO G, HERATH S, SARTORI C, CAVIRANI S, FLAMMINI CF, SHELDON IM (2007a). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*, **134 (1)**: 183–197.
- DONOFRIO G, SARTORI C, RAVANETTI L, CAVIRANI S, GILLET L, VANDERPLASSCHEN A, TADDEI S, FLAMMINI CF (2007b). Establishment of a bovine herpesvirus 4 based vector expressing a secreted form of the bovine viral diarrhoea virus structural glycoprotein E2 for immunization purposes. *BMC Biotechnology*, **7**: 68.
- DONOFRIO G, MANAROLLA G, RAVANETTI L, SIRONI G, CAVIRANI S, CABASSI CS, RAMPIN T (2008). Assessment of bovine herpesvirus 4 based vector in chicken. *Journal of Virological Methods*, **148 (1–2)**: 303–306.
- DONOFRIO G, FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, SHELDON IM (2009). Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **7**.
- DONOFRIO G, CAPOCEFALO A, FRANCESCHI V, DE LORENZI L, VAN SANTEN V, PARMA P (2010). Integration of bovine herpesvirus 4 genome into cultured persistently infected host cell genome. *Virology Journal*, **7**.

- DONOFRIO G, FRANCESCHI V, LOVERO A, CAPOCEFALO A, CAMERO M, LOSURDO M, CAVIRANI S, MARINARO M, GRANDOLFO E, BUONAVOGLIA C, TEMPESTA M (2013). Clinical Protection of Goats against CpHV-1 Induced Genital Disease with a BoHV-4-Based Vector Expressing CpHV-1 gD. *PLoS ONE*, **8** (1).
- DUBUISSON J, THIRY E, BUBLOT M, PASTORET PP (1987). Intervention du complement dans la neutralisation du Bovid Herpesvirus 4. *Ann. Med. Vet.* **131**: 69-73.
- DUBUISSON J, THIRY E, THALASSO F, BUBLOT M, PASTORET PP (1988). Biological and biochemical comparison of bovid herpesvirus-4 strains. *Veterinary Microbiology*, **16** (4): 339–349.
- DUBUISSON J, THIRY E, BUBLOT M, THOMAS I, VAN BRESSEM MF, COIGNOUL F, PASTORET PP (1989). Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. *Veterinary Microbiology*, **21** (2): 97–114.
- DUBUISSON J, BUBLOT M, WELLEMANS G, PASTORET PP, THIRY E (1991). Bovine herpesvirus 4 isolates: a comparison of three major glycoproteins. *Veterinary Microbiology*, **29** (3–4): 251–259.
- EGYED L (1998). Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. *J Clin Microbiol*, **36** (7): 2109–2111.
- EGYED L, BERENCSI G, BARTHA A (1999). Periodic reappearance of bovine herpesvirus type 4 DNA in the sera of naturally and experimentally infected rabbits and calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **22** (3): 199–206.
- EGYED L, SASSI G, TIBOLD J, MADL I, SZENCI O (2011). Symptomless intrauterine transmission of bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. *Microbial Pathogenesis*, **50** (6): 322–325.

- EHLERS B, BUHK HJ, LUDWIG H (1985). Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyreplicative DNA unit, and comparison of European and American strains. *Journal of General Virology*. **66**: 55-68.
- EISENBERG RJ, ATANASIU D, CAIRNS TM, GALLAGHER JR, KRUMMENACHER C, COHEN GH (2012). Herpes virus fusion and entry: A story with many characters. *Viruses*, **4** (5): 800–832.
- ESAKI M, NOLAND L, EDDINS T, GODOY A, SAEKI S, SAITOH S, YASUDA A, DORSEY KM (2013). Safety and Efficacy of a Turkey Herpesvirus Vector Laryngotracheitis Vaccine for Chickens. *Avian Diseases*, **57** (2): 192–198.
- ESTIVARIZ CF, MOLNAR Z, VENCZEL L, KAPUSINSZKY B, ZINGESER JA, LIPSKAYA GY, KEW OM, BERENCSI G, CSOHAN A (2011). Paralytic poliomyelitis associated with sabin monovalent and bivalent oral polio vaccines in Hungary. *American Journal of Epidemiology*. **174** (3): 316-25.
- EUGSTER AK (1979). Isolation of bovine herpesvirus III from diarrheic feces. *Veterinary Microbiology*, **3** (3): 199–204.
- FABIAN K, MAKRAI L, SACHSE K, SZEREDI L, EGYED L (2008). An investigation of the aetiological role of bovine herpesvirus 4 in bovine endometritis. *Veterinary Journal*, **177** (2): 289–292.
- FEEDERLE R, BARTLETT EJ, DELECLUSE HJ (2010). Epstein-Barr virus genetics: talking about the BAC generation. *Herpesviridae*, **1**: 6.
- FENG Z, CERVENY M, YAN Z, HE B (2007). The VP35 Protein of Ebola Virus Inhibits the Antiviral Effect Mediated by Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR. *Journal of Virology*, **81** (1): 182–192.
- FERRARO B, MORROW MP, HUTNICK NA, SHIN TH, LUCKE CE, WEINER DB (2011). Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **53** (3): 296–302.

- FOWLER P, EFSTATHIOU S (2004). Vaccine potential of a murine gammaherpesvirus-68 mutant deficient for ORF73. *Journal of General Virology*, **85** (3): 609–613.
- FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, RAVANETTI L, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L, CAVIRANI S, VAN SANTEN VL, DONOFRIO G (2011a). Bovine herpesvirus 4 immediate early 2 (Rta) gene is an essential gene and is duplicated in bovine herpesvirus 4 isolate U. *Veterinary Microbiology*, **148** (2–4): 219–231.
- FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CALVO-PINILLA E, REDAELLI M, MUCIGNAT-CARETTA C, MERTENS P, ORTEGO J, DONOFRIO G (2011b). Immunization of knock-out α/β interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHV-4-based vector expressing BTV-8 VP2 antigen. *Vaccine*, **29** (16): 3074–3082.
- FRANCESCHI V, CAPOCEFALO A, CAVIRANI S, DONOFRIO G (2013). Bovine herpesvirus 4 glycoprotein B is indispensable for lytic replication and irreplaceable by VSVg. *BMC Veterinary Research*, **9**.
- FRENGEN E, WEICHENHAN D, ZHAO B, OSOEGAWA K, VAN GEEL M, DE JONG PJ (1999). A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics*, **58** (3): 250–253.
- FRIEDMAN HM (2003). Immune evasion by herpes simplex virus type 1, strategies for virus survival. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, **114**: 103–112.
- FRAZIER K, PENCE M, MAUEL MJ, LIGGETT A, HINES ME, SANGSTER L, LEHMKUHL HD, MILLER D, STYER E, WEST J, BALDWIN CA (2001). Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **13** (6): 502–508.
- GAGNON CA, TRAESEL CK, MUSIC N, LAROCHE J, TISON N, AUGER JP, MUSIC S, PROVOST C, BELLEHUMEUR C, ABRAHAMYAN L, CARMAN S, DESCOTEAUX L, CHARETTE SJ (2017). Whole Genome Sequencing of a Canadian Bovine Gammaherpesvirus 4 Strain and the Possible Link between the Viral

Infection and Respiratory and Reproductive Clinical Manifestations in Dairy Cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, **4**: 92.

GALIK PK, VAN SANTEN VL, STRINGFELLOW DA, BIRD RC, WRIGHT JC, SMITH PC (1993). Development of a DNA probe for identification of bovine herpesvirus 4. *American Journal of Veterinary Research*, **54 (5)**: 653–659.

GIBBS EPJ, RWEYEMAMU MM (1977). Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. *Vet. Bull.* **47**: 411-425.

GILLET L, MINNER F, DETRY B, FARNIR F, WILLEMS L, LAMBOT M, THIRY E, PASTORET PP, SCHYNTS F, VANDERPLASSCHEN A. (2004). Investigation of the Susceptibility of Human Cell Lines to Bovine Herpesvirus 4 Infection: Demonstration that Human Cells Can Support a Nonpermissive Persistent Infection Which Protects Them against Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis. *Journal of Virology*, **78 (5)**: 2336–2347.

GILLET L, DAIX V, DONOFRIO G, WAGNER M, KOSZINOWSKI UH, CHINA B, ACKERMANN M, MARKINE-GORIAYNOFF N, VANDERPLASSCHEN A (2005a). Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *Journal of General Virology*, **86 (4)**: 907–917.

GILLET L, DEWALS B, FARNIR F, DE LEVAL L, VANDERPLASSCHEN A (2005b). Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Research*, **65 (20)**: 9463–9472.

GLAUSER DL, KRATZ AS, STEVENSON PG (2012). Herpesvirus glycoproteins undergo multiple antigenic changes before membrane fusion. *PLoS ONE*, **7 (1)**.

GLAZOV EA, HORWOOD PF, ASSAVALAPSAKUL W, KONGSUWAN K, MITCHELL RW, MITTER N, MAHONY TJ (2010). Characterization of microRNAs encoded by the bovine herpesvirus 1 genome. *Journal of General Virology*, **91 (1)**: 32–41.

- GLORIOSO J, SCHROEDER CH, KUMEL G, SZCZESIUL M, LEVINE M (1984). Immunogenicity of herpes simplex virus glycoproteins gC and gB and their role in protective immunity. *Journal of Virology*, **50 (3)**: 805–812.
- GLORIOSO JC, DELUCA NA, FINK DJ (1995). Development and Application of Herpes Simplex Virus Vectors for Human Gene Therapy. *Annual Review of Microbiology*, **49 (1)**: 675–710.
- GOLTZ M, BROLL H, MANKERTZ A, WEIGELT W, LUDWIG H, BUHK HJ, BORCHERS K (1994). Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: Its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes*, **9 (1)**: 53–59.
- GRAHAM DA, MCNEILL GJ, CALVERT V, MAWHINNEY K, CURRAN W, BALL NW, TODD D (2005). Virological and serological evidence of bovine herpesvirus type 4 in cattle in Northern Ireland. *The Veterinary Record*, **157 (18)**: 539–543.
- GRUFFAT H, MARCHIONE R, MANET E (2016). Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 869.
- GUO H, SHEN S, WANG L, DENG H (2010). Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein & Cell*, **1 (11)**: 987–998.
- GUO WZ, SHEN DT, EVERMANN JF, GORHAM JR (1988). Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a complement-fixation test for the detection of IgG to bovine herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus). *American Journal of Veterinary Research*, **49 (5)**: 667–670.
- GUR S, DOGAN N (2010). The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Animal Science Journal*, **81 (3)**: 304–308.
- HEMING JD, CONWAY JF, HOMA FL (2017). Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, **223**: 119–142.
- HIRT B (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *Journal of Molecular Biology*, **26 (2)**: 365–369.

- HUKKANEN V (2010). Herpesvirus Vectors in Gene Therapy. *The Open Virology Journal*, **4**: 94–95.
- HUTT-FLETCHER LM (2015). EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virology*, **10 (10)**: 1155–1162.
- IZUMI Y, TSUDUKU S, MURAKAMI K, TSUBOI T, KONISHI M, HARITANI M, KAMIYOSHI T, KIMURA K, SENTSUI H (2006). Characterization of Bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, **68 (2)**: 189–193.
- JACCA S, FRANCESCHI V, COLAGIORGI A, SHELDON M, DONOFRIO G (2013). Bovine endometrial stromal cells support tumor necrosis factor alpha-induced bovine herpesvirus type 4 enhanced replication. *Biology of Reproduction*, **88 (5)**: 135.
- JACCA S, ROLIH V, QUAGLINO E, FRANCESCHI V, TEBALDI G, BOLLI E, ROSAMILIA A, OTTONELLO S, CAVALLO F, DONOFRIO G (2016). Bovine herpesvirus 4-based vector delivering a hybrid rat/human HER-2 oncoantigen efficiently protects mice from autochthonous Her-2+mammary cancer. *Oncoimmunology*, **5 (3)**: e1082705.
- JERUSALINSKY D, BAEZ MV, EPSTEIN AL (2012). Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *Journal of Physiology-Paris*, **106 (1–2)**: 2–11.
- JOHNSON DC, WISNER TW, WRIGHT CC (2011). Herpes Simplex Virus Glycoproteins gB and gD Function in a Redundant Fashion To Promote Secondary Envelopment. *Journal of Virology*, **85 (10)**: 4910–4926.
- JUNG JU, CHOI JK, ENSSER A, BIESINGER B (1999). Herpesvirus saimiri as a model for gammaherpesvirus oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. **9 (3)**: 231-9.

- KALE M, ATA A, KOCAMUFTUOGLU M, HASIRCIOGLU S (2011). Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) infection in relation to fertility in repeat breeder dairy cows. *Acta Veterinaria*, **61 (1)**: 13–19.
- KEIL GM, HOHLE C, GIESOW K, KONIG P (2005). Engineering glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: a new protein expression approach. *Journal of Virology*, **79 (2)**: 791–799.
- KELLEHER ZT, FU H, LIVANOS E, WENDELBURG B, GULINO S, VOS JM (1998). Epstein-Barr-based episomal chromosomes shuttle 100 kb of self- replicating circular human DNA in mouse cells. *Nature Biotechnology*, **16 (8)**: 762–768.
- KIM UJ, BIRREN BW, SLEPAK T, MANCINO V, BOYSEN C, KANG HL, SIMON MI, SHIZUYA H (1996). Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, **34 (2)**: 213–218.
- KIT S, QAVI H, GAINES JD, BILLINGSLEY P, MCCONNELL S (1985). Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Archives of Virology*, **86 (1–2)**: 63–83.
- KIT S, KIT M, HIROSHI I, CRANDELL R, MCCONNELL S (1986). Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: Bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Research*, **4 (2)**: 197–212.
- KLAMMINGER S, PRUNNER I, GIULIODORI MJ, DRILLICH M (2017). Uterine infection with bovine herpesvirus type 4 in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, **52 (1)**.
- KRAMER T, ENQUIST LW (2013). Directional Spread of Alphaherpesviruses in the Nervous System. *Viruses*, **5 (2)**: 678–707.
- KRIEG AM (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol*, **20**: 709–760.

- KROGMAN LA, MCADARAGH JP (1982). Recrudescence of bovine herpesvirus-5 in experimentally infected calves. *American Journal of Veterinary Research*.**43**: 336–338.
- KRUGER ER, PENHA TR, HUMMELGEN FC, AGOTTANI JB, REVA D, GONCALVES R, THOMAZ-SOCCOL V (2015). Development and evaluation of an indirect ELISA: Serological survey to detect specific antibodies to bovine herpesvirus 4. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **58 (5)**: 725–731.
- KUNG SH, MEDVECZKY PG (1996). Identification of a herpesvirus Saimiri cis-acting DNA fragment that permits stable replication of episomes in transformed T cells. *J Virol*, **70 (3)**: 1738–1744.
- KURJOGI MM, KALIWAL BB (2014). In Silico Identification and Characterization of Potential Drug Targets in Bovine Herpes Virus 4, Causing Bovine Mastitis. *Advances in Biology*. Article ID 369213, 6 pages.
- KURODA T, MARTUZA RL, TODO T, RABKIN SD (2006). Flip-Flop HSV-BAC: bacterial artificial chromosome based system for rapid generation of recombinant herpes simplex virus vectors using two independent site-specific recombinases. *BMC Biotechnology*, **6**: 40.
- LACHMANN RH (2004). Herpes simplex virus-based vectors. *International Journal of Experimental Pathology*, **85 (4)**: 177–190.
- LETE C, MACHIELS B, STEVENSON PG, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L (2012a). Bovine Herpesvirus Type 4 Glycoprotein L Is Nonessential for Infectivity but Triggers Virion Endocytosis during Entry. *Journal of Virology*, **86 (5)**: 2653–2664.
- LETE C, PALMEIRA L, LEROY B, MAST J, MACHIELS B, WATTIEZ R, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L (2012b). Proteomic Characterization of Bovine Herpesvirus 4 Extracellular Virions. *Journal of Virology*, **86 (21)**: 11567–11580.

- LETE C, MARKINE-GORIAYNOFF N, MACHIELS B, PANG PC, XIAO X, CANIS K, SUZUKI M, FUKUDA M, DELL A, HASLAM SM, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L (2016). Bovine herpesvirus 4 modulates its β -1,6-n-acetylglucosaminyltransferase activity through alternative splicing. *Journal of Virology*, **90** (4): 2039–2051.
- LEWIS PJ, VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK S, BABIUK LA (1999). Induction of immune responses to bovine herpesvirus type 1 gD in passively immune mice after immunization with a DNA-based vaccine. *Journal of General Virology*, **80** (11): 2829–2837.
- LI H, SHEN DT, BURGER D, DAVIS WC, GORHAM JR (1991). Analysis of bovine herpesvirus 4 (DN 599) major antigens with monoclonal antibodies and polyclonal immune serum. *Archives of Virology*, **119** (3–4): 225–238.
- LIEBERMAN, PM (2016). Epigenetics and Genetics of Viral Latency. *Cell Host & Microbe*, **19** (5): 619–628.
- LINDSEY NP, SCHROEDER BA, MILLER ER, BRAUN MM, HINCKLEY AF, MARANO N, SLADE BA, BARNETT ED, BRUNETTE GW, HORAN K, STAPLES JE, KOZARSKY PE, HAYES EB (2008). Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine*, **26** (48): 6077–6082.
- LIU MA, MCCLEMENTS W, ULMER JB, SHIVER J, DONNELLY J (1997). Immunization of non-human primates with DNA vaccines. In *Vaccine*. **15**: 909–912.
- LIU XJ, SONG B, LU JM, WANG QZ, HAN ZQ, XU YM (2011). Construction of a recombinant BAC-HSV-1 strain HF with a GFP reporter gene and characterization of its infectious progeny virus. *Bing Du Xue Bao = Chinese Journal of Virology / [Bian Ji, Bing Du Xue Bao Bian Ji Wei Yuan Hui]*, **27**(3).
- LOANNOU PA, AMEMIYA CT, GARNES J, KROISEL PM, SHIZUYA H, CHEN C, BATZER MA, DE JONG PJ (1994). A new bacteriophage P1–derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics*, **6** (1): 84–89.

- LOMONTE P, BUBLOT M, PASTORET PP, THIRY E (1992). Location and characterization of the bovine herpesvirus type 4 thymidine kinase gene; comparison with thymidine kinase genes of other herpesviruses. *Archives of Virology*, **127** (1–4): 327–337.
- LOMONTE P, FILEE P, LYAKU JR, BUBLOT M, PASTORET PP, THIRY E (1997). Glycoprotein B of bovine herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology*, **71** (4): 3332–3335.
- LOPEZ OJ, GALEOTA JA, OSORIO FA (1996). Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) persistently infects cells of the marginal zone of spleen in cattle. *Microbial Pathogenesis*, **21** (1): 47–58.
- LUCKOW VA, LEE SC, BARRY GF, OLINS PO (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, **67** (8): 4566–4579.
- LUDWIG H (1983). Bovine herpesviruses. In *The Herpesviruses*, **2**: 35-214. Edited by B. Roizman. New York & London: Plenum Press.
- LYMAN MG, ENQUIST LW (2008). Herpesvirus Interactions with the Host Cytoskeleton. *Journal of Virology*, **83** (5): 2058–2066.
- MACCHI F, ROJAS JM, VERNA AE, SEVILLA N, FRANCESCHI V, TEBALDI G, CAVIRANI S, MARTIN V, DONOFRIO G (2018). Bovine Herpesvirus-4-Based Vector Delivering Peste des Petits Ruminants Virus Hemagglutinin ORF Induces both Neutralizing Antibodies and Cytotoxic T Cell Responses. *Frontiers in Immunology*, **9**: 421.
- MACHIELS B, LETE C, DE FAYS K, MAST J, DEWALS B, STEVENSON PG, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L (2011). The bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *Journal of Virology*, **85** (2): 1011–1024.

- MARKINE-GORIAYNOFF N, MINNER F, DE FAYS K, GILLET L, THIRY E, PASTORET PP, VANDERPLASSCHEN A (2003). L'herpèsvirus bovin 4. *Annales de Medecine Veterinaire*. **147**: 215-247.
- MCGREGOR S, EASTERDAY BC, KAPLAN AS, BEN-PORAT T (1985). Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. *American Journal of Veterinary Research*, **46**: 1494-1497.
- MESEDA CA, SCHMEISSER F, PEDERSEN R, WOERNER A, WEIR JP (2004). DNA immunization with a herpes simplex virus 2 bacterial artificial chromosome. In *Virology*. **318**: 420–428.
- MESSERLE M, CRNKOVIC I, HAMMERSCHMIDT W, ZIEGLER H, KOSZINOWSKI UH (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94 (26)**: 14759–14763.
- METTENLEITER TC, KLUPP BG, GRANZOW H (2009). Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research*, **143 (2)**: 222-34.
- METZLER AE, SCHUDEL AA, ENGELS M (1986). Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives of Virology*, **87 (3–4)**: 205–217.
- MOHANTY SB, HAMMOND RC, LILLIE MG (1971). A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Archiv For Die Gesamte Virusforschung*, **33 (3–4)**: 394–395.
- MONGE A, ELVIRA L, GONZALEZ JV, ASTIZ S, WELLENBERG GJ (2006). Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Research in Veterinary Science*, **80 (1)**: 120–125.
- MORISSETTE G, FLAMAND L (2010). Herpesviruses and Chromosomal Integration. *Journal of Virology*, **84 (23)**: 12100–12109.

- MURPHY FA, GIBBS EPJ, HORZINEK MC, STUDDERT MJ (1999). Herpesviridae. *Veterinary Virology*. 301–325.
- NAEEM K, GOYAL SM (1990). A Dot Immunobinding Assay on Nitrocellulose for the Detection of Bovid Herpesvirus- Antibodies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **2 (2)**: 107–110.
- NAK Y, DAGALP SB, CETIN C, NAK D, ALKAN F, BORUM E, TUNA B (2011). Course and severity of postpartum metritis cases following antibiotic and PGF2 α administration in postpartum metritis cows infected with BoHV-4. *Transboundary and Emerging Diseases*, **58 (1)**: 31–36.
- NANDI S, KUMAR M, MANOHAR M, CHAUHAN RS (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*, **10 (1)**: 85–98.
- NOVAKOVA J, IZSAKOVA A, GRIVALSKY T, OTTMANN C, FARKASOVSKY M (2014). Improved method for high-efficiency electrotransformation of Escherichia coli with the large BAC plasmids. *Folia Microbiologica*, **59 (1)**: 53–61.
- OSORIO FA, REED DE, ROCK DL (1982). Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: Acute and persistent infection. *Veterinary Microbiology*, **7 (6)**: 503–513.
- OSORIO FA, REED DE (1983). Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *American Journal of Veterinary Research*, **44 (6)**: 975–980.
- PAREDES AM, YU D (2012). Human Cytomegalovirus: Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Cloning and Genetic Manipulation. *Current Protocols in Microbiology*, CHAPTER, Unit14E.4.
- PARKS JB, KENDRICK JW (1973). The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, **41 (3)**: 211–215.

- PETERSON RB, GOYAL SM (1988). Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **11 (2)**: 93–98.
- POKHRIYAL M, VERMA OP, RATTI B, KUMAR A, SAXENA M, SHARMA B (2016). Bovine Herpes Virus 1 Major Immediate Early Transcription Unit 1 (IETU-1) Uses Alternative Promoters to Transcribe BICP0 and BICP4 Transcripts. *Current Microbiology*, **72 (4)**: 420–425.
- PRASAD A, REMICK J, ZEICHNER SL (2013). Activation of Human Herpesvirus Replication by Apoptosis. *Journal of Virology*, **87 (19)**: 10641–10650.
- REDAELLI M, MUCIGNAT-CARETTA C, CAVAGGIONI A, CARETTA A, D'AVELLA D, DENARO L, CAVIRANI S, DONOFRIO G (2010). Bovine herpesvirus 4 based vector as a potential oncolytic-virus for treatment of glioma. *Virology Journal*, **7**: 298.
- RAJCANI J, KUDELOVA M (2003). Gamma herpesviruses: Pathogenesis of infection and cell signaling. *Folia Microbiologica*, **48 (3)**: 291–318.
- REED DE, LANGPAP TJ, BERGELAND ME (1979). Bovine abortion associated with mixed Movar 33/63 type herpesvirus and bovine viral diarrhea virus infection. *Cornell Vet*, **69 (1)**: 54–66.
- REHMAN H, SILK AW, KANE MP, KAUFMAN HL (2016). Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **4**: 53.
- RHA B, TATE JE, WEINTRAUB E, HABER P, YEN C, PATEL M, CORTESE MM, DESTEFANO F, PARASHAR UD (2014). Intussusception following rotavirus vaccination: An updated review of the available evidence. *Expert Review of Vaccines*. **13 (11)**:1339-48.
- RICH LJ, FABRICANT CG (1969). Urethral Obstruction in Male Cats: Transmission Studies. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **33 (2)**: 164–165.

- RIXON FJ (1993). Structure and assembly of herpesviruses. *Seminars in Virology*, **4** (3): 135–144.
- ROGERS S, LOWENTHAL A, TERHEGGEN HG, COLUMBO JP (1973). Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *The Journal of Experimental Medicine*, **137** (4): 1091–1096.
- ROIZMAN B, CARMICHAEL LE, DEINHARDT F, DE-THE G, NAHMIAS AJ, PLOWRIGHT W, RAPP F, SHELDRIK P, TAKAHASHI M, WOLF K (1981). Herpesviridae: Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. *Intervirology*, **16** (4): 201–217.
- ROIZMAN B, DESROSIERS RC, FLECKENSTEIN B, LOPEZ C, MINSON AC, STUDDERT MJ (1992). The family herpesviridae: an update. *Archives of Virology*, **123**: 425-449.
- ROMERA SA, PUNTEL M, QUATTROCCHI V, ZAJAC PDM, ZAMORANO P, BLANCO VIERA J, CARRILLO C, CHOWDHURY S, BORCA MV, SADIR AM (2014). Protection induced by a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle. *BMC Veterinary Research*, **10**: 8.
- ROSAMILIA A, JACCA S, TEBALDI G, TIBERTI S, FRANCESCHI V, MACCHI F, CAVIRANI S, KOBINGER G, KNOWLES DP, DONOFRIO G (2016). BoHV-4-based vector delivering Ebola virus surface glycoprotein. *Journal of Translational Medicine*, **14**: 325.
- ROSAS CT, KONIG P, BEER M, DUBOVI EJ, TISCHER BK, OSTERRIEDER N (2007). Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhea virus structural proteins. *The Journal of General Virology*, **88** (3): 748–757.
- SAMBROOK, J., & RUSSEL, D, W. (2000). Molecular Cloning, 3-Volume Set: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harboc Laboratory Press*.

- SANTOS CAQ (2016). Cytomegalovirus and Other β -Herpesviruses. *Seminars in Nephrology*.
- SCHRIJVER RS, LANGEDIJK JPM, KEIL GM, MIDDEL WGJ, MARIS-VELDHUIS M, VAN OIRSCHOT JT, RIJSEWIJK FAM (1997). Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine*, **15 (17–18)**: 1908–1916.
- SCIORTINO MT, PERRI D, MEDICI MA, FOTI M, ORLANDELLA BM, MASTINO A (2000). The gamma-2-herpesvirus bovine herpesvirus 4 causes apoptotic infection in permissive cell lines. *Virology*, **277 (1)**: 27–39.
- SHARIFI-TABAR M, HESARAKI M, ESFANDIARI F, SAHRANESHIN SAMANI F, VAKILIAN H, BAHARVAND H (2015). Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh)*, **17 (3)**: 438–450.
- SHENG Y, MANCINO V, BIRREN B (1995). Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Research*, **23 (11)**: 1990–1996.
- SHIZUYA H, BIRREN B, KIM UJ, MANCINO V, SLEPAK T, TACHIIRI Y, SIMON M (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89 (18)**: 8794–8797.
- SMITH PC, CUTLIP RC, RITCHIE AE, YOUNG JK (1972). A bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **161**: 1134–1141.
- SPEAR PG, LONGNECKER R (2003). Herpesvirus Entry: an Update. *Journal of Virology*, **77 (19)**: 10179–10185.
- STAUFFER F, EL-BACHA T, DA POIAN A (2006). Advances in the Development of Inactivated Virus Vaccines. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **1 (3)**: 291–296.

- STORZ J, EHLERS B, TODD WJ, LUDWIG H (1984). Bovine cytomegaloviruses: Identification and differential properties. *Journal of General Virology*, **65 (4)**: 697–706.
- SUN R, LIN SF, STASKUS K, GRADOVILLE L, GROGAN E, HAASE A, MILLER G (1999). Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol*, **73 (3)**: 2232–42.
- SUTER M, LEW AM, GROB P, ADEMA GJ, ACKERMANN M, SHORTMAN K, FRAEFEL C (1999). BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96 (22)**: 12697–12702.
- TANDON R, MOCARSKI ES, CONWAY JF (2015). The A, B, Cs of Herpesvirus Capsids. *Viruses*, **7 (3)**: 899–914.
- THIRION M, MACHIELS B, FARNIR F, DONOFRIO G, GILLET L, DEWALS B, VANDERPLASSCHEN A (2010). Bovine herpesvirus 4 ORF73 is dispensable for virus growth in vitro, but is essential for virus persistence in vivo. *Journal of General Virology*, **91 (10)**: 2574–2584.
- THIRY E, BUBLOT M, DUBISSON J, PASTORER PP (1989). Bovine Herpesvirus-4 (BHV-4) Infections of Cattle. In: Wittmann G. (eds) *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs. Developments in Veterinary Virology*, **97 (2)**: 72-7.
- THIRY E, VERCOUTER M, DUBUISSON J, BARRAT J, SEPULCHRE C, GERARDY C, MEERSSCHAERT C, COLLIN B, BLANCOU J, PASTORET PP (1998). Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. *Journal of Wildlife Diseases*, **24 (2)**: 268–273.

- TOMANIN R, SCARPA M (2004). Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Current Gene Therapy*, **4 (4)**: 357–372.
- TODD WJ, STORZ J (1983). Morphogenesis of a cytomegalovirus from American bison affected with malignant catarrhal fever. *Journal of General Virology*, **64**:1025-1030.
- TRAPP S, BEER M, METTENLEITER TC (2003). Biology of bovine herpesviruses. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, **116 (5–6)**: 171–178.
- TRAPP S, VON EINEM J, HOFMANN H, KOSTLER J, WILD J, WAGNER R, BEER M, OSTERRIEDER N (2005). Potential of equine herpesvirus 1 as a vector for immunization. *Journal of Virology*, **79 (9)**: 5445–5454.
- TROYER RM, BEATTY JA, STUTZMAN-RODRIGUEZ KR, CARVER S, LOZANO CC, LEE JS, LAPPIN MR, RILEY SPD, SERIEYS LEK, LOGAN KA, SWEANOR LL, BOYCE WM, VICKERS TW, MCBRIDE R, CROOKS KR, LEWIS JS, CUNNINGHAM MW, ROVNAK J, QUACKENBUSH SL, VANDEWOUDE, S (2014). Novel gammaherpesviruses in North American domestic cats, bobcats, and pumas: identification, prevalence, and risk factors. *Journal of Virology*, **88(8)**, 3914–3924.
- TRUS BL, HEYMAN JB, NEALON K, CHENG N, NEWCOMB WW, BROWN JC, KEDES DH, STEVEN AC (2001). Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *Journal of Virology*, **75 (6)**: 2879–2890.
- TUNCER-GOKTUNA P, ALPAY G, ONER EB, YESILBAG K (2016). The role of herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) and pestiviruses (BVDV and BDV) in ruminant abortion cases in western Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, **48 (5)**: 1021–1027.

- VAN OPDENBOSCH E, WELLEMANS G, OOMS LAA, DEGRYSE ADAY (1988): BHV-4 (bovine herpesvirus 4) related disorders in Belgian cattle. A study of two problem herds. *Vet. Res. Commun.* **12**: 347-353.
- VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK S, BRAUN RP, LEWIS PJ, KARVONEN BC, BABIUK LA, GRIEBEL PJ (2009). Immunization of neonates with DNA encoding a bovine herpesvirus glycoprotein is effective in the presence of maternal antibodies. *Viral Immunology*, **12 (1)**: 67–77.
- WANG L, GUO H, REYES N, LEE S, BORTZ E, GUO F, SUN R, TONG L, DENG H (2012). Distinct Domains in ORF52 Tegument Protein Mediate Essential Functions in Murine Gammaherpesvirus 68 Virion Tegumentation and Secondary Envelopment. *Journal of Virology*, **86 (3)**: 1348–1357.
- WARDEN C, TANG Q, ZHU H (2011). Herpesvirus BACs: Past, present, and future. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- WELLEMANS GJ, ANTOINE H, BROES A, CHARLIER G, VANOPDENBOSCH E (1984). Symptomatologie variee apparaissant lorsde metrites chroniques associees au virus herpes chez les bovins. *Ann. Med. Vet.* **128**: 65–74.
- WELLEMANS GJ, VANOPDENBOSCH E, MAMMERICKX M (1986). Inoculation experimentale du virus LVR 140 (herpesvirusbovin IV) a des vaches gestantes et non-gestantes. *Ann.Rech. Vet.* **17**: 89–94.
- WELLEMANS GJ, VANOPDENBOSCH E (1989). Associationentre l'infection par le BHV-4 et l'avortement chez la vache. *Ann. Med. Vet.* **133**: 347–350.
- WELLENBERG GJ, VAN ROOIJ EM, MAISSAN J, VAN OIRSCHOT JT (1999). Evaluation of newly developed immunoperoxidase monolayer assays for detection of antibodies against bovine herpesvirus 4. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6 (4)**: 447–451.
- WELLENBERG GJ, VERSTRATEN ERAM, BELAK S, VERSCHUREN SBE, RIJSEWIJK FA, PESHEV R, VAN OIRSCHOT JT (2001). Detection of bovine

- herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *Journal of Virological Methods*, **97** (1–2): 101–112.
- WELLENBERG GJ, BRUSCHKE CJM, WISSELINK HJ, BARKEMA HW, VAN OIRSCHOT JT (2002). Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with bovine herpesvirus 4 induce subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology*. **86** (1-2):115-29.
- WELLER SK, COEN DM (2012). Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **4** (9): a013011.
- WILD J, HRADECNA Z, SZYBALSKI W (2002). Conditionally Amplifiable BACs: Switching From Single-Copy to High-Copy Vectors and Genomic Clones. *Genome Research*, **12** (9): 1434–1444.
- WOLD WSM, TOTH K (2013). Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, **13** (6): 421–433.
- YILDIRIM Y, YILMAZ V, KALAYCIOGLU AT, DAGALP SB, MAJARASHIN ARF, CELEBI O, AKCA D (2011). An Investigation of a possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in Kars district of Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **17**: 879–883.
- ZADOKS RN, ALLORE HG, BARKEMA HW, SAMPIMON OC, WELLENBERG GJ, GROHN YT, SCHUKKEN YH (2001). Cow- and Quarter-Level Risk Factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, **84** (12): 2649–2663.
- ZHANG Y, WANG ZQ, LIU B, ZHANG XJ, JIANG F, XIANG JH (2007). The study of optimal conditions of electroporation in *Escherichia coli* DH10B strain. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, **23** (2): 347–351.
- ZIMMERMANN W, BROLL H, EHLERS B, BUHK HJ, ROSENTHAL A, GOLTZ M (2001). Genome Sequence of Bovine Herpesvirus 4, a Bovine Rhadinovirus, and

Identification of an Origin of DNA Replication. *Journal of Virology*, **75 (3)**: 1186–1194.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Touraj

Soyadı: Aligholipour Farzani

Doğum yeri ve tarihi: Maragheh, Iran, 23.09.1985

(pasaport no.H20648892-YTC no.99460461032)

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Viroloji Anabilim Dalı, 0312 3170315/ Cep: 5070302576

II- Eğitimi

2005-2011: Urmia Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Iran/Yükseklisans

III- Ünvanları

2011: Veteriner Hekim

IV-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

American Society of Virology

V-Bilimsel İlgili Alanlar

Yayınlar

BILGE DAGALP S, DOGAN F, FARZANI TA, SALAR S, BASTAN A (2017). The genetic diversity of bovine papillomaviruses (BPV) from different papillomatosis cases in dairy cows in Turkey. *Archives of Virology*, **162(6)**, 1507-1518.

DOGAN F, BILGE DAGALP S, ATASEVEN VS, FARZANI TA (2016). The Molecular Detection of Lumpy Skin Disease Virus from Infected Cattle in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*, **10 (2)**.

Bildiriler

DOĞAN F, BİLGE DAGALP S, DİK B, ÖZKUL A, SOYDAL ATASEVEN V, FARZANI TA, DORTTAS SD (2018). Investigation of Epidemiology of Schmallenberg Virus (SBV) Infection in Abortion Cases in Goats in Eastern Mediterranean Region. I. Uluslararası GAP Tarım ve Hayvancılık Kongresi 25-27 Nisan 2018, Şanlıurfa, Türkiye (Sözlü sunum).

FARZANI TA, BİLGE DAGALP S, ÖZKUL A (2017). Bovine herpesvirus type 4-BAC as an attractive viral vector for vaccination and gene therapy. 16th Euro Global Summit and Expo on Vaccine and Vaccination, Paris, Fransa (Sözlü Sunum)

BİLGE DAGALP S, FARZANI TA, DOĞAN F, DORTTAS SD, ALKAN F, ÖZKUL A (2017). The molecular and antigenic characterization of Turkish Bovine Herpesvirus type1 (BoHV-1) isolates. 5th Veterinary Herpesvirus Symposium of the European Society For Veterinary Virology (ESVV 2017), Ghent, Belçika (Poster Bildiri)

DOĞAN F, BİLGE DAGALP S, ATASEVEN VS, FARZANI TA (2016). The Molecular Detection of Lumpy Skin Disease Virus from infected cattle in Turkey. 2. International Congress on Applied Biological Sciences, Saraybosna, Bosna-Hersek (Poster Bildiri)

BİLGE DAGALP S, DOĞAN F, FARZANI TA, SALAR S, BASTAN A (2016). The genetic diversity of bovine papillomaviruses BPV from different papillomatosis cases in Turkish cattle. 6th European Congress of Virology, Hamburg, Almanya (Poster Bildiri)

Projeler

Aşılama stratejilerinde bir gen aktarım vektörü olarak yerel BoHV-4 izolatu kullanımı: BoHV-1 glikoprotein D ifade eden BoHV-4 (BoHV-4/BoHV-1 gD)

elde edilmesi, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, No:17B0239004 2017-Devam Ediyor (Yardımcı Araştırmacı).

Doğu Akdeniz Bölgesinde Hatay Osmaniye ve Kahramanmaraş'ta ruminantlarda bazı arboviral (Akabane virus Mavidil virus ve Schmallerberg virus) enfeksiyonların epidemiyolojisinin araştırılması ve olası vektörlerinin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, No:15B0239007 2015-2018 (Yardımcı Araştırmacı).

VI-Diğer Bilgiler

Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2017).