



## Önemli Balık Viruslarına Karşı Revers Genetik Yaklaşımlar

Yüksel DURMAZ<sup>1</sup> Harun ALBAYRAK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veteriner Kontrol Enstitüsü, Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Samsun –TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Samsun –TÜRKİYE

**Özet:** Bu derlemede balıkların önemli RNA viruslarına karşı geliştirilen revers genetik sistemler anlatılmıştır. Balık çiftliklerinde ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların çoğu viral etkenlerden kaynaklanmaktadır. Bakteriyel, paraziter ve fungal balık hastalıkları çeşitli kemoterapötikler ile tedavi edilmesine karşın, viral hastalıkların tedavisi yapılamamaktadır. Teknolojideki gelişmeler ve moleküler çalışmalar viral genomu müdahaleyi mümkün kılmıştır. Viral RNA genomundan canlı virus elde edilmesi “revers genetik” olarak isimlendirilmektedir. Revers genetik yöntemlerle viral RNA genomuna müdahale edilmesi, araştırmacılara birçok faydalar sağlamıştır. Revers genetik sistemler infeksiyöz salmon anemi virus (ISA), salmonid alfavirus (SAV), infeksiyöz hematopoetik nekrozis virus (IHNV), viral hemorajik sepsisemi virus (VHSV), infeksiyöz pankreatik nekrozis virus (IPNV) ve strip cek nervöz nekrozis virus (SJNNV) gibi balık RNA virusları için oluşturulmuştur. Revers genetik sistemlerin keşfi balıklarda patojen RNA virusları için büyük bir buluş ve saha araştırmaları için önemli bir araç olmuştur. Gelecek yıllarda revers genetik konusundaki çalışmaların artacağı ve bilim dünyası için ilgi odağı olacağı tahmin edilmektedir

**Anahtar kelimeler:** Balık, revers genetik, RNA virüsü

### The Reverse Genetics Assessment of Major Fish Viruses

**Summary:** In this review, the reverse genetics assessment of major fish viruses has been evaluated. The majority of the diseases causing economic losses in fish farms have been viral agents. Bacterial, parasitic and fungal fish diseases can be treated via various chemotherapeutics but viral diseases cannot be treated via these. Technological developments and molecular studies allowed manipulation of the viral genome. The live viruses were recovered from RNA genome. This applications is named as reverse genetics. The ability to manipulate the viral RNA genome through reverse genetics methods provided many benefits for researchers. The reverse genetics systems for the several fish RNA viruses were constructed; Infectious salmon anaemia virus (ISA), salmonid alphavirus (SAV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Discovery of the reverse genetics on the pathogen fish RNA viruses have been a breakthrough and an important tool for field researches. In the next years forth, the studies of reverse genetics will increase and it supposes focus of attraction by the world of science.

**Key words:** Fish, reverse genetics, RNA virus

### Giriş

Kaliteli hayvansal proteine artan talepten dolayı, su ürünleri sektörü tarım sektörü içerisinde en hızlı gelişen sektör haline gelmiştir (14). Dünyada toplam su ürünleri yetiştiriciliği 1998-2007 yılları arasında iki kat artmıştır. Su ürünleri tüketimindeki artış, doğal stoklardaki balık türlerinin azalmasına neden olmuştur. Bakteriyel, paraziter ve fungal balık hastalıkları çeşitli kemoterapötik ajanlar ile tedavi edilmesine karşın, viral hastalıkların tedavisi yapılamamaktadır (25). Su

ürünleri yetiştiricileri, balık stoklarını viral enfeksiyonlardan koruyabilmek için, yeni nesil aşılarda ilgili gelişmelere odaklanmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda viral genomu müdahale edilmesine izin veren yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Gen mühendisliği için büyük bir adım olan “revers genetik”, RNA genomunun DNA kopyasından canlı virusun yeniden elde edilmesi olarak açıklanabilir (5). Bu güne kadar kullanılmış olan bütün sistemler yardımcı bir vaksinia virüsün (vTF7-3) ürettiği T7 RNA polimerazın (T7RNAP, keşif eklenmesinde kullanılan bir promotor, enzim) kontrolü altında viral genomların ekspresyonuna dayanmaktadır (3). RNA viruslarına özgün bir revers genetik sistemin geliştirilebilmesi için, tam bir viral transkripsiyon ve repli-

kasyon mekanizmasına ihtiyaç duyulmaktadır (33).

Revers genetik yöntemler balıklarla yapılan virolojik çalışmalarda; virüslerde gen fonksiyonlarının araştırılması, virülens farklılıkları, konakçı çeşitliliğinin belirlenmesi, virüslerin attenüasyonu, hedeflenen mutasyonların gerçekleştirilmesi, patojeniteden sorumlu genlerin inaktivasyonu veya aktivasyonu, antijenlerin ekspresyonu, rekombinant proteinlerin ve aşuların hazırlanması, biyolojik aktif moleküllerin üretilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır (3,4,5,6,29,33). Bunlara ilave olarak; genlerin silinmesi, nakli veya çoğaltılması, rekombinant antijenlerin ve proteinlerin üretilmesi, hormonların, interferonların, bakterilerin, enzimlerin ve immunglobulinlerin üretilmesi, aminoasitlerin kimliklendirilmesi, elde edilen rekombinant virüsün gen vektörü olarak kullanılması ve gen sağaltım çalışmaları amaçlarıyla da kullanılmaktadır (3,4,5,11,14,30).

Revers genetikteki ilk başarı, 1981 yılında pozitif iplikçikli RNA virüsü olan poliovirus için elde edilmiştir. Bu gelişmeden 13 yıl sonra segment-siz, negatif iplikçikli, RNA virüsü olan kuduz virüsü (RV) için de bir revers genetik sistem kurulmuştur (5). Revers genetik sistemler, balıkların önemli RNA virüslerinden olan infeksiyöz salmon anemi virus "ISAV" (33), salmonid alfavirus "SAV" (18,21), viral hemorajik septisemi virus "VHSV", infeksiyöz hematopoetik nekrozis virus "IHNV" (2,3,19), infeksiyöz pankreatik nekrozis virus "IPNV" (22,29) ve strip cek nervöz nekrozis virus (SJNNV) için de oluşturulmuştur (15,30).

#### **Yabancı Bir Genin Yerleştirilmesi**

Yabancı bir geni virus RNA'sı içerisine yerleştirme stratejisi, genom organizasyonuna bağlıdır. Hedeflenen yabancı gen, cDNA olarak dizayn edilir ve bir proteaz bölünme yeri ile birlikte genom içerisine yerleştirilir (7). Vaksinia virus genomunda bulunan timidin kinaz (Tk) geni, virüsün hücre içi replikasyonu için gerekli olmadığı gibi virülense de bir katkısı bulunmamaktadır. Dolayısıyla, bu genin içerisine yabancı gen transfer edilebilmesine karşın, aktarılan genin ekspresyonu zayıf olur (4). Rhabdovirüslerdeki ardışık transkripsiyonlar, her bir genin yukarı kısmında bulunan ve RNA polimeraz tarafından tanınan gen başlangıç sinyali ile başlar ve gen sonlanma sinyali ile biter (7,11). Yabancı genin ekspresyonunu kodlayan sinyaller, cDNA üzerine yapay olarak eklenebilir veya mevcut bir genden viral gen alışverişi ile ya da bir füzyon

proteini tasarımı ile de elde edilebilirler. Gen transferi, cDNA içerisindeki protein kodlama yapmayan bölgelere yapılır. Eklenen yabancı gen dizisi, takip eden genlerin ekspresyonunu düşürür ve değişen oranlarda rekombinant virüsün replikasyonu üzerine etki eder. IHNV'nin non virion (NV) gen bölgesine farklı reporter genlerin yerleştirilmesi sonucu virüs büyük oranda attenüe edilmiştir. Bu attenüe rekombinant suşlar, hücre kültürlerinde saptanabilir miktarlarda yabancı proteinlerin ekspresyonunu yapabilmektedirler (32). Araştırmacılar, patojen olmayan IHNV suşlarındaki NV genini, rekombinant IHNV lusiferaz (LUC) geni ile değiştirerek elde ettikleri yeni rIHNV'nin, yüzgeçlerde sınırlı bir replikasyona neden olduğunu ve enfeksiyondan sonra 3 haftaya kadar balıkta herhangi bir yayılma göstermeksizin persiste kaldıklarını göstermişlerdir. ISAV'ın alt tiplerini rekombinant virüsler aracılığıyla göstermek için, segment 6'yı klonlayan plazmit içerisine ilave olarak iki sentetik genetik eleman yerleştirilmiştir (33). SAV'nin viral genomu içerisine GFP veya LUC genlerinin integrasyonu sonucunda, vahşi virüs tipinden %20 daha uzun genomlu bir rSAV oluşturulmuş ve bu oluşturulan genomu kapsit içerisine paketlenilebildiği belirlenmiştir (5).

#### **Viral Vektörler**

Viral vektörler, genlerin ekspresyonları, genlerin hücrelere aktarılması, viral enfeksiyonlara karşı etkin aşuların hazırlanması ve diğer amaçlarla kullanılmaktadırlar. Vektör olarak kullanılacak virüslerin konakçı ve hücre spektrumu geniş olmalı, viral genom içerisine büyük bir DNA segmentini kabul edebilmeli, kendi replikasyonunu engellememeli, enfeksiyöz ve onkojenik olmamalı ve birden fazla farklı geni alabilmelidirler. RNA genomuna sahip virüslardan bazıları (özellikle retrovirüsler) rekombinant vektör olarak kullanılmaktadır. Hücre sitoplazmasında, revers transkriptaz enzimi aracılığıyla virüsün genomik RNA'sından tek iplikçikli cDNA sentezlenir. cDNA, polimeraz 1 enzimiyle çift iplikçikli DNA'ya dönüştürülür (provirus). Vektör olarak kullanılan çift iplikçikli sirküler provirusun her iki ucunda tekrarlanan uzun sekanslar (LTR) bulunmaktadır. Bu uçlar transkripsiyonu başlatmada ve bitirmede etkin bir sinyal mekanizması (promotor) görevine sahiptirler. Provirus, LTR'lerle birlikte zarf proteini (env), RNA'ya bağlı DNA polimeraz (revers transkriptaz, pol) ve grup antijenleri (gag) gibi gen bölgelerine de sahiptir. Yabancı gen, provirusun 'gag' ve 'env'

gibi gen bölgelerinden birisine transfer edilir ve helper virus içeren hücrelere transfekte edilerek, genin replikasyonu ve ekspresyonu sağlanır (4). Önemli balık patojenlerine karşı revers genetik sistemlerin oluşturulabilmesi, bu virusların genomunun esnek olmasına ve yabancı genleri kabul etme yeteneklerine bağlıdır. Bu amaçla vektör olarak negatif polariteli viruslar, gen ekspresyonu için pozitif polariteli viruslara oranla daha uygundur (7,11). Negatif polariteli virus genomları korunmuş genin başlangıcı ile modüller organizasyon gösterir. Gen sonunda sinyaller viral polimeraz enzimi ile modüle edilerek, ayrılmış mRNA'nın transkripsiyonu sağlanır. Pozitif polariteli virus genomları polisiston mRNA'lardan eksprese edilerek poliproteine dönüştürülür. Bunu takiben hücresel veya viral proteazlar tarafından proteinlere ayrıştırılır. Negatif polariteli viruslarda, ribonükleoprotein kompleksinin (RNPC) helikal yapısından dolayı genom için belirlenmiş bir sınır yoktur. Buna karşın, kübik simetrlili viruslarda, örneğin; akua-birnavirüsler, balık alfavirüsleri ve betanodavirüslerde genom sınırlandırılmıştır. Negatif polariteli viruslarda, genom uzunluğunca gen ekspresyonunun azalma eğiliminde olmasından dolayı, genomun 3' ucundan 5' ucuna (ilk genin ekspresyonu bol miktarlarda yapılırken, en son gen en az miktarda yapılır) gen ekspresyonunun derecesi, gen düzeni içerisinde hareket pozisyonu ile kontrol edilebilir. Bu nedenle negatif polariteli virus genomlarına yabancı gen yerleştirilmesi kolaylıkla yapılabilir (5).

#### **Kimerik Virüsler**

Rekombinant virüslerde genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyonlarını açıklamak amacıyla, hedef genlerin diğer virus genleri ile yerlerinin değiştirilmesi tercih edilmektedir. Balık rhabdovirüslerindeki farklı yüzey glikoproteinlerinin değişimi ile kimerik virüsler oluşturulmuştur. Rekombinant ISAV virüsünün izlenmesini kolaylaştırmak amacıyla, genom içerisine bir yeşil floresan protein (EGFP geni) yerleştirilerek elde edilen yeni rekombinant virusta EGFP kimerik geninin doğru şekilde transkribe edildiği hücre kültürü süpernatantından yapılan RT-PCR analizleriyle doğrulanmıştır (5,33). Kimerik virüslerin elde edilmesi, yabancı glikoproteinlerin viral partiküller içerisinde uyumlu bir şekilde organizasyonuna bağlıdır. IHNV'nin G geni VHSV ve sazanların bahar viremi virusunun (SVCV) G geni ile değiştirilerek, VHSV G geni (IHNV-Gvhsv) ve SVCV G geni (IHNV-Gsvcv)

içeren kimerik IHNV virüsleri başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Bu yeni iki rekombinant virus, hücre kültürlerinde ebeveyn IHNV kadar replikasyon kinetiğine ulaşmışlardır. Rekombinant IHNV-Gvhsv (üzerinde VHSV'nin G genini taşıyan kimerik IHN virüsü) gökkuşağı alabalıklarında ebeveyn IHNV kadar virulent bulunmuştur. SVCV gökkuşağı alabalıklarında patojen olmasına rağmen, rekombinant IHNV-Gsvcv (üzerinde SVCV'nin G genini taşıyan kimerik IHN virüsü) gökkuşağı alabalıklarında (IHNV-Gsvcv: %93, IHNV: %95) yüksek mortaliteye neden olmuştur (5). IHNV ve VHSV arasında homolog G ve N geni değiştirilerek elde edilen kimerik rIHNV'nin gökkuşağı alabalıklarında yüksek oranda virülens kazandığı saptanmıştır (10).

#### **Virülens ve Konak Seçiciliği**

Revers genetik sistemler virus genomu, virülens ve konak seçiciliği üzerine yeni bilgiler elde etmek için kuvvetli bir araçtır. IPNV'nin VP2 gen bölgesindeki aminoasit değişikliklerinin virülens etkileri, revers genetik yöntemlerle üretilen rekombinant, reassortant ve kimerik virüsler ile ortaya konulmuştur (5). Song ve arkadaşları (28) IPNV'nin hücre kültürüne adaptasyonu ve virülensindeki değişikliklerin VP2 geninin 217. ve 221. pozisyonunda bulunan iki aminoasit tarafından kontrol edildiğini göstermişlerdir. Yüksek virülensli suşlar treonin (Thr) 217 ve alanin (Ala) 221'i kodlarken, orta ve düşük virülensli suşlar prolin (Pro) 217 ve Ala221'i kodlamaktadır. Thr221 varyantları ise avirulenttirler. Virulent IPNV'nin CHSE-214 hücre hattında 10 kez pasajlanmasından sonra, VP2 geninde Ala221'in Thr221'e dönüşmesi ile attenüasyon gerçekleşmektedir. Attenüasyon öncesinde virulent ebeveyn suş yavru atlantik salmonlarda % 68 oranında mortalite oluştururken, attenüe edildikten sonra %15 oranında mortalite oluşturmuştur (17,20).

Ilık sularda yaşayan balıklar, betanodavirüslerden SJNNV ve kırmızı benekli orfoz nervöz nekrozis (RGNNV)'ye, soğuk sularda yaşayan balıklar ise Barfin pisi balığı nervöz nekrozis (BFNNV) genotipine duyarlıdır (24). Betanodavirüslerde, RNA2'nin değişebilir bölgesinin kodladığı proteininin C-terminal bölgesi, konak seçiciliğini kontrol etmektedir. SJNNV ve RGNNV'nin reassortant ve kimerik suşlarında RNA1 ve RNA2 gen bölgelerinde sıcaklık duyarlılığını kontrol eden bölgeler bulunduğu gözlemlenmiştir. SJNNV için optimum üreme sıcaklığı

20-25°C, RGNNV için ise 25-30°C'dir. RGNNV'nin RNA1 gen bölgesindeki polimeraz enzimini kodlayan (1- 445 aminoasitlik kısmı) bölgenin sıcaklık kısıtlaması ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu bölge mitokondriyal hedefleme sinyallerini kodlamakta olup, polimeraz enziminin katalitik domaininin dış tarafına yerleşmiştir (5,24). SAV'nin attenüasyonu ve hücre kültüründe sıcaklığa adaptasyonunda genomdaki mutasyonlar rol oynamaktadır. İn vivo şartlarda attenüe edilerek, 10-14°C'de üremeye adapte edilmiş olan rekombinant SAV'nin yapısal proteinlerinin aminoasit sekansları karşılaştırıldığında, altı aminoasit değişimi (üç tane E2'de, iki tane 6K'da ve bir tane E1'de) gözlemlenmiştir (5,18). İki aminoasit değişimi içeren rIHNV, alabalıklarda kümülatif olarak %10 mortalite artışına neden olmuştur. Revers genetik yöntemlerle yapılan çalışmalarla, rhabdoviruslar için öngörülen virülens faktörleri tam olarak ortaya konulamamıştır. Deniz balıklarından izole edilen VHSV izolatlarının atlantik salmon ve gökkuşuğu alabalıklarında düşük patojeniteye neden oldukları, buna karşın bazı izolatların kalkan balıklarında patojen oldukları saptanmıştır. VHSV izolatlarının sekans analizleri sonuçlarına göre, sınırlı sayıda aminoasit değişikliklerinin izolatlar arasında virülens farklılıklarına neden olduğu ortaya konulmuştur (5,19).

#### **Revers-Genetik Sistemler, Tanımlama ve Teknik Yöntemler**

**Aquabirnavirus** : İnfeksiyöz pankreatik nekrozis (IPN) genç salmonidlerin oldukça bulaşıcı, pankreas nekrozu ile karakterize mortalitesi yüksek viral bir enfeksiyonudur. IPNV *Birnaviridae* ailesinde *Aquabirnavirus* cinsi içinde yer alır. Virus zarfsız, 60 nanometre (nm) çapında ikosaedral kapsitli yapıdadır (1). Tatlı sulardaki salgınlarda mortalite oranı %100'e kadar çıkarırken, denizlerdeki salgınlarda ise %10-20 oranında mortalite oluşturmaktadır. IPNV enfeksiyonundan sonra hayatta kalan balıklar uzun süre taşıyıcı olarak kalmaktadırlar (17). IPNV genomu iki segmentli, çift iplikçik RNA molekülünden oluşmaktadır. Segment B, 2784 baz çifti (bç) uzunluğunda, 94 kilodalton (kDa) ağırlığında küçük iç polipeptit VP1 (RNA bağımlı RNA polimeraz, RdRp) proteinini kodlar. Segment A ise 3097 bç uzunluğunda olup, yapısal proteinler VP2, VP3 ve yapısal olmayan proteinler VP4 ve VP5'i kodlamaktadır (8,9,17). VP2 proteini, immun dominant epitoplara içeren dış kapsit proteinidir (8,17,23). VP3 proteini, IPNV replikas-

yon siklusunda düzenleyici görevleri olan bir iç proteindir. Segment A'da büyük open reading frame-açık okuma çerçevesi (ORF)'in yanı sıra 15 kDa ağırlığında VP5 proteinini kodlayan ikinci bir ORF daha vardır. Arjininden zengin olan VP5'in büyüklüğü, izolata göre 15 kDa'dan 3.3 kDa'ya kadar değişiklik göstermektedir. Bazı izolatlarda ise VP5 ORF'si hiç yoktur (9,20,27). Virulent IPNV suşları, 12 kDa ağırlığında VP5 proteini kodlamaktadır (28).

IPNV'nin tamamen cDNA klonundan tekrar eldesi ilk kez 1998 yılında Yao ve Vakharia tarafından yapılmıştır. Aquabirnaviruslarda hem polimeraz enziminin fonksiyonlarını öğrenmek, hem de IPNV için revers genetik sistem geliştirmek amacıyla West Buxton suşunun her iki segmentinin cDNA klonu, protein kodlamayan bölgelerde dahil olmak üzere oluşturulmuştur. Virusun kurtarılabilmesi için transkriptlerin kepenmesine ve RNA'da sentezlenen yabancı nükleotitlerin onarılmasına ihtiyaç olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, balıkların RNA virüsleriyle ilgili ilk revers genetik çalışmadır. Segment A ve B'nin sentetik pozitif polariteli RNA transkriptleri, in vitro olarak linearize edilmiş ve cDNA plazmitlerinden T7RNAP promotorun kontrolü altında chinook salmon embryo (CHSE-214) hücre hatlarında transkribe edilmiştir (Şekil 1) (29).

**Alfavirus** : Salmon alfavirusları (SAV) tarafından meydana getirilen uyku hastalığı (pankreas hastalığı, SD) atlantik salmonlarının önemli viral enfeksiyonlarından biridir. Etken, *Togaviridae* ailesinde *Alfavirus* cinsinde yer almaktadır. Hastalık pankreasta şiddetli hasar ile başlar ve bunu kalp dokusundaki patolojik bozukluklar takip eder. Son aşamada iskelet kaslarında hasarlar görülür. SAV balık dokularında ortalama 6-8 hafta süreyle persiste kalabilmektedir (13). Etken 11.9 kilobaz (kb) uzunlukta, pozitif polariteli, tek iplikçikli RNA virüsü olup, genom iki adet ORF içerir. Birinci ORF dört yapısal olmayan proteini kodlar. Bu proteinler viral genomun replikasyonu ile ilişkilidir. İkinci ORF ise 265 subgenomik mRNA'ları kodlar. Bunlar ise yapısal proteinleri, (kapsit glikoproteinleri) E3, E2, 6K/TF ve E1'i kodlar. Yeni tip konaklara adaptasyon proteinlerin değişmesi ile ilişkilidir (18).

Rekombinant alfavirusların cDNA'dan tekrar elde edilmesi hücre hatlarındaki transfeksiyona bağlıdır. SP6 T7 enzimi ile sentetik kepe yapılarak oluşturulan RNA transkriptleri, viral cDNA'dan in vitro transkripsiyon yoluyla elde edilmektedir. Viral genomun cDNA kopyasının

transfeksiyonu, RNA polimeraz II promotorunun (RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere DNA'ya bağlandığı özel bölgeler) kontrolü altında gerçekleştirilmiştir. SAV cDNA'sının 5' ucunun sonuna, kendi kendisini kesen çekiç başlı bir ribozom (ekspresyonu ve protein sentezini artıran bir primer) sekansı ilave edilmesi, SAV'ın yeniden elde edilmesinde anahtar rol oynamıştır. Bu cDNA, T7RNAP'nin kontrolü altında bluegill fry caudal trunk (BF-2) hücre hatlarında klonlanmıştır. SAV 37°C'de, vTF7-3 ise (T7RNAP ekspresyonu yapan rekombinant vak-sinia virus) 10°C'de inkübe edilerek, ilk enfeksiyon oluşturulmuş ve ortama yeterince fonksiyonel T7RNAP ekspresyonu sağlanmıştır. Balıklarda yapılan son çalışmalarda bu teknikler kullanılarak elde edilen cDNA, SAV'ın alt tiplerinden olan SAV-3'ün ekspresyonu için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (5,21).

**Betanodavirus** : Levrek balıklarında yaygın olarak görülen viral nervöz nekrozis (VNN) veya viral ensefalopati ve retinopati (VER) olarak da bilinen hastalık, merkezi sinir sistemi ve retina-da vakuoler oluşumlarla karakterizedir. Bugüne kadar hastalığın 50'den fazla balık türünde görüldüğü bildirilmiştir (24). Betanodaviruslar *Nodaviridae* ailesinde, 25-30 nm büyüklüğünde, zarfsız ve ikosahedral simetriye sahip viruslardır (31). Nodaviruslar, iki segmentli, tek iplikçikli, pozitif polariteli RNA molekülü içermektedir. RNA1 3.1 kb uzunlukta ve 110 kDa ağırlığında olup, replikasyondan sorumlu bir protein (protein A, RdRp) kodlar. RNA2 ise 1.4 kb uzunlukta ve 42 kDa ağırlıkta olup, kod proteinini kodlamaktadır. Replikasyon süresince RNA1'den alt genomik RNA3 sentezlenir. RNA3 virion içerisine paketlenmez ve yapısal olmayan protein B1 ve B2'yi kodlar (5). Nodaviruslar, RNA2'nin T4 değişebilir bölgesinin moleküler ve filogenetik analizine göre dört genotip altında tanımlanmışlardır. Bu genotipler; SJNNV, RGNNV, BFNNV ve Tiger puffer nervöz nekrozis (TPNNV)'dir. Bunlara ilave genotip olarak bir turbot (kalkan) betanodavirus türü (TNV) önerilmiştir (24).

Balık betanodavirusları için geliştirilen revers genetik sistem, snakehead fish fry tissue hücre hatlarında (E-11) transfeksiyon merkezli olarak yapılmıştır. Viral RNA1 ve RNA2'nin sentetik RNA molekülleri in vitro olarak elde edilmiştir. Her bir RNA genom transkripsiyonu, viral cDNA kopyasının, 3' ucunda kendiliğinden bölünen bir ribozom füzyonu ile modifiye edildikten sonra, T7RNAP ile sentetik kep yapılarak oluşturul-

muştur. Bu sistem stabil memeli hücre hatlarının kullanılması ve T7RNAP'nin ekspresyonu yoluyla yapılmıştır (30).

**Isavirus** : ISAV Atlantik salmon (*Salmo salar*) türü balıklarda hastalık oluşturmakta ve yaygın olarak salmon çiftliklerinde kayıplara neden olmaktadır. Etken, pleomorfik yapıda, zarflı, 45-140 nm çapında, *Orthomyxoviridae* ailesinden *Isavirus* cinsine ait bir virustur. Virusun genomu negatif polariteli, sekiz adet tek iplikçikli RNA segmentinden oluşur ve 10 tane protein kodlamaktadır (26). Segment 1, 2 ve 4'ün polimeraz enziminin alt ünitelerini kodladıkları tahmin edilmektedir. Segment 3 nükleoproteini (NP), segment 5 füzyon (F) proteinini, segment 6 hemaglutinin-esteraz (HE) proteini, segment 7 yapısal olmayan proteinleri (influenza A'nın NS1 ve NS2'sinin analogunu), segment 8 iki ORF ile transkripsiyonu kodlar. ORF1 matrix (M) proteinlerini, ORF2 M2 proteinini kodlamaktadır (12,33).

Plazmit merkezli revers genetik sistem kurmak için yeni bir promotor (ITS-1) kullanılmıştır. Öncelikle ISAV izolatları atlantik salmon kidney (ASK) hücre kültürlerine adapte edilerek, tam sekansları yapılmıştır. Sekans bilgileri dikkate alınarak primerler dizayn edilmiş ve genomun çoğaltılmasında kullanılmıştır. Promotorun, segment 6'nın HE geninin çok değişken bölgesine (HPR) yerleştirilmesi, işaretlenmiş olan rISAV izolatında EGFP geninin üretimini arttırarak sistemin kurulmasında anahtar rol oynamıştır. Salmon hücrelerinde RNPC oluşturmak amacıyla virusun segment 1'den 4'e kadar ORF'si Sitemegalovirus (CMV) ekspresyon vektörü içerisine klonlanarak, ASK hücre hatlarında, 12 plazmid (dört ekspresyon vektörü ve sekiz revers genetik pSS-URG plazmi) ile birlikte transfeke edilmiştir. Bu vektörler segment 1,2,3,4,5,6,7,8 genomunu içermekte, ilaveten segment 6 moleküler markır içermektedir. Sonuç olarak, birkaç pasajdan sonra supernatant içerisinde rekombinant replikasyon ürünleri içeren virus elde edilmiştir (33).

**Novirhabdovirus** : IHNV ve VHSV *Rhabdoviridae* ailesi içinde *Novirhabdovirus* cinsinde yer almakta olup, balıklarda yüksek mortaliteye neden olan akut sistemik hastalık etkenleridir. Bu iki hastalık Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organisation for Animal Health, OIE) tarafından ihbarı mecburi hastalıklar listesine alınmıştır. Her iki virus da zarflı, 180 nm uzunluğunda, 70 nm çapında ve mermi biçimindedir.

Genomları segmentsiz, negatif polariteli, tek iplikçikli ve 11 kb uzunlukta RNA molekülünden oluşmaktadır. Genomik RNA beş yapısal protein kodlamaktadır (5,19).

**İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis Virusu :** IHNV *Rhabdoviridae* ailesi içinde *Novirhabdovirus* cinsinde yer alan negatif polariteli bir virustur. Genom yaklaşık 11 kb uzunlukta, tek iplikçikli RNA yapısında olup, altı gen kodlamaktadır. Genom 3'-5' istikametinde (3'- N-P-M-G-NV-L -5') dizilmektedir. Bu genler, nükleokapsit proteini (N), polimeraz ilişkili fosfoprotein (P), matrix proteini (M), yüzey glikoproteini (G), eşsiz non virion protein (NV) ve virus polimeraz (L) proteinini kodlarlar. Negatif iplikçikli RNA virusların cDNA kopyasından klonlanabilmesi için, viral genomun vTF7-3 tarafından eksprese edilen T7RNAP promotörünün kontrolü altında elde edilen antijenomik RNA kopyası, viral nükleokapsit (N), fosfoprotein (P) ve polimeraz proteinlerin (L) birlikte ekspresyonu gerekmektedir (2,16). Fonksiyonel RNPC elde edilmesi için, uygun hücre hatlarında N, P ve L proteinlerini kodlayan ekspresyon plazmitleri (tam uzunlukta viral antijenom içeren plazmit) T7RNAP'nin kontrolü altında, transfekte edilmiştir. Ortama vTF7-3 ile sağlanan T7RNAP, hücrelerin enfekte olmasını sağlamıştır. Birlikte transfekte olan hücrelerde, N proteini kapsit ile çevrelenmiş, antijenomik RNA, genomik ribonükleoprotein (RNP)'nin sentezini ve replikasyonunu sağlamıştır. Genomik RNP aracılığıyla viral proteinler eksprese edilerek enfeksiyon kabiliyetine sahip yeni virionlar üretilmiştir (5,16). Thoulouze ve ark., (32), NV geni silinen ve bir reporter gen ilave edilen rekombinat IHNV izolatının canlı olduğunu, vahşi tip IHNV ile karşılaştırıldığında, in vitro ortamlarda oldukça zayıf replikasyon oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu izolatın hücre hatlarında küçük plaklar oluşturduğu ve gökkuşağı alabalıklarında yüksek seviyede attenüe olduğu gözlemlenmiştir (32).

Farklı revers genetik sistemlerin geliştirilmesinde hücrel RNA polimeraz, viral cDNA transkripsiyonunda görev üstlenmiştir. Etkili bir bölünme ve tam bir sonlanmada otokatalitik ribozomların (hammerhead ribozyme, HHRz) etkisi, ilk kez negatif iplikçikli viruslarla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Viral replikasyonu başlatmak için gerekli olan minimal viral proteinlerden nükleokapsit proteini, fosfoprotein, viral RNA polimeraz ve genomun tam uzunlukta cDNA kopyasının, destekleyen plazmitlere yerleştirilmiş ol-

ması gerekmektedir. Novirhabdoviruslarla yapılan revers genetik çalışmalarda, yardımcı vaksinia virus ve T7RNAP kullanılmayan bir sistem geliştirilmiştir. Rekombinant bir IHNV (rIHNV) üretmek için, CMV erken promotörünün (transkripsiyonda başlatıcı ve regulasyonu sağlayan bölge) kontrolü altında virulent IHNV suşunun tam uzunlukta cDNA kopyasını içeren plazmit oluşturulmuştur. Bu plazmitin transfeksiyonu yoluyla EPC hücre hatlarında hücrel RNA polimeraz II'nin kontrolü altında RNA antijenom kopyası, N, P, NV ve L proteinleri ile aynı anda eksprese edilerek enfektif virus partikülleri elde edilmiştir (2,6).

**Viral Hemorajik Septisemi Virusu :** Viral hemorajik septisemi hastalığı (VHS) birçok balık türünde görülen viral bir enfeksiyondur. Etken dünyanın farklı bölgelerinde en az 48 balık türünden izole edilmiştir (3). VHSV zarflı, segmentsiz, negatif polariteli bir RNA virusu olup, *Rhabdoviridae* ailesi içinde *Novirhabdovirus* cinsinde yer almaktadır. Viral genom beş yapısal (N, M, P, G, L) ve bir yapısal olmayan (NV) protein kodlamaktadır (10,19).

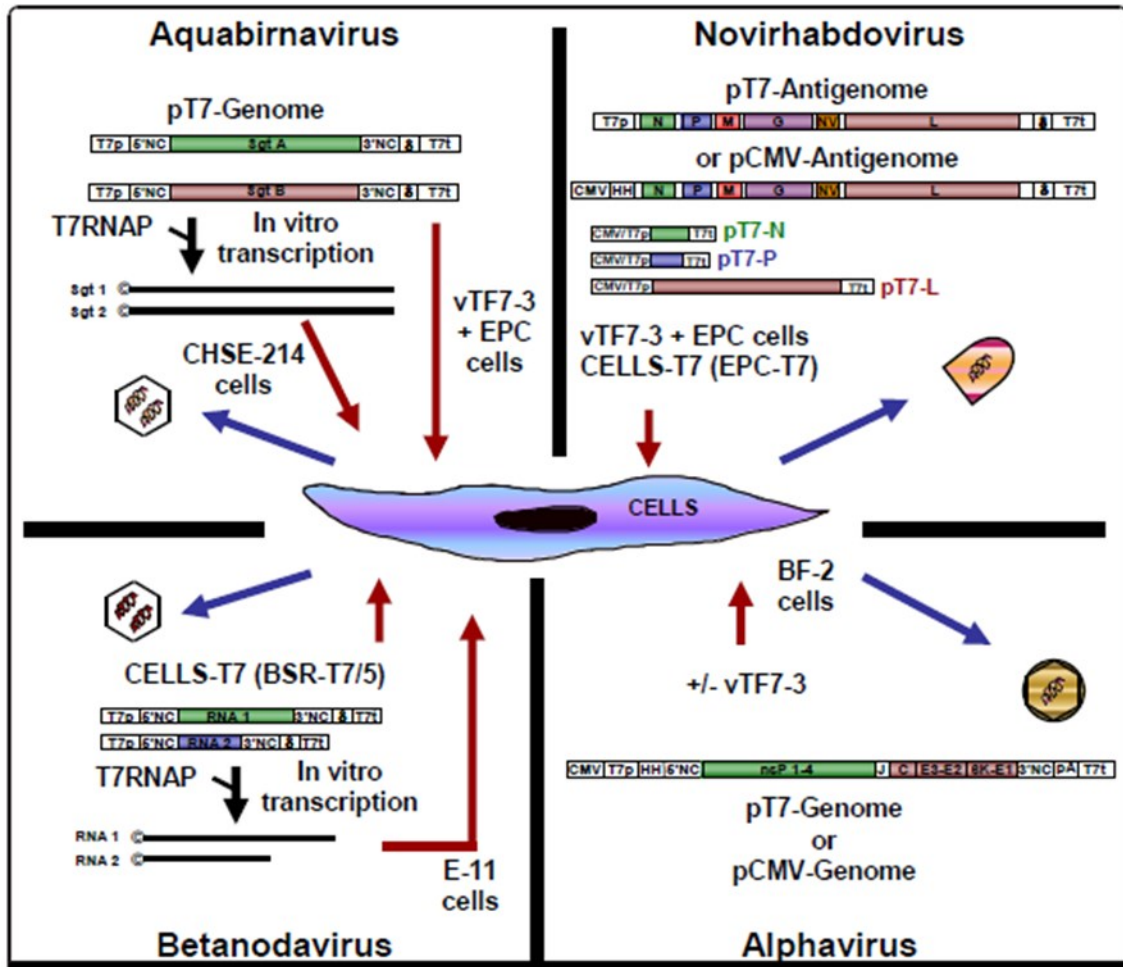
Revers genetik sistem kurmak amacıyla bir VHSV saha izolatının tam uzunlukta cDNA klonu oluşturulmuş ve CMV promotörünün kontrolü altında bir ekspresyon plazmiti içerisine yerleştirilmiştir. Bu tam uzunlukta cDNA içeren plazmitin transfeksiyonu N, P, NV ve L geni içeren destekleyici plazmitler ile birlikte epithelioma papulosum cyprini (EPC) hücre hattına transfekte edilerek, canlı VHS virusunun elde edilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada rekombinant VHSV izolatu, cDNA plazmitlerinden yardımcı bir vaksinia virus olmadan elde edilmiştir. VHSV'nin NV geninin fonksiyonlarını öğrenmek ve potansiyel VHSV vektörlerini keşfetmek için, P ve M geni arasına bir EGFP geni eklenerek rekombinant VHSV oluşturulmuştur (3,10). Bu rekombinant VHSV, plazmitlerin CMV promotörün kontrolü altında EPC hücre hattına transfekte edilmesinin ardından, viral RNA'nın antijenomik kopyası ile N, P, NV, ve L proteinleri eş zamanlı eksprese edilmesiyle oluşturulmuştur.

Rhabdovirusların genom organizasyonu, yabancı genlerin kolaylıkla genomu entegre edilmesine izin vermektedir (5). Rekombinant VHSV'nin P ve M genleri arasına yerleştirilen EGFP'nin ekspresyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olup, 10 pasajdan sonra dahi oldukça stabil bulunmuştur (3). Revers genetik yaklaşımlarla, farklı sıcaklıklarda VHSV titrelerinin değişkenli-

ğini göstermek amacıyla, 18°C'nin üzerinde üremeyen bir VHSV izolatının L geni 23°C'de de üreyebilen başka bir VHSV izolatı L geni ile değiştirilmiştir. Her iki VHSV izolatının L genlerinde 31 amino asitlik fark bulunmaktadır. Bu 31 aminoasit, VHSV izolatlarının sıcaklığa duyarlılıklarında önemli bir rol üstlenmektedir. L geni değişimiyle beraber sıcaklığa duyarlı izolat dirençli hale gelirken, dirençli izolatın duyarlı hale geldiği ortaya konulmuştur. (19).

### Sonuç

Revers genetik sistemler; virusların biyolojileri, virülensleri, konak seçiciliği, virus- konak etkileşimi ve virusun konağa girişi ile ilgili bilgilerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Bu teknolojiyle birlikte virusların genomlarına müdahale edilerek mutant viruslar, attenüe edilmiş canlı virus aşılıları, gen vektörleri, gen fonksiyonları, varolan herhangi bir virülens kalıtımının ortadan kaldırılması, bir vahşi fenotipin stabilite-



**Şekil 1.** Aquabirnavirus, Novirhabdovirus, Betanodavirus ve Alfavirus genusuna ait balık RNA viruslarının plazmit cDNA'larından elde edilmesi için kullanılan metotlar. Viral replikasyon proteinleri, tam uzunlukta viral genom veya antigenom ve genom segmentleri kopyası içeren her bir cDNA kodlayan plazmit için temsili bir şema çizilmiştir. Plazmit DNA veya in vitro transkribe olmuş RNA (kalın oklar) uygun balık hücre hatlarında (CHSE-214, E-11 ve BF-2) transfeke edilmiştir. EPC ve BF-2 veya uygun hücre hatları (CELLS-T7: balık EPC-T7 veya BSR-T7/5) vTF7-3 ile enfekte edilerek ortama sürekli T7RNAP ekspresyonu sağlanmıştır. Enfeksiyon siklusunun başlamasından sonra rekombinant viruslar (ince oklar) toplanabilir. Kısaltmalar : T7p, T7 promotor; CMV, sitomegalovirus promotor; HH, hammerhead ribozom sekansı; NC, kodlama-yapılmayan bölge; Sgt, viral genom segmenti; pA, poliadenilasyon sinyali; δ, hepatitis delta virüsünden türetilmiş ribozomun antigenomik sekansı; T7t, T7 terminator; ©, kep yapısı; T7RNAP, T7 RNA polimeraz (5).

si, takibi yapılan virusların reporter genlerinin ekspresyonlarının yapılması gibi başarılı çalışmalar ortaya konulmuştur. Revers genetik sistemlerin keşfi balıklarda patojen RNA virusları için büyük bir buluş ve saha araştırmaları için önemli bir araç olmuştur. Gelecek yıllarda revers genetik konusundaki çalışmaların artacağı ve bilim dünyası için ilgi odağı olacağı tahmin edilmektedir.

### Kaynaklar

1. Albayrak H, Özan E. Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) infeksiyöz pankreatik nekrozis ve infeksiyöz hematopoietik nekrozis virus enfeksiyonlarının varlığının araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2010; 57(2): 125-9.
2. Ammayappan A, Lapatra ES, Vakharia NV. A vaccinia-virus-free reverse genetics system for infectious hematopoietic necrosis virus. J Virol Methods 2010; 167(2): 132-9.
3. Ammayappan A, Kurath G, Thompson MT, Vakharia NV. A Reverse genetics system for the Great Lakes strain of viral hemorrhagic septicemia virus: The NV gene is required for pathogenicity. Mar Biotechnol 2011; 13 (4): 672-83.
4. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Birinci Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi, 1997; p. 422-30.
5. Biacchesi S. The reverse genetics applied to fish RNA viruses. Vet Res 2011; 42 (12): 1-14.
6. Bremont M. ed. The World of Rhabdoviruses. First Edition. Berlin: Springer-Verlag, 2005; p. 119-41.
7. Bukreyev A, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL. Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. J Virol 2006; 80 (21): 10293-306.
8. Dadar M, Peygham R, Rajabi-Memari H, Shapouri ASMR, Hasanzadeh R, Goudarzi LM, Vakharia NV. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on deduced amina acid sequences of genom segment A and B cDNA. Iran J Fish Sci 2014; 13(3): 560-75.
9. Dadar M, Memari RH, Vakharia NV, Peygham R, Shapouri ASMR, Mohammadian T, Hasanzadeh R, Ghasemi M. Protective and immunogenic effects of *Escherichia coli*-expressed infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-VP3 fusion protein in rainbow trout. Fish Shellfish Immun 2015; 47(1): 390-6.
10. Einer-Jensen K, Harmache A, Biacchesi S, Bremont M, Stegmann A, Lorenzen L. High virulence differences among phylogenetically distinct isolates of the fish rhabdovirus viral hemorrhagic septicemia virus are not explained by variability of the surface glycoprotein G or the nonvirion protein Nv. J Gen Virol 2014; 95(Pt2): 307-16.
11. Finke S, Conzelmann KK. eds. The World of Rhabdoviruses. First Edition. Berlin: Springer-Verlag, 2005; p. 165-200.
12. Garcia-Rosado E, Markussen T, Kileng O, Bækkevold ES, Robertsen B, Mjaaland S, Rimstad E. Molecular and functional characterization of two infectious salmon anaemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity. Virus Res 2008; 133 (2): 228-38.
13. Heidari Z, Tinsley J, Bickerdike R, McLoughlin FM, Zou J, Martin MAS. Antiviral and metabolic gene expression responses to viral infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Shellfish Immun 2015; 42(2): 297-305.
14. Heppell J, Davis HL. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. Adv Drug Deliv Rev 2000; 43(1): 29-43.
15. Iwamoto T, Mise K, Mori K, Arimoto M, Nakai T, Okuno T. Establishment of an infectious RNA transcription system for striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodaviruses. J Gen Virol 2001; 82(11): 2653-62.
16. Jia P, Zheng CX, Shi JX, Kan FS, Wang JJ, He QJ, Zheng W, Yu L, Lan SW, Hua YQ, Liu H, Jin YN. Determination of the complete genome sequence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) Ch20101008 and viral molecular evolution in China. Infect Genet Evol 2014; 27(1): 418-31.
17. Julin K, Mennen S, Sommer AI. Study of virulence in field isolates of infectious pancreatic necrosis virus obtained from the northern part of Norway. J Fish Dis 2013; 36(2): 89-102.
18. Karlsen M, Andersen L, Blindheim HS, Rimstad E, Nylund A. A naturally occurring substitution in the E2 protein of salmonid alphavirus subtype 3 changes viral fitness. Virus Res 2015; 196(1): 79-86.
19. Kima HS, Yusuff S, Vakharia NV, Evensen O. Interchange of L polymerase protein between two strains of viral hemorrhagic



- septicemia virus (VHSV) genotype IV alters temperature sensitivities in vitro. *Virus Res* 2015; 195(1): 203-06.
20. Lauksund S, Greiner-Tollersrud L, Chang JC, Robertsen B. Infectious pancreatic necrosis virus proteins VP2, VP3, VP4 and VP5 antagonize IFN $\alpha$ 1 promoter activation while VP1 induces IFN $\alpha$ 1. *Virus Res* 2015; 196 (1): 113-21.
  21. Moriette C, Leberre M, Lamoureux A, Lai TL, Bremont M. Recovery of a recombinant salmonid alphavirus fully attenuated and protective for rainbow trout. *J Virol* 2006; 80 (8):4088-98.
  22. Munang'andu MH, Fredriksen NB, Mutoloki S, Brudeseth B, Kuo YT, Marjara SI, Dalmo AR, Evensen O. Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine* 2012; 30(27): 4007-16.
  23. Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *J Gen Virol* 2005; 86(Pt7): 1973-78.
  24. World Organisation for Animal Health (OIE). May 2013. Viral encephalopathy and retinopathy. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Chapter 2.3.11. Erişim tarihi: 17.12. 2015. <http://www.oie.org/eng/normes/mudr/reference/biblio/20130324/201303241612484062.pdf>
  25. Plant PK, Lapatra ES. Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol* 2011; 35 (12): 1256-62.
  26. Rimstad E, Mjaaland S. Infectious salmon anaemia virus. *APMIS* 2002; 110(4): 273-82.
  27. Santi N, Song H, Vakharia NV, Evensen O. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *J Virol* 2005; 79(14): 9206-16.
  28. Song H, Santi N, Evensen O, Vakharia NV. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol* 2005; 79 (16):10289-99.
  29. Yao K, Vakharia NV. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. *J Virol* 1998; 72(11); 8913-20.
  30. Takizawa N, Adachi K, Kobayashi N. Establishment of reverse genetics system of beta-nodavirus for the efficient recovery of infectious particles. *J Virol Methods* 2008; 151(2): 271-6.
  31. Tam TP, Hoat CP, Hoa HTB, Hien TTN. Evaluation of the pathogenicity and immun response of nervous necrosis virus isolated in Vietnam. *J Agr Sci Tech* 2014; 4(1): 315-22.
  32. Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Bremont M. Essential role of the NV protein of novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol* 2004; 78(8): 4098-107.
  33. Toro-Ascuy D, Tambley C, Beltran C, Mascayano C, Sandoval N, Olivares E, Medina AR, Spencer E, Martínez SCM. Development of a reverse genetic system for infectious salmon anemia virus: rescue of recombinant fluorescent virus by using salmon internal transcribed spacer region 1 as a novel promoter. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(4): 1210-24.

#### Yazışma Adresi:

Uzm. Veteriner Hekim Yüksel DURMAZ  
Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı  
Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü  
55200 – Atakum – Samsun – TÜRKİYE  
GSM: 5455114935 fax: 0362 4370399  
E-mail : samsunfishlab@hotmail.com

