



## Virüslerin Reverz Genetiği

Hasan Abaylı

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

\*Corresponding Author's E-Mail: habayli@firat.edu.tr

### Özet

Reverz genetik, genom üzerindeki dizilerin fonksiyonlarını belirlemeye yönelik girişimlere imkan tanıyan güçlü sistemlerden oluşmaktadır. Virüslerin kolay manipüle edilebilir yapısı ve hızlı fenotipik karakter sergileme özelliği virüs reverz genetiği alanındaki gelişmeleri de beraberinde getirmiştir. Virüs reverz genetiği, özellikle dinamik yapısıyla mutasyon oluşturmaya müsait, yüksek patojenik RNA virüsleri hakkındaki bilinmezliklerin ortaya çıkarılmasında önemli görevler üstlenmektedir. Bu görevlerin başında viral patogenez ve virülens faktörlerin belirlenmesi sonrasında ise yüksek immunojenik, non-patojenik -iyi virüs- üretme girişimleri gelmektedir. Bu derlemede reverz genetik sistemler sistemleri ve mevcut gelişmeler hakkında bilgi verilmektedir.

Received 2 July 2018  
Received in revised form 2 August 2018  
Accepted 4 August 2018

### Anahtar kelimeler:

Enfeksiyöz klon, kurtarma sistemleri, reverz genetik, virüs

**Cite this article:** Abaylı H (2019) Virüslerin Reverz Genetiği. Turk Vet J, 1(2):90-100.

### Reverse Genetics of Viruses

#### Abstract

Reverse genetics are powerful systems that allow for attempts to determine the functions of sequences on genetic material. Easier manipulation of viruses and rapid phenotypic characterization have led to advances in the field of virus reverse genetics. Virus reverse genetics play an important role in the detection of obscure high pathogenic RNA viruses, which are suitable for mutation with its dynamic structure. The most important of these roles are the high immunogenic, non-pathogenic-good virus-producing interventions after viral pathogenesis and virulence factors are determined. In this review, information about reverse genetic systems and current developments is presented.

**Key words:** Infectious clone, rescue systems, reverse genetics, virus

### Giriş

Gen ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi tanımlamaya yönelik geleneksel yaklaşımlar doğal veya yapay mutantlardan biyolojik bozukluğu gösterenlerin ayırt edilerek gen düzeyinde (haritalama gibi yöntemler ile) incelenmesi üzerine kurulmuştur. *Klasik genetik* veya *forward genetik* olarak adlandırılan bu yaklaşımda başlangıç materyali mutant fenotiptir dolayısıyla elde edilecek bilginin akış yönü fenotipten genotipe doğru olmaktadır. Klasik genetikte olduğu gibi rastgele ortaya çıkmış bir mutant üzerinde çalışarak o geni veya şifrelediği proteini bulmak yerine, çalışmaya ilgilenilen fakat işlevi bilinmeyen, klonlanmış bir genle başlanabilmekte ve bu geni bozma girişiminde bulunarak genin işlevi analiz edilmeye çalışılmaktadır. Geleneksel araştırma yönünün tersine yapılan (genden > fenotipe) ve başlangıç materyali gen olan bu yaklaşıma *reverz genetik* (ters genetik) adı verilmektedir (Sortle ve

ark., 1981, Temizkan G, 2013, Griffiths ve ark., 2004, Jason, 2009).

Viroloji alanında reverz genetik, ilgili tüm viral dizilerin cDNA'lar şeklinde klonlanması, modifikasyonu ve kültür ortamında ya da organizma üzerinde fonksiyonlarının incelenmesi manasında kullanılmaktadır. Değiştirilen dizilerle birlikte sil baştan üretilen enfeksiyöz virüsün kültür ortamından izole edilmesi veya kurtarılmasına ithafen bazı araştırmacılar reverz genetik terimi yerine, *kurtarma sistemi* (rescue system-recovery system) terimini kullanmayı tercih etmektedir (Neumann ve ark., 2002).

Virüslerin nispeten küçük genoma sahip olmaları ve hücre içerisinde kısa sürede çoğalabilmelerinden dolayı ilgili gen fenotipi hızla belirlenebilmektedir. Reverz genetiğin gelişmesi özellikle viroloji alanında devrim yaratmıştır. Virüs atenuasyonu, konak özgülüğünün

değiştirilmesi, replikasyon defektli virüslerin üretimi, yeni aşı stratejilerinin geliştirilmesi, viral gen ve dizilerin fonksiyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sola ve ark., 2003).

DNA genomuna sahip virüsler, tam uzunlukta DNA klonları oluşturularak homolog rekombinasyon teknolojileri ile genetik olarak değiştirilenlerin ilkinin teşkil etmektedir. Modifiye edilmiş DNA genomundan üretilen ilk rekombinant soy SV40 virüsüdür (Goff & Berg, 1976). Birçok DNA virüsü gibi SV40'nin genomu da ökaryotik promotörler içerdiğinden tek başına infeksiyözdür. Konak hücrenin replikasyon ve transkripsiyon mekanizmasını kullanarak çekirdekte transkribe ve replike olmaktadır (Barbanti-Brodano ve ark., 1970, Buchman ve ark., 1981). DNA virüslerin genomları klonlama veya direk olarak manipülasyon için oldukça büyüktür, bu virüsler için homolog rekombinasyon yaklaşımı daha uygundur. Herpes, pox ve adenovirüslerde uygulanan bu yaklaşımda viral dizilerle çevrili rekombinant DNA, vahşi tip virüse ait tam viral DNA ile birlikte hücreye aktarılmaktadır (transfeksiyon). Vahşi tip ve rekombinant virüs karışımında rekombinant virüs ortamdan kurtarılmaktadır (Jones & Shenk, 1978, Mackett ve ark., 1982, Post & Roizman, 1981).

RNA virüs reverz genetiğin geçmişi 1978'lere dayanmaktadır. Tam uzunluktaki Qbeta bakteriyofaj genomunun cDNA biçiminde plazmide aktararak E.coli'ye transforme edilmesi sonrasında plak oluşumu gözlenmiştir (Taniguchi ve ark., 1978). Racaniello ve Baltimore (1981), viral RNA genomunu cDNA yapısında plazmide klonlayarak hücre kültür ortamında poliovirüsü üretmeyi başarmıştır. Sonraki yıllarda T3 veya T7 RNA polimeraz sistemi kullanılarak birçok (+) ssRNA virüse (alfavirüs, picornavirüs, flavivirüs) ait sentetik RNA transkriptleri sentezlenmiş ve bu transkriptlerin hücreye aktarımı ile virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Boyer & Haenni, 1994).

Negatif anlamlı RNA virüs genomları hücre transkripsiyon ve translasyon mekanizması tarafından tanınmamaktadır (Friedman ve ark., 1981). Dolayısıyla bu virüsler ihtiyaç duydukları yapıları virion içerisinde RNP kompleks (RNA, NP ve replikasyon proteinleri) biçiminde bulundurarak pozitif anlamlı virüslerden farklı bir strateji geliştirmişlerdir. Bu kompleks negatif anlamlı virüslerin minimal replikasyon ünitesini teşkil etmektedir (Conzelman, 1998, Bridgen & Eliot, 1996). Bu biyolojik gereksinimlerden dolayı reverz genetik sistemleri (-) RNA virüslerine daha geç uyarlanabilmiştir. Klonlanmış cDNA'dan tümüyle

kurtarılan ilk segmentsiz (-) RNA virüsü kuduz virüsü (1994) olurken ilk segmentli (-) RNA virüsü ise Bunyamwera virüs (3 segmentli) (1996) olmuştur. Ardından birnavirüs ve influenza gibi birçok virüse benzer sistemler uygulanmış ve enfeksiyöz virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Mundt & Vakharia, 1996, Fodor ve ark., 1999, Neuman ve ark., 1999, Schnell ve ark., 1994, Collins ve ark., 1995).

### **Rekombinant Enfeksiyöz Virüs Üretimi**

**T7 Polimeraz sistemi/Stoplazmada Transkripsiyon:** Pozitif anlamlı RNA virüsleri konak hücrenin translasyon mekanizması tarafından tanınması dolayısıyla kendi proteinlerini hücrede sentezleterek replike olabilmektedir (Neumann ve ark., 2002). Viral mRNA'ların hücreye transfeksiyonu bu virüslerin kurtarılması için yeterli olsa da viral genomun genetik olarak manipüle edilebilmesi için vRNA'nın cDNA klonuna dönüştürülmesi gerekmektedir. cDNA'dan vRNA'ları ve proteinleri üretmek için viral dizilerin ya hücre içerisinde mevcut olması ya da bir promotör kontrolünde plazmide klonlanarak hücreye transfeksiyonu gerekmektedir (Bayou, 2017). RNA virüs reverz genetik çalışmalarında en sık kullanılan transkripsiyon sistemi viral RNA'nın sitoplazmik transkripsiyonuna izin veren T7 RNA polimeraz aracılı sistemlerdir. Hücre ortamında T7 RNA polimeraz, transfekte edilen plazmidten veya polimeraz proteini eksprese eden yardımcı virüslerden temin edilebilmektedir (Racaniello & Baltimore, 1981, Boyer & Haenni, 1994, Palese ve ark., 1996). Vaccinia virüse dayalı yardımcı virüs sistemi (vTF7-3) çok etkili transkripsiyon verimliliğine sahiptir. Ancak hücrelerde sitopatik etkiler oluşturarak kurtarma verimliliğini düşürebilmektedir. Ayrıca enfekte hücrelere cytosine beta arabinoside (Ara-C) ve/veya rifampicin antiviral bileşenlerin ilavesiyle vaccinia virüs replikasyonu kontrol altında tutulmalıdır (Elroy-Stein & Moss, 1989). T7 RNA polimeraz eksprese eden kalıcı hücre hatlarının üretimi ile bu sorun ortadan kalkmıştır (Radecke ve ark., 1995, Buchholz ve ark., 1999). SARS coronavirüs gibi büyük genoma sahip RNA virüslerde rekombinant virüs üretimi için kullanılan ek bir platform bakteriyel yapay kromozom (BAC)'dur. Bu yapılar, büyük DNA/RNA fragmentlerin eklenmesine izin veren T7 promotörlü, E. Coli'den türetilen tek kopyalı F plazmidleridir. BAC yapıları DNA virüslerin kurtarılmasında uzun süredir kullanılmaktadır. Bu yapıların genetik dayanıklılığı RNA virüslerde de kullanımına yol açmıştır (Almazan ve ark., 2013, DeDiego ve ark., 2007, Balint ve ark., 2012). Bütün pozitif anlamlı RNA virüsleri tek genom

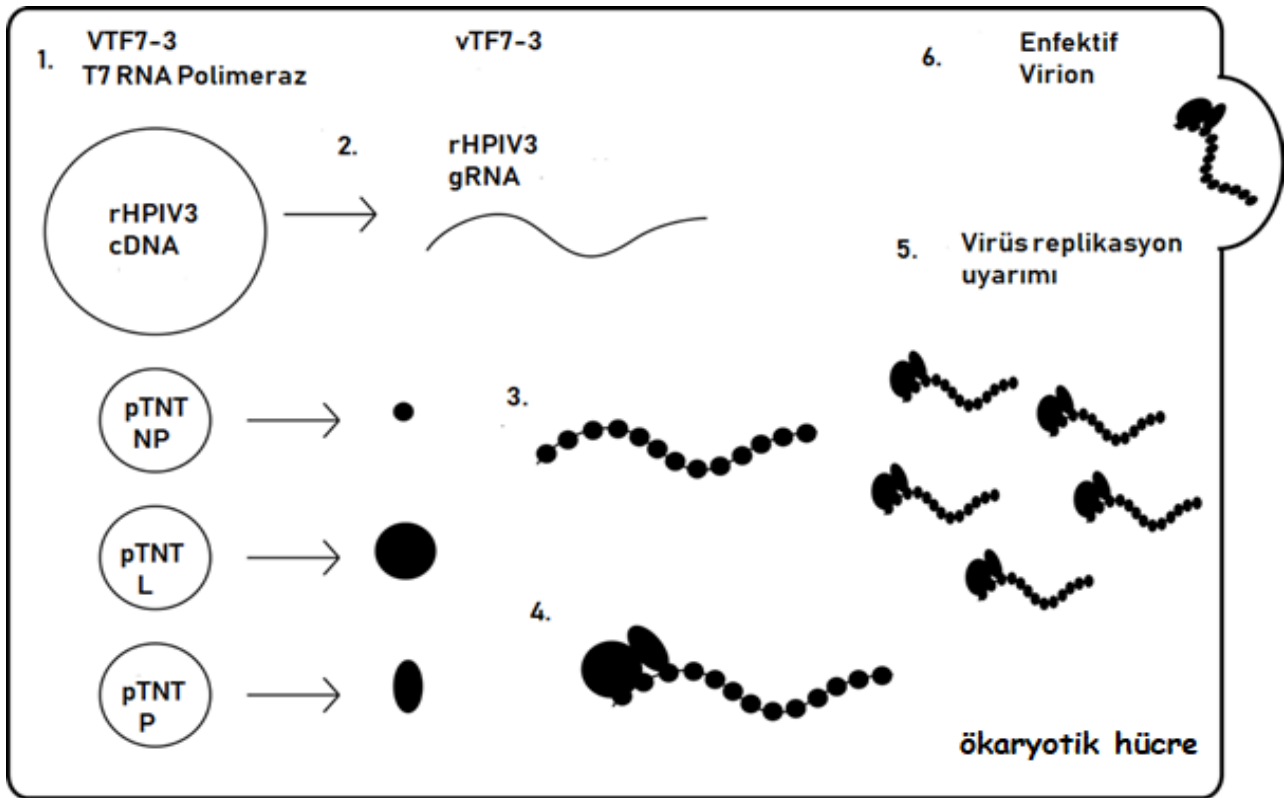
segmentinden oluşur ve viral RNA hem genom replikasyonuna şablon görevi görür hem de mRNA olarak görev yapmaktadır. Bu sebeple uygun hücrel veya viral promotör kontrolü altındaki viral cDNA'yı içeren tek bir plazmid pozitif anlamlı RNA virüsleri reverz genetiği için yeterlidir (Pushko ve ark., 2016, Stobart & Moore, 2014).

Negatif anlamlı viral RNA genomuna ait genetik kodları taşıyan cDNA klonlarından virüsün kurtarılması tek başına mümkün değildir. Bu virüslere ait reverz genetik sistemleri genellikle viral RNA polimerazın tanıyabileceği yardımcı yapıların ve genomik replikasyonu başlatmak için diğer esansiyel proteinlerin kullanımını gerektirmektedir (Bucholz ve ark., 1993, Friedman ve ark., 1981, Storey ve ark., 1984). İlk kurtarma sistemleri, T7 polimeraz ile yapay üretilen vRNA'nın pürifiye RNP kompleks proteinleri ile in vitro bir araya getirilerek kompleksin oluşturulması ve vahşi tip virüsle enfekte hücelere transfeksiyonuyla gerçekleştirmişlerdir. Buna rağmen başarılı sonuçlar alınarak yapay RNP kompleksini içeren rekombinant virüs üretimi oluşturabilmişlerdir (Luytjes ve ark., 1989). Pattnaik ve Wertz (1991) VSV viral proteinlerin tamamını ekspresyon plazmidlerinden sağladığı bir minireplikon sistemini kurmayı başarmıştır. Bunun için 4 veya 5 plazmidin kotransfeksiyonuna gereksinim duyulmaktadır. Bu plazmidlerden biri (-)vRNA'yı kodlayan antigenomik (+)cDNA'nın 5' ucuna T7 polimeraz promotör dizisi, 3' ucuna da ribozim dizisinin eklenmesiyle oluşturulmuştur. Görevli diğer plazmidler viral replikasyon proteinlerin ekspresyonu için gereklidir. Bu plazmidlerin T7 polimeraz üreten hücelere kotransfeksiyonu ribonükleoprotein kompleks oluşumu ve sonrasında enfeksiyöz virüsün kurtarılması ile sonuçlanmaktadır. Farklı yaklaşımlarla edinilen deneyimler RNA bağımlı RNA polimeraz (L), nükleoprotein (N) ve fosfoprotein (P) rhabdovirus ve paramyxovirüs (pneumovirinae için ek olarak M2-1) genom replikasyonları için yeterli olduğunu göstermiştir. Filoviridae ailesindeki Marburg virus için L, NP ve VP35 (fosfoproteine eşdeğer) minimal replikasyon ünitesini oluştururken (Mühlberger ve ark., 1998), Ebola virüste ise bunlara ilaveten VP30 proteinine ihtiyaç duyulmaktadır (Mühlberger ve ark., 1999). Aksine bünyavirüs veya arenavirüslerde ise transkripsiyon ve replikasyon için L ve NP yeterlidir (Dunn ve ark., 1995, Lee ve ark., 2000). T7 polimeraz sistemi sitoplazmada transkribe olan HeV, NiV, MeV, SeV, RabV, Ebola, Marburg, Newcastle, HPIV-3 (Şekil-1), RSV, VSV, LCMV gibi (-)RNA virüslerini kurtarmak için sıkça tercih edilmektedir. Daha iyi sonuç

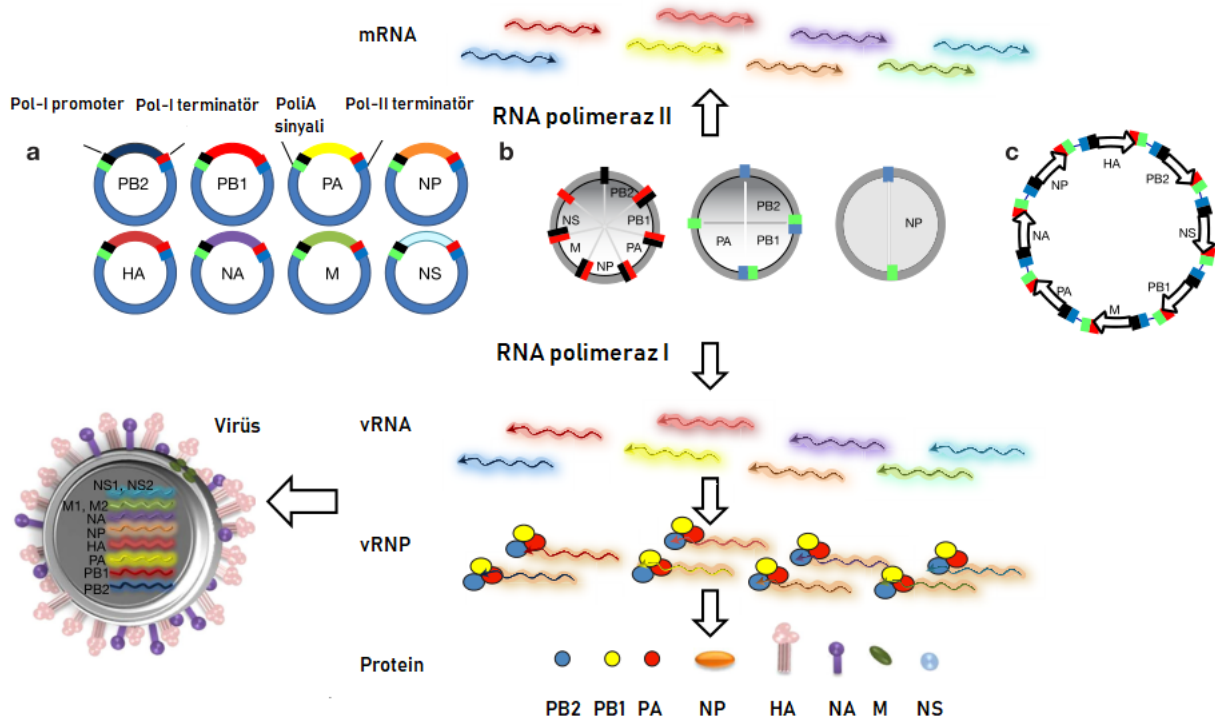
alındığı için elde edilen cDNA'ların antigenom oryantasyonu ile plazmide yerleştirilmesi şeklinde sistem modifiye edilmiştir (Schnell ve ark., 1994). Eğer T7 polimeraz sistemi çekirdek lokalizasyon sinyalleri ile kombine edilirse çekirdekte replike olan influenza virüslerin kurtarılması da mümkün olabilmektedir (de Wit ve ark., 2007). Polimeraz-I (Pol-I) enzimine dayalı sistemlerin aksine T7 polimeraz sistemlerin dezavantajı elde edilen transkriptlerin 5' ve 3' uçlarına virüste bulunmayan GGG kalıntısının eklenmesidir. Bu kalıntılar etkili şekilde ribonükleoprotein kompleksi oluşumuna müdahalede etmektedir. Dolayısıyla transkripsiyon esnasında eklenen nonviral nükleotitlerin otokatalitik ribozimlerle kesimine ihtiyaç duyulmuştur. Le Mercier ve ark (2002) çekiç baş ribozim kullanarak tam 5' uç oluşturmada başarılı olmuştur. Ayrıca tam 3' uç üretmek için HDV ribozim eklentisi kullanılmış ve 100 kat daha etkili kurtarma sağlanmıştır.

**Pol-I ve Pol-II sistemi/Çekirdekte Transkripsiyon:** RNA polimeraz I enzimi (Pol-I), 5' cap ve 3' poliA yapılarından yoksun ribozomal RNA'yı sentezlemekle görevli çekirdekçi enzimidir (Hoffmann ve ark., 2000). Pol-I dayalı virüs kurtarma sistemleri Uukuniemi, Influenza, Thogoto, Borna disease, kızamık ve Ebola virüslerine başarılı şekilde uygulanmış olsa da çekirdekte replike olan RNA virüsleri için daha çok uygunluk göstermektedir. Influenza virüs ve bornavirüsler hücre çekirdeğinde çoğalmaktadır. Influenza virüsler transkripsiyonel faaliyet için viral genomik RNA, NP ve viral RNA polimerazdan (PB1, PB2 ve PA) ibaret fonksiyonel olarak aktif viral RNP kompleksine ihtiyaç duymaktadır (Lamb & Krug, 2001, de la Torre, 2001). İlk influenza virüs kurtarma girişimleri in vitro bir araya getirilen tek bir RNP kompleksinin yardımcı influenza virüsle enfekte hücreye transfekte edilmesine dayanmaktadır (Luytjes ve ark., 1989). İkinci bir uygulama olarak yardımcı virüsle enfekte hücelerde tek influenza virüs segmentine ait vRNA kodlayan cDNA'nın pol I promotör ve terminatör dizileri arasına yerleştirilerek hücreye transfekte edilmesi ile başarılıdır. Ancak bu sistemlerde enfektif rekombinant virüslerin ortamdan izolasyonu zordur ve antikör aracılı kısıtlama, ısı duyarlılığı veya ilaç direnci gibi güçlü seleksiyon sistemlerine ihtiyaç vardır (Barclay & Palese., 1995, Enami ve ark., 1991, Castrucci & Kawaoka, 1995, Neumann & Kawaoka, 2004).

RNA polimeraz II (Pol-II) enzimi, mRNA'nın ve küçük çekirdek RNA'larının transkripsiyonundan sorumlu esas ökaryotik hücre transkriptazıdır. Influenza virüs kurtarma



**Şekil 1.** Segmentsiz negatif anlamlı HPIV3 RNA virüsünün T7 RNA polimeraz sistemi ile kurtarılması. **1)** T7 polimeraz ekspres eden vaccinia virüs vTF7-3 ile hücrelerin enfekte edilmesi. **2)** T7 RNA polimeraz promotör kontrolü altında genomik RNA'yı sentezleyen plazmidin NP, L ve P proteini ekspres eden plazmidlerle kotransfeksiyonu. **3)** gRNA'nın NP ile kapsitlenmesi **4)** RNP kompleks oluşumu. **5)** Viral replikasyonun uyarımı ve **6)** enfektif virionun oluşumu (Jason, 2009)



**Şekil 2.** Sekiz, üç ve tek plazmidten oluşan influenzavirüs reverz genetik sistemleri. **a)** Sekiz plazmid içeren reverz genetik sistemi. Sekiz viral segmentten birini kodlayan cDNA insan pol-I promotörü ile fare pol-I terminatörü arasına yerleştirilmiştir. Pol-I kaseti daha sonra hCMV pol-II promotörü ve poliadenilasyon sinyaline tutturulmuştur. **b)** Üç plazmid içeren reverz genetik sistemi. Plazmidlerden biri sekiz viral segmentin tamamının cDNA'sını içermekte ve Pol-I promotör ve terminatör dizilere yerleştirilmiştir. Diğer plazmid PB2, PB1 ve PA kodlayan cDNA'ların mRNA'ya transkripsiyonun sağlayan pol-II kasetinden oluşmaktadır. Üçüncü plazmid ise NP'nin pol-II transkripsiyon ünitesini taşımaktadır. **c)** Tek plazmid sistemi. Tek bir ekspresyon plazmidine sekiz viral segment için sekiz pol-II kasetinden oluşmaktadır (Ye ve ark., 2014)

sistemlerinde RNA pol II sitomegalovirüs promotörlerinden viral mRNA transkripsiyonunu başlatmak için faydalanılmaktadır (Hoffmann ve ark., 2000).

Influenza A virüsün tümüyle klonlanmış cDNA'dan kurtarma girişiminde, her bir segmente ait vRNA'ları kodlayacak cDNA'nın Pol-I promotör ve terminatör dizileri içeren plazmide aktarılması gerekmektedir. İlâveten NP ve üç polimeraz alt ünitesine (PB1, PB2 ve PA) ait mRNA'ları üretmek için de cDNA yapısındaki genetik kodların Pol-II promotör ve poliA dizileri taşıyan plazmidlere aktarılması gerekmektedir. Böylece toplamda 12 plazmide gereksinim duyulmaktadır (Neumann ve ark., 1999).

Hoffmann ve ark (2000) influenza A segmentlerini çift yönlü olarak (ambisens) transkripsiyon üniteleri içerisine klonlayarak yenilikçi bir yaklaşım geliştirmiştir. RNA Pol-I ve Pol-II sisteminin aynı plazmide yer aldığı bu sistem RNA Pol-I/II olarak tanımlanmakta ve RNA pol-I sisteminin modifiye edilmiş halini temsil etmektedir. Influenzavirüs viral RNA'ları kodlayan cDNA'lar 5' uçtaki RNA polimeraz I promotörü ile 3' uçtaki polimeraz I terminatörü arasında negatif oryantasyonla, RNA polimeraz II promotörü ile poliadenilasyon bölgesi arasında pozitif oryantasyonla klonlanmıştır. İki transkripsiyon ünitesinin oryantasyonu tek cDNA şablonundan RNA pol-I enzimi ile negatif anlamlı vRNA sentezine, RNA pol-II enzimi ile pozitif anlamlı mRNA üretimine izin vermektedir. Bu yaklaşım ile 12 olan plazmid ihtiyacı 8'e düşmüştür. Plazmid sayısının azalması yüksek seviyede transfeksiyon etkinliği için daha elverişli olmuştur. Son olarak, 8 viral RNA'nın tek bir plazmidden kodlanması gibi farklı yaklaşımlar denenmiş ve transfekte hücrelerde enfeksiyöz virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2) (Neumann ve ark., 2005, Zhang ve ark., 2009).

Özellikle segmentli genoma sahip virüslerde birden fazla klonun aynı hücreye transfekte edilmesi gerekmektedir. Ancak bu, daha iyi transfeksiyon ajanı (nontoksik) ve transfekte edilebilir hücre hattı kullanımıyla mümkün olabilmektedir. Bazı araştırmacılar, yüksek seviyede rekombinant virüs üretimini yüksek etkinlik gösteren elektroporasyon yöntemiyle karşılamıştır (Surman ve ark., 2007). Nucleofector™, primer ve embriyonik hücrelerin çekirdeğine direk olarak DNA ve RNA aktarımını sağlayabilmektedir (www.lonza.com). HEK 293 gibi hücre hatları yüksek transfeksiyon etkinliğine sahiptir. Hücre hattı seçimi transfeksiyon etkinliği yanı sıra virüsün çoğalma göstermesiyle de yakından ilişkilidir.

## Virülens Genlerin Belirlenmesi ve Aşı Üretimi

Geçmişteki yüksek başarıya rağmen inaktivasyon ya da pasajlama ile (forward genetik) atenüasyon gibi geleneksel yaklaşımlar, rasyonel hedefli mutasyonlardan (reverz genetik) elde edilen aşı adaylarından daha az etkili olabilmektedir (Stobart & Moore, 2014).

Reverz genetik, viral genler üzerinde hedeflenen değişikliklerin yapılmasına ve değişen genlerle birlikte virüsün kurtarılmasına imkan tanımaktadır. En önemlisi de RNA virüslerinde bu değişikliklerin başarılı olabilmiş olmasıdır. Gen veya viral diziler üzerinde değişiklikler yapılarak o genin fonksiyonu araştırılabilmektedir (Sola ve ark., 2003). Paramyxovirüslerde aksesuar proteinlerin interferon karşıtı aktiviteye sahip olduğu ve patojenitede önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Aksesuar proteinleri kodlayan genlerin susturulması pratik bir yöntemdir ve bu proteinlerin eksikliğinde de virüs yüksek seviyede çoğalmaya devam etmektedir (Goodbourn ve ark., 2000, Gotoh ve ark., 2002, Poole ve ark., 2002, Child ve ark., 2007, Andrejeva ve ark., 2004). Rekombinant Newcastle virüsün aksesuar proteinlerden V proteini düşük seviyede eksprese etmesi immunojenik ve düşük patojeniteli aşı adayının ortaya çıkmasını sağlamıştır (Mebatsion ve ark., 2001). Benzer şekilde V geni içermeyen HPIV2 ve C geni içermeyen HPIV-1'in in vivo ortamda önemli şekilde atenüe olduğu görülmüştür (Bartlett ve ark., 2008, Schaap-Nutt ve ark., 2010). T7 polimeraz dayalı reverz genetik sistemleri ile üretilen HeV ve NiV'ün patojenite çalışmalarında aksesuar V, W veya C geni eksikliğinde replikasyonun devam ettiği, baskılanmaları durumunda ise virüsün atenüe hale geçtiği görülmüştür (Yoneda ve ark., 2010, Andrejeva ve ark., 2004). T7 ve Pol-I dayalı reverz genetik sistemiyle üretilen rekombinant EBOV'e ait VP24, VP35, NP ve G proteinin patojenitede önemli rol aldığı ortaya konmuştur (Halfmann ve ark., 2008, Halfmann ve ark., 2009, Ebihara ve ark., 2006).

Isıya duyarlı mutasyonlar oluşturularak virüs atenüasyonun sağlanması aşı üretiminde farklı bir yöntemdir. İnterferon karşıtı NS geni çıkarılmış ve ısıya duyarlı mutasyonlarla atenüe edilmiş rekombinant respiratorik sinsityal virüs (RSV) iyi bir aşı adayı olarak karşımıza çıkmaktadır (Luongo ve ark., 2013, Bossert ve ark., 2003).

Atenüe aşuların hazırlanmasında mevcut bir başka yaklaşım kodon deoptimizasyonudur. Bu yaklaşımda gen üzerinde türe özgü olarak sık bulunan kodonlar daha az varlık gösteren kodonlarla değiştirilmektedir. Vahşi tip ile aynı amino asit dizisinin sentezlenmesi, immün

yanıtın değişmemesi, atenüasyon kaybının mümkün olmaması ve diğer atenüasyon metodları ile kombine edilebilmesi gibi bazı avantajları mevcuttur. Bu yöntemle poliovirüs aşısı hazırlanmış ve atenüasyon farelerde ispat edilmiştir (Burns ve ark., 2006, Mueller ve ark., 2006).

Negatif anlamlı segmentsiz virüslerde 5' uca yakın genler daha az transkripsiyona uğramakta ve bu genlerden protein sentezi daha düşük miktarda yapılmaktadır. Dolayısıyla bir genin farklı bir bölgeye taşınması protein ekspresyon seviyesini değiştirerek viral replikasyonu ve virülensi azaltabilmektedir. Ör: VSV N geninin genomdaki ilk pozisyonundan aşağı akış (downstream) yönünde kaydırılması ile rekombinant VSV'nin in vitro çoğalmasının ve patojenitesinin azaldığı bildirilmiştir. Benzer bir uygulama kuduz P protein geni için denenmiş ve başarılı olunmuştur. Bu mutantlarda genlerin tekrar yer değiştirme ihtimali bulunmadığından çok istikrarlı atenüasyon fenotipi oluşturmaktadır (Flanagan ve ark., 2001, 2003, Wertz ve ark., 1998).

Reverz genetik sistemlerin kullanımına yönelik bir diğer yaklaşım replikasyon defektli virüslerin üretilmesidir. Bu virüslerin replikasyonu engelleyici bir veya birkaç geni çıkarılmakta ve eksik genler stabil hücre hatlarından karşılanmaktadır. BSL-4 seviyesinde çalışma gerektiren EBOV gibi yüksek patojenik virüslerin daha düşük güvenlik seviyesinde çalışmasına izin vermektedir. Replikasyon defektli virüsler kültür ortamında çoğalma gösterirken in vivo çoğalma göstermezler böylece aşı adayı olarak görev görebilmektedir. Yapılan çalışmalarda transkripsiyon için esansiyel VP30 geni çıkarılmış replikasyon kusurlu EBOV fare ve kobaylarda koruyucu yanıt ortaya koymuştur. EBOV çalışmaları da VP30 proteini eksprese eden kalıcı transfekte hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. (Halfmann ve ark., 2008, Mühlberger ve ark., 1998, Mühlberger ve ark., 1999, Watt ve ark., 2014, Wengenrath ve ark., 2010) Yine T7 polimeraz dayalı reverz genetik sistemlerinde M ve P geni bulunmayan kuduz virüsü üretilmiştir. Bu genlerin yerine G geni iki kez kodlanmıştır. İnsan dışındaki primatlarda nötralizan antikor yanıt uyaran bu virüs laboratuvar ortamında M ve P proteini eksprese eden hücre hatlarında çoğaltılmaktadır. Bu tür aşılar reversiyon riski söz konusu değildir (Cenna ve ark., 2009).

Influenza virüsün konak hücreye tutunmasında terminal sialik asitle etkileşen ve füzyonla RNP'lerin salınımını sağlayan HA glikoproteini reverz genetik çalışmaları ile

iyi karakterize edilmiş virülens faktörlerinden biridir (Wiley & Skehel, 1987, Han ve ark., 2001). Etkili bir füzyon için HA'nın HA1 ve HA2 alt üniteye bölünmüş olması gerekmektedir (Bertram ve ark., 2010). Viral replikasyon için önem arz eden bu işlem konak hücresi tarafından üretilen enzimlerle sağlanmaktadır. İnsan mevsimsel gripi ve düşük patojeniteli kanatlı gripi virüslerinde bölünme tekli arjinin kalıntısında meydana gelmektedir (Bertram ve ark., 2010, Böttcher ve ark., 2006). Bu sebeple bu virüsler bu bazik kalıntıyı tanıyan enzimin bulunduğu konak dokularında sınırlı olarak kalmaktadır (Bertram ve ark., 2010, Zhirnov ve ark., 2002) Yüksek virülensli alt tiplerin HA proteininde birden fazla bazik aminoasit kalıntıları ve bölünme bölgeleri bulunmuştur (Horimoto ve ark., 1995, Senne ve ark., 1996). H5N2'deki bu bölgelerin tavuklardaki viral patogeneze etkisi reverz genetik ile çalışılmıştır. Bu çalışmada HA proteininde bazik aminoasit kalıntı sayısının dörtten daha fazla olduğu virüslerde letalitenin arttığı ve virüsün nöronlarla beyine ve kan ile sistemik organlara yayıldığı görülmüştür (Hatta ve ark., 2001, Schrauwen ve ark., 2012, Suguitan ve ark., 2012) İnfluenza virüsler mevsimsel aşı uygulamasını gerektirmektedir ve uygun formülasyonun belirlenmesi, gelişimi ve uygulanması biraz zaman almaktadır. Reverse genetik teknolojisindeki yeni gelişmeler, kurtarma ve üretime ayrılan zamanı aylardan haftalara düşürmektedir. Dormitzer ve ark. (2013), 5 gün gibi kısa süre içerisinde reverse genetik teknolojisi ile yeni HA ve NA dizilerinden rekombinant influenzavirüs üretmeyi başarmıştır. Bu teknoloji canlı influenza aşı adaylarının üretiminde kullanılan reassortant virüslerin oluşturulmasında da kullanılabilir. Böylece donör tohum virüsün (A/Ann Arbor/6/60 (H2N2)) 6 gen segmentini içeren ve mevsimsel gribe ait HA ve NA yüzey proteinlerini içeren aşılar hızla hazırlanabilmektedir.

Influenza A virüs viral NS1 proteinlerin eksilmesi veya silinmesi ile tamamı atenüe edilebilmektedir. Bu rekombinant influenza virüslerin fare, at, domuz, kuş ve makaklarda burun içi aşılama sonrasında koruyucu immün yanıt önemli bir biçimde uyarabilmektedir. Bu nedenle harika bir aşı adayı olarak nitelendirilmektedir. Influenza B virüsü için de aynı denemeler sonrasında benzer sonuçlar alınmıştır (Steel ve ark., 2009, Richt & Garcia-Sastre, 2009).

Kanatlı influenza virüs alt tiplerinden H5N1 ve H9N2 pandemik potansiyele sahiptir. Fakat H5N1 inaktif aşıları edinsel yanıt sınırlı şekilde ortaya çıkmakta ve canlı aşılar ise sirküle H5N1 ile aşı suşu arasındaki

reassortment ihtimali endişe yaratmaktadır (Perez ve ark., 2003, Perez & Garcia-Sastre, 2013). Bu endişeleri ortadan kaldırmak için H5N1 ve H9N2'ye karşı bivalent canlı influenza aşısı viral genom düzenlemesi yapılarak üretilmiştir. Bu amaçla çekirdek transfer proteini (NEP) H9N2 virüsün NS viral segmentinden çıkarılmış ve PB1'in sonuna eklenmiştir. H9N2'nin çıkarılan NEP geni lokasyonuna ise H5N1 virüsün HA geni yerleştirilmiştir. H5N1 virüs HA geni taşıyan yeniden düzenlenmiş H9N2 virüsü H5N1 çelincine karşı tam koruma sağlamıştır. Son olarak modifiye M ve/veya NS segmentlerini içeren rekombinant influenza A H1N1 virüsü üretimi gerçekleştirilmiştir (Pena ve ark., 2013).

Influenza virüs HA geni antijenik drift ve shifte oldukça duyarlıdır. Bu üniversal bir aşı geliştirme durumunu olumsuz etkilemektedir. İnfluenza virüs M2 proteine karşı birçok türde koruyucu yanıt ortaya çıkmıştır. Bu protein ile üniversal bir aşı hedeflenebilmektedir (Nogales ve ark., 2016).

Umut vaat eden bir diğer yaklaşım vahşi tip virüse morfolojik olarak benzerlik gösteren yüksek immunojeniteli virüs benzeri partiküllerin (VLP) hazırlanmasıdır. VLP'ler viral genom içermediklerinden dolayı güvenli olduğu ve güçlü edinsel yanıtı ortaya çıkardığı kabul edilmektedir. VLP'lerin üretiminde influenza virüsler için tek başına HA ve NA proteini yeterli olmasına rağmen yaygın olarak HA, NA ve M1'in ekspresyonu ile oluşturulmaktadır (Treanor ve ark., 2007, Chen ve ark., 2007). Pushko ve ark. (2011) pandemik alt tip VLP (H5N1, H7N2 ve H2N3) ve mevsimsel VLP'nin (H1N1, H3N2 ve B) ferretlerde nötralizan antikor üretimini uyardığı ve çelince karşı koruma sağladığını göstermiştir.

### **Rapörtör Gen İle Viral Döngü Ve Patogenezin Daha İyi Anlaşılması**

Reverz genetik çalışmalarında kullanılan rapörtör genler lusiferaz, chloramphenicol acetyl transferase (CAT) ve ultrviole ışık altında floresan ışığa yapan green fluorescent protein (GFP)'dir. Viral genomların modüler yapısı, rapörtör genlerin aktarımını kolaylaştırarak virüs reverz genetiğindeki ilerlemelere hız kazandırmıştır. Raportör genlerle desteklenmiş minigenom deneyleri, tüm virüs kurtarma girişimi öncesinde sistemin durumu hakkında araştırmacıya bilgi vermektedir (Fearn & Collins, 1999, Gouillard ve ark., 2006).

Rapörtör genlerin viral genlerle aynı oryantasyonda klonlanması ve translyondan önce transkripsiyona uğramaları gerekmektedir. Lusiferaz veya CAT gibi nicel rapörtör genlerin tercih edilmesi halinde

replikasyon proteinlerini kodlayan plazmidlerin miktarı ve oranları optimize edilebilmektedir. Eğer GFP gibi nitel rapörtör gen tercih edilirse transfekte veya enfekte hücreleri görselleştirmek mümkün hale gelmektedir. Rapörtör genler ile rekombinant virüsün organizmadaki dağılımı, moleküler ve hücresele seviyedeki tropizmi, patogenezi, immun yanıtı kontrol eden hücresele proteinlerle etkileşimi değerlendirilebilmektedir. Transkripsiyon başlama-durma sinyallerini içeren genler arası bölgelerin fonksiyon ve karakteristikleri, promotör bölge yapıları ve ek nükleotitlerin promotör faaliyetini daha yüksek seviyeye çıkarıp çıkarmadığını veya bunların replikasyona üzerindeki etkileri rapörtör genler ile ortaya çıkarılabilmektedir. Ayrıca genomun replikasyonu, transkripsiyonu, kapsidasyonu ve virion morfogenezi için gerekli trans-acting protein ve cis-acting yapıların yerleşim ve sınırları da rapörtör genler yardımıyla belirlenebilmektedir (Bridgen & Elliott, 1996, Jackson ve ark., 2011, Stobart & Moore, 2014, Kelly & Strick, 2000, Wickersham ve ark., 2013).

### **Antiviral Uygulamalar**

Viral replikasyonun ölçümü antivirallerin in vitro taraması açısından önem arz etmektedir. Luciferaz veya asetil transferazlar gibi rapörtör gen taşıyan tam uzunluktaki klon sistemleri veya yaşam döngü modellemeleri replikasyonun ölçümü ve potansiyel antivirallerin belirlenmesine izin vermektedir. Laboratuvar ortamında test edilen ve viral çoğalmayı durduran antiviraller viral enfeksiyonların tedavisi adına umut vaat edici olmuştur (Jason, 2009, Pegoraro & Bavari, 2012). Gen terapisi ve viral hastalıkların tedavisi noktasında başvuru uygulamalardan bir diğeri hücrede hedef bölgelere yönelik interferens RNA'ların (RNAi) sentezletilmesidir. Doğal hücre savunmasının taklit edildiği bu uygulamada hedef genlerin transkripsiyonu esnasında oluşan mRNA'lar ile tasarlanan komplementer RNA'ların dsRNA oluşturması beklenmektedir. Böylece mRNA yapıları ribozomlara ulaşamayacak ve hücresele dicer molekül kompleksleri ile 22 nükleotitlik parçalara dilimlenerek etkisiz hale getirilecektir. İnfluenza virüse karşı profilaktik etki amacıyla enfeksiyondan önce veya enfeksiyonun erken döneminde interfere RNA'ların yeterli konsantrasyonda inhalasyon yoluyla verilerek enfeksiyon bertaraf edilebilme yetisine sahip olduğu görülmüştür. Benzer sonucun Hepatitis C virüsü ile enfekte olmuş hastalara interfere RNA'ların transfekte edilmesi sonucunda ulaşıldığı bildirilmektedir. Ebola virus ve hepatit B virüs çalışılan diğeri virüsler arasındadır (Tan & Yin, 2004, Levanova & Poranen, 2018).

Sonuç olarak reverz genetik, tıbbi ve ekonomik açıdan önemli virüsleri incelemek için kullanılabilecek güvenilir bir laboratuvar yöntemi haline gelmiştir. Virüs yaşam döngüsü, virüsün kurgulanması, viral proteinlerin patojenlikteki rolü ve viral proteinlerin konakçı hücre immün yanıt bileşenleri ile etkileşimi için güçlü bir araç sağlamaktadır. Reverz genetik sisteminin geliştirilmesi RNA ve DNA virüs genomunda tasarlanmış mutasyon oluşturma, nükleotit dizisi ekleme ve çıkarma uygulamalarını mümkün kılarak viroloji alanında devrim yaratmıştır. Bu sistem virüs atenuasyonu, konak özgülüğünün değiştirilmesi ve replikasyon defektli virüslerin üretiminde, nükleotit dizilerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek patojenik virüslerin daha düşük güvenlik seviyesinde çalışmasına izin veren defektif, florasan veya lüminesen rapörtör genleri barındıran rekombinant formları antiviral ajanların veya nötralizan antikorların test edilmesine imkan tanımaktadır. Tek döngülü virüsler antiviral ve NA'ların belirlenmesinde vahşi virüslerin yerini tutan harika bir alternatiftir. Ayrıca güvenli, immunojenik ve koruyucu aşı ve/veya aşı vektörleri için harika bir seçenek sunmaktadır. Günümüzde, reverz genetik, viral genomları manipüle ederek bilinmezliklerin ortaya çıkarılması veya *-iyi virüs-* üretiminde rutin olarak kullanılmaktadır. Gelecekte virüs evrimi ile ortaya çıkacak yeni, yüksek patojenik ajanların irdelenmesi ve bu ajanlara yönelik koruyucu tedbirlerin hızla alınmasında reverz genetikçilere büyük sorumluluklar düşmektedir.

## Kaynaklar

**Almazan F, DeDiego ML, Sola I, Zuniga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, Andres G, Enjuanes L (2013)** Engineering a replication-competent, propagation-defective middle east respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* 4:e00650–e00613. <https://doi.org/10.1128/mBio.00650-13>.

**Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE (2004)** The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17264–17269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407639101>.

**Balint A, Farsang A, Zadori Z, Hornyak A, Dencso L, Almazan F, Enjuanes L, Belak S (2012)** Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol* 86:6258–6267. <https://doi.org/10.1128/JVI.00189-12>.

**Barbanti-Brodano G, Swetly P, Koprowski H (1970)** Early events in the infection of permissive cells with simian virus 40: adsorption, penetration, and uncoating. *J Virol* 6:78-86.

**Barclay WS, Palese P (1995)** Influenza B viruses with site-specific mutations introduced into the HA gene. *J Virol* 69:1275-1279.

**Bartlett EJ, Cruz, AM, Esker J, Castano A, Schomacker H, Surman SR, Hennessey M, Boonyaratanakornkit J, Pickles RJ, Collins PL, Murhpy BR, Schmidt AC (2008)** Human parainfluenza virus type 1C proteins are nonessential proteins that inhibit the host interferon and apoptotic responses and are required for efficient replication in nonhuman primates. *J Virol* 82:8965–8977. <https://doi.org/10.1128/JVI.00853-08>.

**Bayou K. (2017)** Current techniques and applications of reverse genetics: an overview. *International Journal of Genetics* 7:31-37. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijg.2017.31.37>.

**Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Köhl A, Pöhlmann S (2010)** Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev Med Virol* 20:298-310. <https://doi.org/10.1002/rmv.657>.

**Bossert B, Marozin S, Conzelmann KK (2003)** Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 77:8661-8668. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8661-8668.2003>.

**Boyer JC, Haenni AL (1994)** Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198:415–426. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1053>

**Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. (2006)** Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80:9896-9898. <https://dx.doi.org/10.1128%2FJVI.01118-06>

**Bridgen A, Elliott R M (1996)** Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15400–15404. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15400>.

**Buchholz CJ, Spohner D, Drillien R, Neubert WJ, Homann HE (1993)** The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly. *J Virol* 67:5803-5812. [https://doi.org/0022-538X/93/105803-10\\$02.00/0](https://doi.org/0022-538X/93/105803-10$02.00/0)

**Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK (1999)** Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73:251–259.

**Buchman AR, Burnett L, Berg P (1981)** DNA tumor viruses. In: Weiss RA, Teich NM, Varmus HF, Coffin JM. (eds) *The Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, New York, pp 799-841.

**Burns CC, Shaw J, Campagnoli R, Jorba J, Vincent A, Quay J, Kew O (2006)** Modulation of poliovirus replicative fitness in hela cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *J Virol* 80:3259–3272. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3259-3272.2006>

**Castrucci MR, Kawaoka Y (1995)** Reverse genetics system for generation of an influenza A virus mutant containing a deletion of the carboxyl-terminal residue of M2 protein. *J Virol* 69:2725-2728.

**Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, Marx PA, McGettigan JP (2009)** Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis* 200:1251-1260. <https://dx.doi.org/10.1086%2F605949>.

**Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA (2007)** Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* 81:7111–7123. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-07>.



- Childs K, Stock N, Ross C, Andrejeva J, Hilton L, Skinner M, Randall R, Goodbourn S (2007)** mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology* 359:190-200. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.023>.
- Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR (1995)** Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11563-11567. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11563>.
- Conzelmann KK (1998)** Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 32:123-162. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.123>.
- de la Torre JC (2001)** Bornaviridae. In: DM Knipe, PM Howley (eds) *Fields Virology*, 4th edn. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1669-1678.
- de Wit E, Spronken MI, Vervaet G, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA (2007)** A reverse-genetics system for Influenza A virus using T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* 88:1281-1287. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82452-0>.
- DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L (2007)** A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* 81:1701-1713. <https://doi.org/10.1128/JVI.01467-06>.
- Dormitzer PR, Suphaphiphat P, Gibson DG, Wentworth DE, Stockwell TB, Algire MA, Alperovich N, Barro M, Brown DM, Craig S, Dattilo BM, Denisova EA, De Souza I, Eickmann M, Dugan VG, Ferrari A, Gomila RC, Han L, Judge C, Mane S, Matrosovich M, Merryman C, Palladino G, Palmer GA, Spencer T, Strecker T, Trusheim H, Uhlendorff J, Wen Y, Yee AC, Zaveri J, Zhou B, Becker S, Donabedian A, Mason PW, Glass JI, Rappuoli R, Venter JC (2013)** Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Sci Transl Med* 5:185ra68. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006368>.
- Dunn EF, Pritlove DC, Jin H, Elliott RM (1995)** Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology* 211:133-143. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1386>.
- Ebihara H, Takada A, Kobasa D, Jones S, Neumann G, Theriault S, Bray M, Feldmann H, Kawaoka Y (2006)** Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog* 2:e73. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020073>.
- Elroy-Stein O, Moss, B (1990)** Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6743-6747.
- Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P (1991)** An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185:291-298. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90776-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90776-8).
- Fearn R, Collins PL (1999)** Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73:5852-5864.
- Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Kittel C, Sereinig S, Katinger H, Egorov A (2004)** Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* 78:13037-13045. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.13037-13045.2004>.
- Flanagan EB, Schoeb TR, Wertz GW (2003)** Vesicular stomatitis viruses with rearranged genomes have altered invasiveness and neuropathogenesis in mice. *J Virol* 77:5740-5748. <https://doi.org/10.1128%2FJVI.77.10.5740-5748.2003>.
- Flanagan EB, Zamparo JM, Ball LA, Rodriguez LL, Wertz GW (2001)** Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol* 75:6107-6114. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6107-6114.2001>.
- Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A (1999)** Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *Journal of Virology* 73:9679-9682.
- Friedman H, Macarak EJ, MacGregor RR, Wolfe J, Kefalides NA (1981)** Virus infection of endothelial cells. *J Infect Dis* 143:266-273. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.2.266>.
- Gauliard N, Billecocq A, Flick R, Bouloy M (2006)** Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis. *Virology* 351:170-179. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.018>.
- Goff SP and Berg P (1976)** Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9:695-705.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000)** Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81:2341-2364. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2341>.
- Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J (2002)** Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Rev Med Virol* 12:337-357. <https://doi.org/10.1002/rmv.357>.
- Griffiths JFA, Wessler SR, Levontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT, Miller JH (2004)** Introduction to Genetic Analysis. Freeman, W. H. & Company, Los Angeles.
- Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, Hatta Y, Watanabe S, Suresh M, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y (2009)** Replication deficient ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol* 83:3810-3815. <https://doi.org/10.1128/JVI.00074-09>.
- Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y (2008)** Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1129-1133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708057105>.
- Han X, Bushweller JH, Cafiso DS, Tamm LK (2001)** Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol* 8:715-720. <https://doi.org/10.1038/90434>.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001)** Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1840-1842. <https://doi.org/10.1126/science.1062882>.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG (2000)** A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6108-6113. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>.
- Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, Webster RG (1995)** Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213:223-230. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1562>.
- Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS (2011)** Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J Gen Virol* 92:1-17. <https://doi.org/10.1099/vir.0.026187-0>.

- Jason PR** (2009) The Use of Reverse genetics to clone and rescue infectious, recombinant human parainfluenza type 3 viruses. All Graduate Theses and Dissertations. 467.
- Jones N, Shenk T** (1978) Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. *Cell* 13:181-188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90275-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90275-7).
- Kelly RM, Strick PL** (2000) Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci Methods* 103:63-71. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00296-X).
- Lamb RA, Krug RM** (2001) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (eds) *Fields Virology*, 4th edn. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1487-1531.
- Le Mercier P, Jacob Y, Tanner K, Tordo N** (2002) A novel expression cassette of lyssa virus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. *J Virol* 76:2024-2027. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.4.2024-2027.2002>.
- Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de la Torre JC** (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74:3470-3477. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3470-3477.2000>.
- Levanova A, Poranen MM** (2018) RNA Interference as a Prospective Tool for the Control of Human Viral Infections. *Front Microbiol* 9:2151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02151>.
- Luong C, Winter CC, Collins PL, Buchholz UJ** (2013) Respiratory syncytial virus modified by deletions of the NS2 gene and amino acid S1313 of the L polymerase protein is a temperature-sensitive, live-attenuated vaccine candidate that is phenotypically stable at physiological temperature. *J Virol* 87:1985-1996. <https://doi.org/10.1128/JVI.02769-12>.
- Luytjes W, Krystal M, Enami M, Pavin JD, Palese P** (1989) Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59:1107-1113. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90766-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90766-6).
- Mackett M, Smith GL, Moss B** (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7415-7419. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7415>.
- Mebatsion T, Verstegen S, De Vaan LTC, Römer-Oberdörfer A, Schrier CC** (2001) A Recombinant Newcastle Disease Virus with Low-Level V Protein Expression Is Immunogenic and Lacks Pathogenicity for Chicken Embryos. *J Virol* 75:420-428. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.1.420-428.2001>.
- Mueller S, Papamichail D, Coleman JR, Skiena S, Wimmer E** (2006) Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J Virol* 80:9687-9696. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.00738-06>.
- Mundt E, Vakharia VN** (1996) Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11131-11136. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11131>.
- Mühlberger E, Lötfering B, Klenk HD, Becker S** (1998) Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol* 72:8756-8764.
- Mühlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk HD, Becker S** (1999) Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems. *J Virol* 73:2333-2342.
- Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y** (2005) An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16825-16829. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505587102>.
- Neumann G, Kawaoka Y** (2004) Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:43-60.
- Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y** (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9345-9350. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9345>.
- Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y** (2002) A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA-what have we learned? *J Gen Virol* 83:2635-2662. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2635>.
- Nogales A, DeDiego ML, Topham DJ, Martinez-Sobrido L** (2016) Rearrangement of influenza virus spliced segments for the development of live-attenuated vaccines. *J Virol* 90:6291-6302. <https://doi.org/10.1128/JVI.00410-16>.
- Palese P, Zheng H, Engelhardt OG, Pleschka S, Garcia-Sastre A** (1996) Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11354-11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11354>.
- Pattnaik AK, Wertz GW** (1990) Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral protein from vectors containing cloned cDNAs. *J Virol* 64:2948-2957.
- Pegoraro G, Bavari S, Panchal RG** (2012) Shedding light on filovirus infection with high-content imaging. *Viruses* 4:1354-1371. <https://doi.org/10.3390/v4081354>.
- Pena L, Sutton T, Chockalingam A, Kumar S, Angel M, Shao H, Chen H, Li W, Perez DR** (2013) Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. *J Virol* 87:5118-5127. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.02490-12>.
- Perez DR, Garcia-Sastre A** (2013) H5N1, a wealth of knowledge to improve pandemic preparedness. *Virus Res* 178:1-2. <https://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.001>.
- Perez DR, Lim W, Seiler JP, Yi G, Peiris M, Shortridge KF, Webster RG** (2003) Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: Molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J Virol* 77:3148-3156. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3148-3156.2003>.
- Poole E, He B, Lamb RA, Randall RE, Goodbourn S** (2002) The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology* 303:33-46. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1737>.
- Post LE, Roizman B** (1981). A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25:227-232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90247-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90247-6).
- Pushko P, Lukashevich IS, Weaver SC, Tretyakova I** (2016) DNA-launched live-attenuated vaccines for biodefense applications. *Expert Rev Vaccines* 15:1223-1234. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1175943>.

**Pushko P, Pearce MB, Ahmad A, Tretyakova I, Smith G, Belser JA, Tumpey TM (2011)** Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes. *Vaccine* 29:5911–5918. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.068>

**Racaniello VR, Baltimore D (1981)** Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4887–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.4887>.

**Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA (1995)** Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14:5773–5784. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00266.x>.

**Richt JA, Garcia-Sastre A (2009)** Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 333:177–195. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_9).

**Schaap-Nutt A, D'Angelo C, Scull MA, Amaro-Carambot E, Nishio M, Pickles JP, Collins PL, Murphy BR, Schmidt AC (2010)** Human parainfluenza virus type 2V protein inhibits interferon production and signaling and is required for replication in non-human primates. *Virology* 397:285–298. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.018>.

**Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK (1994)** Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 13:4195–4203.

**Schrauwen EJ, Herfst S, Leijten LM, van Run P, Bestebroer TM, Linster M, Bodewes R, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T, van Riel D (2012)** The multibasic cleavage site in H5N1 virus is critical for systemic spread along the olfactory and hematogenous routes in ferrets. *J Virol* 86:3975–3984. <https://doi.org/10.1128/JVI.06828-11>.

**Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Süs J, Lipkind M, Kida H, Webster RG (1996)** Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 40:425–437. <http://dx.doi.org/10.2307/1592241>.

**Shortle D, DiMaio D, Nathans D. Directed Mutagenesis (1981)** *Annu Rev Genet* 15:265–294. Doi: 10.1146/annurev.ge.15.120181.001405.

**Sola I, Alonso S, Zúñiga S, Balasch M, Plana-durán J, Enjuanes L (2003)** Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J Virol* 77: 4357–4369. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.7.4357-4369.2003>.

**Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solorzano A, Albrecht R, Perez DR, Garcia-Sastre A, Palese P (2009)** Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol* 83:1742–1753. <https://doi.org/10.1128/JVI.01920-08>.

**Stobart CC, Moore ML (2014)** RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses* 6:2531–2550. <https://doi.org/10.3390/v6072531>.

**Storey D, Dimock K, Kang CY (1984).** Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3. *J Virol* 52:761–766.

**Suguitan AL, Matsuoka Y, Lau YF, Santos CP, Vogel L, Cheng LI, Orandle M, Subbarao K (2012)** The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. *J Virol* 86:2706–2714. <https://doi.org/10.1128/JVI.05546-11>.

**Tan FL, Yin JQ (2004)** RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Res* 14:460–466. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290248>.

**Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C (1978)** QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 274:223–228. <http://dx.doi.org/10.1038/274223a0>.

**Temizkan G.** Moleküler Genetik (2013) Nobel, İstanbul.

**Treanor JJ, Schiff GM, Hayden FG, Brady RC, Hay CM, Meyer AL, Holden-Wiltse J, Liang H, Gilbert A, Cox M (2007)** Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: A randomized controlled trial. *JAMA* 297:1577–1582. <https://doi.org/10.1001/jama.297.14.1577>.

**Watt A, Moukambi F, Banadyga L, Banadyga L, Groseth A, Callison J, Herwig A, Ebihara H, Feldmann H, Hoenen T (2014)** A novel lifecycle modeling system for Ebola virus shows a genome length-dependent role of VP24 on virus infectivity. *J Virol* 88:10511–10524. <https://doi.org/10.1128/JVI.01272-14>.

**Wenigenrath J, Kolesnikova L, Hoenen T, Mittler E, Becker S (2010)** Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus. *J Gen Virol* 91:1325–34. <https://doi.org/10.1099/vir.0.018226-0>.

**Wertz GW, Perepelitsa VP, Ball LA (1998)** Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3501–3506. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3501>.

**Whelan SP, Barr JN, Wertz GW (2004)** Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:61–119. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5_3).

**Wickersham IR, Sullivan HA, Seung HS (2013)** Axonal and subcellular labelling using modified rabies viral vectors. *Nat Commun* 4:2332. <https://doi.org/10.1038/ncomms3332>.

**Wiley DC, Skehel JJ (1987)** The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56:365–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002053>.

[www.lonza.com](http://www.lonza.com). Erişim tarihi: 01.08.2019

**Ye S, Evans JG, Stambas J (2014)** Influenza reverse genetics: dissecting immunity and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* 16:e2. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.4>.

**Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K, Georges-Courbot MC, Ikeda F, Omi M, Muto-Terao Y, Wild TF, Kai C (2010)** The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *Plos One* 5:e12709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012709>.

**Zhang X, Kong W, Ashraf S, Roy C (2009)** A one-plasmid system to generate influenza virus in cultured chicken cells for potential use in influenza vaccine. *J Virol* 83:9296–9303. <https://doi.org/10.1128/JVI.00781-09>.

**Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright PF (2002)** Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol* 76:8682–8689. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.17.8682-8689.2002>.