

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*BACILLUS THURINGIENSIS cryIVA* VE *cryIVD* GENLERİNE  
AİT PROTEİNLERİN BACULOVİRÜS EKSPRESYON  
VEKTOR SİSTEMİNDE ÜRETİLMELERİ

Biyolog Remziye NALÇACIOĞLU

78114

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

78114

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07. 08. 1998

Tezin Savunma Tarihi : 15. 09. 1998

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

*Zihni Demirbağ*

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

*A. Kadıoğlu*

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ

*Ali O. Kılıç*

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

*A. Kadıoğlu*

Trabzon 1998

TC. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANİZASYON VE ARŞİVİZASYON GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

## ÖNSÖZ

"*Bacillus thuringiensis cryIVA* ve *cryIVD* Genlerine ait Proteinlerin Baculovirüs Ekspresyon Vektör Sisteminde Üretilmeleri" konulu bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmasını bana veren ve çalışmamın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, çalışmamın büyük bir kısmında gerek teorik, gerekse uygulamalı konularda benden yardımlarını esirgemeyerek laboratuvar imkanlarından istifade etmemi sağlayan KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a ve çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. İsmail DEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmayı oldukça rahat bir ortamda gerçekleştirmemi sağlayan Biyoloji bölüm başkanı Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na ve bana yardımcı olan diğer tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Remziye NALÇACIOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2. Baculovirüs'lerin Biyolojisi.....	2
1.3. AcNPV Polihedrin Geninin Özellikleri.....	5
1.4. Baculovirüs'lerin Zirai Mücadelede Kullanılması.....	7
1.5. <i>B. thuringiensis</i> 'in Zirai Mücadelede Kullanılması .....	9
1.6. Ekspresyon ve Transfer Vektörlerinin Genel Özellikleri.....	10
1.7. Baculovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi.....	11
1.8. Baculovirüs Ekspresyon Vektör Sisteminin Avantajları.....	12
1.9. AcNPV DNA'sının Özellikleri.....	15
1.10. Baculovirüs Transfer Vektörü (pBlueBac4.5)'nin Özellikleri.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	17
2.1. Materyaller.....	17
2.1.1 Kimyasallar, Besiyerleri ve Enzimler.....	17
2.1.2. Plazmidler ve Bakteri Suşları .....	17
2.1.3. Konak Hücre ve Ekspresyon Vektörü .....	18
2.2. Yöntem.....	18
2.2.1. <i>E. coli</i> Kültürünün Üretilmesi .....	18
2.2.2. Kompetant <i>E. coli</i> Hazırlanması.....	18
2.2.3. <i>E. coli</i> 'nin Plazmid ile Transformasyonu .....	19
2.2.4. Plazmid İzolasyonu.....	19
2.2.5. Restriksiyon Endonükleazlar ile DNA'nın Kesilmesi ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	20

2.2.6.	DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması .....	20
2.2.7.	Gen Klonlanması.....	20
2.2.8.	<i>S. frugiperda</i> Konak Hücre Kültürü .....	21
2.2.9.	Konak Hücrenin Virüs DNA'sı ve Transfer Vektörü ile Transfeksiyonu .....	21
2.2.10.	Plak Deneyi .....	22
2.2.11.	Yüksek Konsantrasyonlu Virüs Stoğu Hazırlanması.....	23
2.2.12.	Virüs Konsantrasyonunun Hesaplanması .....	23
2.2.13.	Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	24
2.2.14.	SDS-PAGE Analizi.....	24
3.	BULGULAR .....	25
3.1.	<i>cryIVAD</i> Geninin Klonlanması .....	25
3.2.	Eksprasyon Vektörü ile Transfer Vektörünün <i>S. frugiperda</i> Hücrelerine Transfeksiyonu.....	30
3.3.	Plak Deneyi ile Rekombinant Virüsün Seçimi ve Saflaştırılması .....	32
3.4.	Yüksek Konsantrasyonlu Virüs Stoğu Hazırlanması.....	34
3.5.	Rekombinant Proteinlerin Üretilmesi ve SDS-PAGE Analizi ..	36
4.	TARTIŞMA.....	37
5.	SONUÇLAR.....	40
6.	ÖNERİLER.....	41
7.	KAYNAKLAR .....	42
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	48

## ÖZET

Bu çalışmada, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*'e ait insektisidal kristal proteinlerini kodlayan *cryIVA* ve *cryIVD* genlerinin baculovirüs ekspresyon vektör sisteminde ekspresyonları gerçekleştirilmiştir.

*B. thuringiensis*'in çoğu suşları spor oluşumu esnasında yüksek oranda insektisidal inklüzyonlar üretirler. Bu inklüzyonlar Diptera, Lepidoptera ve Coleoptera gruplarına ait larvalara karşı toksik özelliğe sahiptirler. Bu nedenle, *B. thuringiensis* çeşitli tarım bitkilerini zararlılardan korumak amacıyla önemli ölçüde kullanılmaktadır. Ancak, bu insektisidal inklüzyonların saf bir şekilde üretilmeleri ve bunların entegre zararlı yöntemlerinde kullanılmaları sadece zararlı olan böceklerin öldürülmeleri bakımından büyük önem taşımaktadır.

*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'e ait insektisidal kristal proteinlerini kodlayan *cryIVA* ve *cryIVD* genlerinin kodlayan DNA bölgeleri elde edilerek çoğaltıldı. Bu genleri taşıyan DNA fragmanları birlikte *Autographa californica* nükleer polihedrozis virüsü (AcNPV, Baculovirus) transfer plazmidindeki polihedrin (*polh*) promotorunun önüne klonlandı. Transfer plazmidi yabancı tip AcNPV DNA'sı ile birlikte *Spodoptera frugiperda* böcek hücre kültürüne transfekte edildi. Hücre içerisinde oluşan *cryIVA* ve *cryIVD* genlerine sahip rekombinant AcNPV "plak" yöntemiyle seçilerek saflaştırıldı. Bu genlerin kodladığı proteinlerin sentezleri poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus thuringiensis*, *cryIVA*,  
*cryIVD*, baculovirüs, gen ekspresyon

## SUMMARY

### Expression of the Combination of *cryIVA* and *cryIVD* Genes of *Bacillus thuringiensis* in Baculovirus Expression Vector System

In this study, expression of the genes encoding *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* insecticidal crystal proteins (ICPs; the combination of *cryIVA* gene and *cryIVD* gene) in baculovirus expression vector system have been carried on.

Various strains of *B. thuringiensis* produce large amount of insecticidal inclusions during sporulation. These inclusions have toxic effects on the larvae belong to Diptera, Lepidoptera and Coleoptera. For this reason, *B. thuringiensis* is utilized to protect agricultural plants from noxious insects. However, in order to kill only the harmful insects, but not harmless or beneficial insects, it is essential to produce these ICPs so pure and use them against harmful insects.

The coding sequences of *cryIVA* and *cryIVD* genes belong to *B. thuringiensis* were obtained and amplified. The DNA fragments belong to the combination of these genes were cloned into *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV, Baculovirus) transfer vector in front of *polh* promotor. The transfer vector and wild-type AcNPV were co-transfected into *Spodoptera frugiperda* insect cell culture. The recombinant AcNPV which has the coding regions of *cryIVA* and *cryIVD* genes was selected and purified by plaque assay. The production of the ICPs by recombinant viruses was detected by polyacrilamid gel electrophoresis.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis*, *cryIVA*, *cryIVD*,  
baculovirus, gene expression

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	Nükleer polihedrozis virüs'ün replikasyon şeması .....	4
Şekil 3.	<i>AcNPV</i> DNA'sı şematik gösterimi.....	15
Şekil 4.	Baculovirüs transfer vektörü (pBlueBac4.5)'nün şematik gösterimi.....	16
Şekil 5.	<i>cryIVAD</i> genlerinin pAMP18 plazmidine klonlanması.....	26
Şekil 6.	Rekombinant plazmidlerin %0.8'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	27
Şekil 7.	pRN2'nin restriksiyon analizi.....	27
Şekil 8.	<i>cryIVAD</i> fragmentlerinin baculovirüs transfer vektörüne klonlanması.....	28
Şekil 9.	Baculovirüs transfer vektörünün seçilmesi ve %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....	29
Şekil 10.	Baculovirüs transfer vektörünün agaroz jel analizi.....	30
Şekil 11.	<i>cryIVAD</i> fragmentlerinin baculovirüs ekspresyonu vektörüne klonlanması.....	31
Şekil 12.	Rekombinant virüslerin oluşturduğu plakların görünüşleri.....	33
Şekil 13.	Rekombinant <i>AcNPV</i> virüs ile enfekte olmuş Sf-9 hücreleri.....	35
Şekil 14.	Rekombinant proteinlerin SDS-PAGE Analizi.....	36

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Çeşitli baculovirüslerin etkili olduğu konaklar ve kullanım bölgeleri .....	8
Tablo 2. Türkiye'de <i>B. thuringiensis</i> 'in uygulandığı zararlılar.....	10
Tablo 3 . Baculovirüs'deki translasyon sonrası değişiklikler.....	13





## SEMBOLLER DİZİNİ

<i>AcNPV</i>	: <i>Autographa californica</i> nüklear polihedrozis virüs
BEVS	: Baculovirüs ekspresyon vektör sistemi
<i>BmNPV</i>	: <i>Bombyx mori</i> nüklear polihedroziz virüs
BSA	: Bovine serum albumin
EDTA	: Etilen diamintetraasetik asit
ETL	: Erken-geç
FBS	: Fetal bovine serum
GV	: Granulozis virüs
ICP	: İnsektisidal kristal protein
LB	: Luria bertani besiyeri
MOI	: Hücre başına enfeksiyon yapabilen virüs sayısı
NPV	: Nüklear polihedrozis virüs
ORF	: Açık okuma zinciri (Protein kodlayabilen DNA gen bölgesi)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
pfu	: Plak oluşturan ünite
PIB	: Polihedral inklüzyon yapı
<i>polh</i>	: Polihedrin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
<i>S.f.</i>	: <i>Spodoptera frugiperda</i>
<del>TNM-FH</del>	: <del><i>Trichoplosia ni</i> medium by Frenk Hink</del>
TSS	: Transformasyon saklama solusyonu
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1 Giriş

Moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir model olan, zirai mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılan ve son zamanlarda virüs DNA'sından önemli proteinlerin üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak ifade edilen baculovirüsler biyoteknolojide yeni bir çağ açmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalarda, özellikle baculovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS)'nin kullanılması sayesinde yeryüzünde baş gösteren ve insanlığı olumsuz yönde etkileyen birçok hastalığa karşı üretilen özel ve etkili proteinlerle, ilaç hammaddesi eksikliklerinin giderilmesinde ve çeşitli organizmalara ait genlerin karakterizasyonunda önemli mesafeler alınmıştır.

Baculovirüsler, genomlarının prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan küçük olmaları, gen yapı ve organizasyonları bakımından bu organizmaların genomlarına kısmen benzerlik göstermelerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadırlar (1). Ayrıca, zirai mücadelede zararlı böceklere karşı iyi bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadırlar. Öte yandan, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik (2), ökaryotik (3), viral (4) ve fungal (5) genlere ait proteinlerin BEVS'nde üretilmelerinin mümkün olması bakımından bu virüsler, biyoteknolojide büyük öneme sahiptirler. İlaç, toksin ve besin maddesi gibi çeşitli ürünleri kodlayan genler, özellikle hücre kültüründe baculovirüsler için hayati önemi olmayan viral genler yerine klonlanarak, bu genlere ait proteinler fazla miktarda üretilmektedir (6).

Bu çalışmada da bir klonlama ardından ekspresyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Klonlanan genler *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*' den elde edilmiştir. *B. thuringiensis*'in çoğu suşları spor oluşumu esnasında geniş miktarda insektisidal inklüzyon protein (ICP)'ler üretmektedirler. Bu proteinlerin çoğunun Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera larvalarına karşı toksik olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *B. thuringiensis* suşlarının zararlı böceklere karşı mücadelede pest kontrol ajanı olarak kullanılması ilgi çekici bir hale gelmiştir. Ancak, *B. thuringiensis*, konak seçiciliğinin fazla olmamasından, ultraviyole (UV) ışık

gibi faktörlerden dolayı ICP'lerin kararsız olması nedeniyle çok sık ve fazla miktarlarda kullanılmak zorundadır. Bu problemi çözmek amacıyla düşünülen en önemli yöntemler *B. thuringiensis* endotoksinlerini (*cry* gen ürünlerini) üretebilen transgenik mikroorganizma veya bitkilerin geliştirilmesidir (2).

Bu çalışmada, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*' in *cryIVA* ve *cryIVD* genlerine ait ICP'ler böcek hücre kültüründe bir rekombinant baculovirüs tarafından üretildi. Bunun için, *B. thuringiensis cryIVAD* genlerine ait DNA fragmentleri baculovirüs transfer plazmidinin polihedrin (*polh*) geni önüne klonlandı. Yabani tip baculovirüs (*Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs, AcNPV) ile rekombinasyon sağlayabilecek transfer plazmidi *Spodoptera frugiperda* böcek hücrelerine birlikte transfekte edildi. *cryIVAD* genlerine ait protein, rekombinant AcNPV'nin *polh* geni promotörü kontrolünde *S. frugiperda* hücre kültüründe üretildi.

## 1.2. Baculovirüs'lerin Biyolojisi

Baculovirüs'ler (Baculoviridae) çift zincirli DNA virüsleri olup, ilk olarak böceklerde bulunmuşlardır (7). Konakları sadece arthropodlar ile sınırlı olduğundan insanlar için herhangi bir risk teşkil etmezler (8).

Baculovirüs'ler, 25 X 250 nm büyüklükte, 90-200 kilobaz çifti (kbp), dairesel, iki ucu kapalı, çift zincirli, süpersarmal DNA ihtiva ederler. Virüs DNA'sı hücre zarı benzeri ve karmaşık bir yapıya sahip olan bir zarf tarafından çevrili olan nükleokapsid içerisine paketlenmiştir (9).

Baculovirüs'ler polihedrin proteininin meydana getirdiği matriks içine gömülü olup olmamalarına göre iki grupta incelenirler. Gömülü virüsler, polihedrin proteininden meydana gelen, polihedral inklüzyon yapı (PIB) olarak adlandırılan matriks içerisine gömülüdürler. Bunlar gömülü oldukları inklüzyon yapının şekline göre, nüklear polihedrozis virüs (NPV: sekizgen yapıya gömülü; AcNPV) ve granulozis virüs (GV: oval yapıya gömülü; *Trichoplusia ni* GV) diye ikiye ayrılırlar. Bunlardan NPV'lerde kendi aralarında zarf içerisinde tek kapsid bulunduranlar tek-nükleokapsid nüklear polihedrozis virüs (S-NPV; *Bombyx mori* S-NPV), zarf içerisinde birden fazla kapsid bulunduranlar ise multi-nükleokapsid nüklear polihedrozis virüs (M-NPV; AcNPV) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Gömülü olmayan virüsler (NOVs; *Oryctes rhinoceros* NOV) ise herhangi bir yapı içerisine gömülü değildirler (7).

Gömülü virüslerin ekspresyonda yaygın olarak kullanılan iki üyesi *AcNPV* ve *BmNPV* dür (7).

*AcNPV* ve *BmNPV* ile oluşturulan sistemler için temel teknoloji birbirine benzerdir, fakat *AcNPV* hücre kültürü çalışmaları için daha fazla avantajlara sahiptir. *BmNPV* ise larva içinde ekspresyon için tercih edilir.

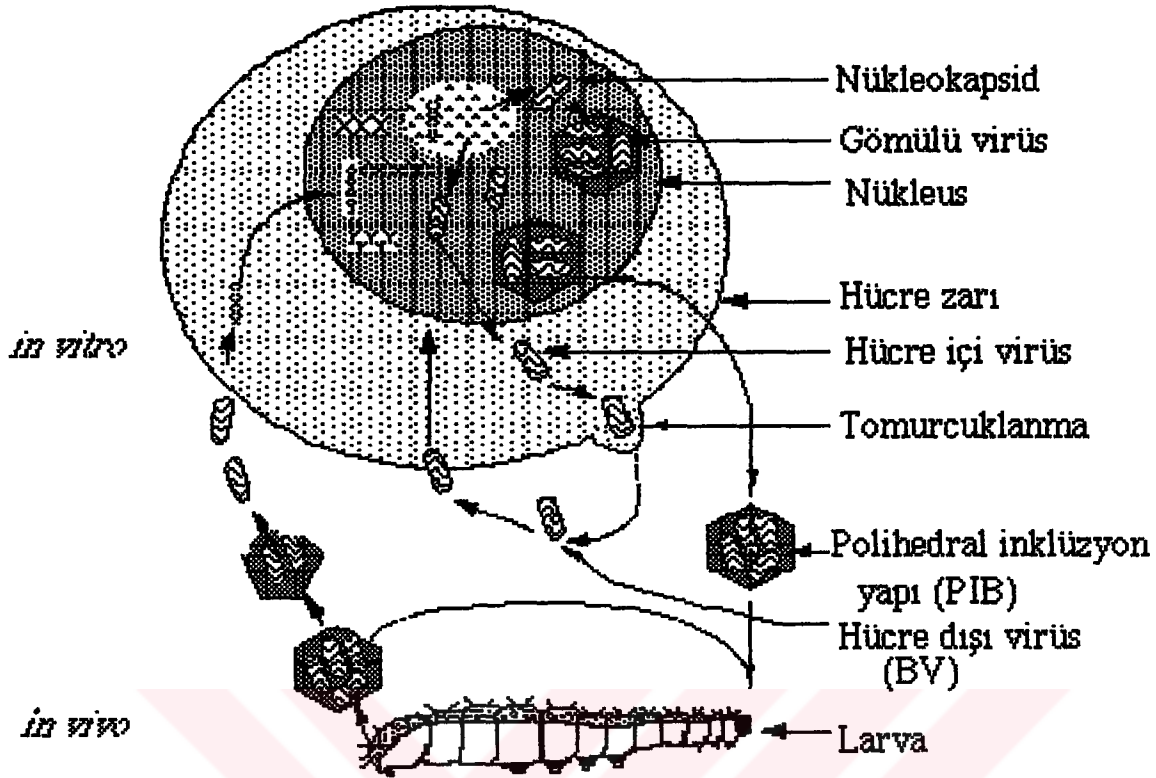
*AcNPV* ilk olarak yonca tırtılı böceğinden izole edilmiş, nüklear polihedrozis cinsine ait ve en çok çalışılan örnek bir baculovirüs tipidir (1).

*AcNPV*, 1-18 nükleokapsidin bir zarf içerisine gömülmesiyle oluşur. Bu zarfa sahip virüsler (virionlar), polihedrin denilen 28 kDa'luk bir proteinden oluşmuş polihedral inklüzyon yapılar (PIB) adındaki kristal benzeri cisimler içerisine gömülürler.

*AcNPV*'nin replikasyonu enfekte edilen hücrelerin çekirdeklerinde gerçekleşir. Bu olay Şekil 1'de gösterilmektedir (8). Replikasyon iki safhada cereyan eder. Birinci safhada, çekirdek içerisinde nükleokapsidler oluşur. Silindir şeklindeki nükleokapsidler, kapsid denilen tüp benzeri yapı içerisinde DNA'yı içerir. Oluşan nükleokapsidler daha sonra çekirdek kanallarından geçerek sitoplazmadan sonra hücre zarından tomurcuklanma yöntemi ile zarf kazanarak hücreden ayrılır. Bu şekilde oluşan zarflı virüsler (ekstrasellüler virüsler) hücre kültüründe hücreler arasında *in vitro* olarak enfeksiyonu taşıma özelliğine sahip, çomak şeklinde virüs formlarıdır. Hücre kültüründe enfeksiyon meydana getiren bu virüsler tomurcuklanan virüs (ekstraselüler virüs) olarak adlandırılırlar (9).

İkinci safhada ise, çekirdek içerisinde oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı çekirdek zarından zarf kazandıktan sonra küp şeklindeki protein yapılar içerisine gömülerek PIB'leri oluştururlar. PIB'ler tabiatta virüs enfeksiyonunun larvadan larvaya taşınmasında rol oynayan virüs formlarıdır (10). Aynı zamanda PIB'ler, virüslerin hücrelerin savunma mekanizmalarına karşı direnç kazanmalarını da sağlar.

Tabiatta, inklüzyon yapılar besin ile birlikte larva tarafından alınır. Orta bağırsakta, inklüzyon yapılar çözülür ve bu yapılar içerisinde bulunan virüs partikülleri orta bağırsak lümenine salınır. Virüs partikülleri daha sonra özel bir reseptör tarafından tanınma neticesinde membran füzyonu yöntemiyle (11) orta bağırsağın tek tabakalı silindirik hücrelerine geçer. Sitoplazmaya geçen nükleokapsidler, buradan replikasyon bölgesi olan nükleusa ulaşır (12). Nükleusta virüs DNA'sı kapsid örtüden ayrılır ve burada viral DNA replikasyonu ile transkripsiyon işlemleri gerçekleşir (13).



Şekil 1. Nüklear polihedrozis virüs'ün replikasyon şeması

Replikasyonun başlamasından sonra (enfeksiyondan yaklaşık 8 saat sonra) nükleokapsid inşası tamamlanır. Bu işlem, yavru virüslerin, enfekte olmuş orta bağırsak hücrelerinin bazal kısmından hemolenf içerisine salınması ile sonuçlanır. Bu ekstrasellüler virüs partikülleri, daha sonra tomurcuklanma yoluyla hemositler, bağ dokusu hücreleri, yağ dokusu, trakeal elementleri, kas hücreleri ve malpighi tüpleri gibi hemolenfe dönük olan hücreleri enfekte ederler (14). Yeni enfekte olan hücrelerde, virüs parçacıkları endozomlar içerisine geçerler. Endozom içerisindeki düşük pH, *gp64* geninin sentezlediği glikoproteini harekete geçirir. Bu glikoprotein membran füzyonunu katalizleyerek nükleokapsidlerin sitoplazmaya geçişini sağlar (15). Bundan sonra salınan nükleokapsidler, yeni bir replikasyon işlemi başlatırlar.

Replikasyonun başlamasından yaklaşık 12 saat sonra, virüs partikülleri artık hemolenf içerisine salınmaz, bunun yerine, primer ve sekonder olarak enfekte olmuş hücrelerin nükleuslarında yeni yapılan polihedralar içerisine gömülürler. Sonuçta, larva polihedra ile dolar, virüs

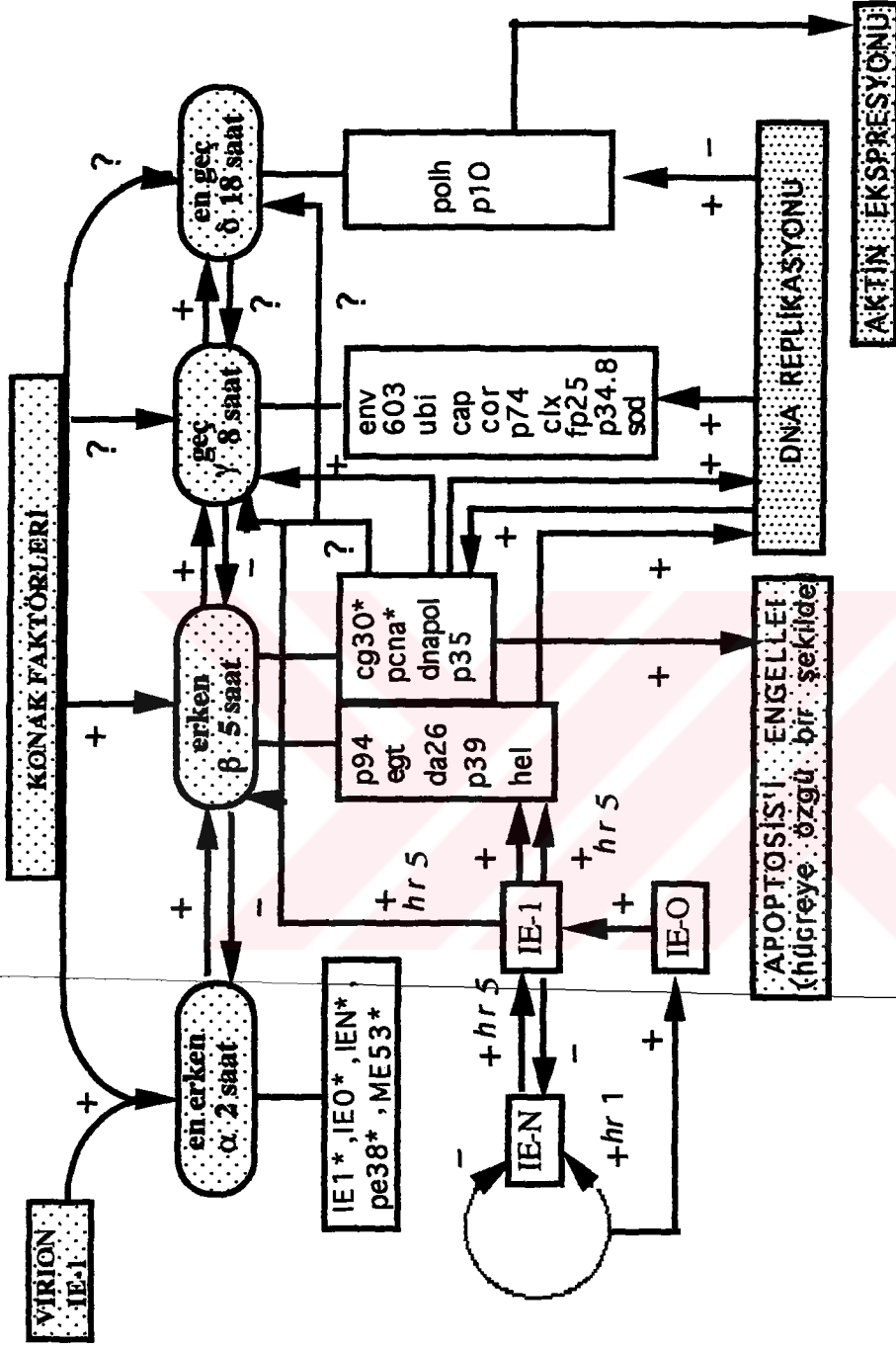
tarafından sentezlenen kitinaz ve katepsinaz etkilerine yenik düşen larva ölür, böylece çok sayıda polihedra ( $10^8$ - $10^9$ /larva) çevreye salınır (16).

Bu güne kadar SDS-PAGE yöntemiyle yapılan çalışmalarda, AcNPV'ye ait proteinlerin yapıları büyük ölçüde aydınlatılmıştır. Translasyon ürünlerinin enfeksiyondan sonra 2-60 saatleri arasında sentezlendikleri tespit edilmiştir. Birbiri ardısıra enfekte edilen hücrelerden alınan örneklerin SDS-PAGE analizleri neticesinde, AcNPV genlerine ait proteinlerin üretilmelerinin "temporal kasket" olarak bilinen, basamaklı bir şekilde meydana geldikleri, bu genlere ait proteinlerin, farklı zamanlarda oluşmaları ile gözlenmiştir (Şekil 2).

İlk zamanlarda yapılan çalışmalarda üç temporal sınıfın olduğu tespit edilmiştir (17). Öte yandan, son zamanlarda metabolik inhibitörler, sıcaklığa duyarlı mutantlar ve tranzient (geçici) genlere ait proteinlerin üretilmesi metodlarıyla yapılan çalışmalar neticesinde, Şekil 2'de de görüldüğü gibi baculovirüs genlerine ait proteinlerin en erken ( $\alpha$ ), erken ( $\beta$ ), geç ( $\gamma$ ) ve en geç ( $\sigma$ ) olmak üzere, 4 basamakta üretildikleri tespit edilmiştir (18). Birbirini izleyen bu sınıfların herbirindeki gen ekspresyon seviyesi bir öncekinden daha yüksektir. En erken grubu genlere ait proteinler, enfeksiyondan yaklaşık 2 saat sonra üretilirler ve konak faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Ürünleri enfeksiyondan 5 saat sonra görülmeye başlayan erken grubu genler, en erken grubu genlerin ürünlerine ihtiyaç duyarlar. Bu iki grup genlere ait proteinlerin üretilmesinin DNA replikasyonundan önce gerçekleştiği bilinmektedir. Enfeksiyondan yaklaşık 8 saat sonra sentezlenmeye başlayan geç grubu genlerin sentezlenmesi, projeni (yavru) virüs DNA'sının sentezlendiğini ve hücre dışı virüslerin meydana gelmeye başladığını gösterir. On sekiz saatlik virüs enfeksiyonunu takiben üretilmeye başlayan en geç grubu gen proteinleri, inklüzyon yapılarının matriksini oluşturan polihedrin ve enfekte hücrelerin nükleuslarında fibriler yapıların oluşumunu sağlayan ve virüs replikasyonunda zorunlu olmadığı bilinen *p10* geni proteinlerini sentezlerler (19).

### 1.3. AcNPV Polihedrin Geninin Özellikleri

AcNPV polihedrin geni, polihedral inklüzyon yapılarıdaki gömülü virionlar için matriks görevi yapan bir proteini kodlar. Nüklear polihedrozis virüslerin gömülü oldukları bu inklüzyon yapıları polihedra veya polihedral inklüzyon yapıları (PIBs) olarak adlandırılırlar. AcNPV'ye



Şekil 2. *Autographa californica* nükleer polihedrozis virüs gen regülasyon basamakları; temporal kaset modeli

ait PIB'lerin büyüklükleri 0.5-15  $\mu\text{m}$  arasındadır. PIB'ler hücrelerin savunma mekanizmalarına karşı direnç kazanmasını sağlayan ve doğada virüs enfeksiyonlarını böcekten böceğe transfer eden enfeksiyon özelliğine sahip yapılardır. Bu gen, virüsün hücre kültüründe replikasyonu veya enfeksiyonu için gerekli değildir. AcNPV polihedrin geninin haritası çıkarılmış ve DNA analizi yapılmıştır (20).

AcNPV polihedrin geni proteini enfeksiyonun çok geç fazında, enfeksiyonu takip eden 20 ile 24. saatlerde üretilir. Enfekte olmuş *S. frugiperda* hücre kültürlerinde 28-kDa büyüklüğündeki polihedrin, tipik olarak 0.5-1  $\mu\text{g/ml}$  arasında, yüksek seviyede sentezlenir (7).

Delesyonlar veya insersiyonlar polihedrin genini inaktive ederler ve inklüzyon negatif virüslerin üretilmesine sebep olurlar. Inklüzyon negatif ( $\text{occ}^-$ ) bir virüs, inklüzyon pozitif ( $\text{occ}^+$ ) yani orijinal tip virüslerden kesin bir şekilde ayırt edilebilen inklüzyon negatif plaklar oluştururlar. Bu inklüzyon negatif plakların görüntülenmesi, başlangıçta çok zor olabilir. Ancak *lacZ* geni ihtiva eden mavilik oluşturacak vektörler kullanılırsa bu işlem çok kolaydır. Bu tip vektörler rekombinant  $\text{occ}^-$  virüslerin kolayca görülebilen mavi plaklar oluşturmalarına imkan verirler (7).

#### 1.4. Baculovirüs'lerin Zirai Mücadelede Kullanılması

Baculovirüs'ler konağa spesifik olmalarından, bitki ve omurgalıları enfekte etmemelerinden dolayı, son zamanlarda zararlı böceklerin kontrolü için virüsler arasında en çok tercih edilenidirler. Şu ana kadar, baculovirüslere karşı herhangi bir dirençliliğe rastlanılmamış ve moleküler genetiği detaylı bir şekilde çalışılmıştır (21). Ayrıca, bu çalışmalar baculovirüslerin genomlarının değiştirilerek, yabancı gen klonlanması için kullanılmasını ve insektisidal özelliklerinin geliştirilmesini sağlamıştır.

Tabiatta baculovirüsler, duyarlı böcek popülasyonlarının azalmasına sebep olur. Bu ilk olarak 1911'de Reiff (22) tarafından ağaç güvesi hastalığının (bir baculovirüs enfeksiyonu), bir kontrol mekanizması olarak kullanılabileceğini tavsiye etmesiyle başlamıştır. Bu özellik geliştirilerek, baculovirüsler tabii zararlı böcek kontrol ajanı olarak kabul edilmekte ve günümüzde bunlar zararlı böceklere karşı kullanılmaktadırlar. Amerika Birleşik Devletleri'nde en az 3 tür baculovirüs, arazide kullanılmak üzere ticari olarak üretilmektedir. Üretilen tüm virüslerin teşhisi, aktivitesi, memelilere karşı toksiditesi ve patojenitesi araştırılmaktadır. Tablo 1'de bu amaçla kullanılan baculovirüs örnekleri gösterilmiştir.



Tablo 1. Çeşitli baculovirüslerin etkili olduğu konaklar ve kullanım bölgeleri

Konukçu	Uygulama Alanı	Virüs Grupları
Coleoptera Scarabaeidae <i>Oryctes rhinoceros</i> (Hindistan ceviz ağacı böc.)	Pasifik	Nüklear Polihedrozis Virüs (NPV)
Hymenoptera Diprionidae <i>Gilpinia hercyniae</i> (Avrupa ladini testere arısı)	Avrupa, Kuzey Amerika	NPV
Lepidoptera Tortricidae <i>Argyrotaenia velutinana</i>	Kuzey Amerika	Granulozis Virüs (GV)
<i>Choristoneura fumiferana</i>	Kuzey Amerika	Sitoplazmik Virüs (CPV), NPV, GV
<i>Heliothis zea</i> (Amerikan yeşil kurdu)	Kuzey ve Güney Amerika	NPV
<i>Phthorimaea operculella</i> (Patates kurdu)	Pasifik, Kuzey Amerika	GV

Baculovirüs'ler, pest kontrolü için uygun olmalarına rağmen kimyasal alternatifleri kadar tercih edilmemektedirler.

Baculovirüs'lerin biyolojik kontrol ajanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmama nedenlerinden biri yabancı tip virüs enfeksiyonunun yavaş olmasıdır. İkinci olarak, yaşlı larvalar genç larvalardan daha az duyarlıdır ve böylece, sadece genç larvalar etkili olarak kontrol edilebilmektedirler. Ayrıca, baculovirüsler yüksek seçiciliklerinden dolayı ticari potansiyeli az ve dolayısı ile pestisid olarak kullanılması pahalıya malolmaktadır. Son olarak, baculovirüsler, çevrede uzun süre kalmaz, UV tarafından hızlı olarak inaktif edilirler. Bunun yanında, virülanslarının düşük olması ve konak spektrumlarının dar olması da önemli bir problemdir. Çeşitli genetik mühendisliği yöntemlerinin uygulanması ile, baculovirüslerin enfeksiyonunun kısa süre içerisinde meydana gelebilmesi, insektisidal etkilerinin geliştirilmesi ve konak spektrumunun genişletilmesi mümkündür (23).

### 1.5. *B. thuringiensis*'in Zirai Mücadelede Kullanılması

*B. thuringiensis*, Gram-pozitif bir toprak bakterisidir. Bakteri ilk olarak 1901'de hastalıklı ipek böceği (*B. mori*) larvalarından izole edilmiş, daha sonra en az 34 serovara ayrılan 1000' den fazla farklı suşu tespit edilmiştir. *B. thuringiensis* 'in esas olarak ICP üreten 5 izolatu vardır. Bunların çoğunun Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera larvalarına karşı toksik olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *B. thuringiensis* suşlarının zararlı böceklere karşı pest kontrol ajanı olarak kullanılması düşünülmüştür. İnklüzyonlar esas olarak, insektisidal aktiviteye sahip, spor oluşumu esnasında fazla miktarda çoğalan proteinlerden ibarettir ve bunlar, sporla birlikte çevreye yayılırlar. Bilinen bütün ICP'ler protoksin olarak üretilirler ve böcek larvaları için toksik olan proteinleri ihtiva ederler. Bu proteinler larva tarafından yenince orta bağırsakta çözülür ve 70'den 130 kDa'a kadar ulaşan proteinler (protoksinler) salarlar. Bu protoksinler bağırsak proteazları tarafından olgunlaşmış toksinlere aktive edilirler. Bu olgun toksinler sözkonusu böceğin orta bağırsağındaki epitel hücrelerinde mevcut reseptörlere bağlanarak muhtemelen bu hücrelerin yapısal fonksiyonel özelliğini bozarlar. Bu durum hücrenin lizisine ve sonuçta da larvanın ölümüne neden olur (24).

Türkiye'de biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan en önemli ve güncel örnek *B. thuringiensis*'dir. Özellikle bu bakteriden hazırlanan preparatlar bağ, meyve ve narenciye zararlılarına karşı kullanılmaktadır ve bir çok firma *B. thuringiensis* içeren çok çeşitli ilaçlar geliştirmiştir. *B. thuringiensis*'in kullanıldığı zararlılar Tablo 2'de özetlenmektedir (25).

Dünyadaki uygulamalarda ise *B. thuringiensis* ve *B. papilliae* bakterileri kullanılmaktadır. Son yıllarda Lepidopter ve Dipterler üzerinde etkili olan *B. thuringiensis*'in Coleopterler üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur (26).

Tablo 2. Türkiye'de *B. thuringiensis*'in uygulandığı zararlılar

Zararlılar	Gruplar
Lahana yaprak güvesi ( <i>Plutella xylostella</i> L.)	Lepidoptera
Altın kelebek ( <i>Euproctis chrysorrhoea</i> L.)	Lepidoptera
Salkım güvesi ( <i>Lobesia botrana</i> Schiff.)	Lepidoptera
Amerikan beyaz kele. ( <i>Hyphantria cunea</i> Drury)	Lepidoptera
Elma ağ kurdu ( <i>Yponomeuta malinellus</i> Zell.)	Lepidoptera
Yüzük kelebeği ( <i>Malacosoma neustria</i> L.)	Lepidoptera
Harnup güvesi ( <i>Ectomyelois ceratonia</i> Zell.)	Lepidoptera
Kır tırtılı ( <i>Lymantria dispar</i> L.)	Lepidoptera
Limon çiçek güvesi ( <i>Prays citrii</i> Mill.)	Lepidoptera

### 1.6. Ekspresyon ve Transfer Vektörlerinin Genel Özellikleri

Uygulamalı gen teknolojisinin önemli hedeflerinden biri, rekombinant DNA moleküllerinden istenilen proteinlerin, istenilen oranda üretilmesidir. Böylece, ilgi duyulan gen veya gen gruplarının ürüne dönüştürülebilmesi için genler, transfer vektörü olarak adlandırılan taşıyıcı moleküller vasıtasıyla, proteine dönüştürülebilmelerini sağlayacak olan ekspresyon vektörlerine aktarılırlar. Transfer vektörleri özel olarak düzenlenirler. Bunlar klonlama, transfer ve rekombinant DNA'nın çoğaltılması için çeşitli özelliklere sahiptirler. Bir transfer vektörünün görevini yerine getirebilmesi için sahip olması gereken başlıca özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir (27):

a) Vektör DNA'sında, özgün bir baz dizisinden meydana gelen, DNA replikasyonunun başlamasında rol alan tüm enzimlerin tanınım bağlanabildiği ve vektörün konak içerisinde çoğalmasını sağlayan, yaklaşık 500 bp uzunluğunda bir "promotor" bulunmalıdır.

b) Vektörler, vektörün veya rekombinant DNA'nın tanınmasını sağlayan bazı işaret (marker gen)'lere sahip olmalıdırlar. Bunlar, çeşitli antibiyotiklere dirençlilik sağlayan bir gen olabileceği gibi, bazı amino asit ve şekerleri metabolize edebilen oksotrofik bir özellik de olabilir.

c) Vektörlerde, yabancı DNA'ların klonlanmasında kolaylık sağlayan, çok sayıda ve özel restriksiyon endonükleaz kesme noktaları olmalıdır.

d) Vektör DNA'sı, klonlanmış DNA'ya ait proteinin üretilmesi için uygun kontrol elementlerini, promotorları ve ribozom bağlanma bölgelerini içermelidir.

e) Vektörün baz sırasının bilinmesi de işaret geninin, restriksiyon endonükleazların ve diğer ilgi duyulan elementlerin yerlerinin tam olarak tespit edilmesi ve uygun bir bilgisayar programıyla analiz edilebilmesi için önemlidir.

Bunlara ilave olarak, ekspresyon vektörünün oluşturulabilmesi için, transfer vektörüyle yabancı tip virüs arasında özgün rekombinasyonu sağlayacak homolog bölgelerin olması gerekir. Böyle bir rekombinasyon sonucunda oluşacak rekombinant, ekspresyon vektörü olarak kullanılır. Ekspresyon vektörleri de transfer vektörlerinin yukarıda sayılan özelliklerinin çoğuna sahip olması gerekir. Oluşturulan ekspresyon vektörünün biyolojik aktiviteye sahip protein üretebilmesi için uygun konak içerisinde bulunması gerekir.

### 1.7. Baculovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi

On yıldan bu yana, baculovirüs'ler yabancı genlerin ökaryotik ekspresyon vektörleri olarak kullanılmaktadır. Baculovirüs'ün ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmasının en önemli üstünlüğü, polihedral inklüzyon yapı matriks proteini (polihedrin, 28 kDa) ve p10 proteinlerini kodlayan genlerden (*polh* ve *p10*) gelmektedir. Bunlar, enfekte olmuş hücrelerde virüs replikasyon siklusunun en geç safhasında fazla miktarda üretilirler. Polihedrin proteinine, virüs partiküllerini doğada konaklar arasında koruyan inklüzyon yapıların oluşumunda veya virüs partiküllerinin polihedra içerisine paketlenmesinde ihtiyaç duyulur. Polihedraya, böceklerin ağız yoluyla enfeksiyonunda ihtiyaç duyulmasına rağmen, *in vitro* virüs replikasyonunda ihtiyaç duyulmaz. Bu nedenle söz konusu genlerin (*polh* ve *p10*) kodlayan bölgeleri çıkarılıp, yerlerine yabancı genler yerleştirilerek baculovirüs ekspresyon vektörleri geliştirilmekte ve bu vektörler çeşitli yabancı genlere ait proteinlerin geniş miktarda üretilmesinde kullanılmaktadır (6).

Baculovirüs'lerin genomları yabancı genin direkt insersiyonu için çok büyüktür. Bu nedenle yabancı gen bunlara homolog rekombinasyon yolu ile birleştirilir. Bunun için ilgi duyulan gen bir transfer vektörüne bağlanır (klonlanır). Genellikle bu tip vektörler, yabancı genin klonlanabileceği, bir veya daha fazla restriksiyon bölgesi tarafından izlenen güçlü çok geç

baculovirüs promotorları ihtiva ederler. Viral DNA ve transfer vektörü DNA'sının birlikte transfeksiyonundan sonra, virüs ve transfer vektörünün homolog bölgeleri arasında rekombinasyon meydana gelir. Neticede yabancı gen, genomda istenen bölgeye yerleşir. Rekombinant virüsün belirlenmesini kolaylaştırmak için, bu tip vektörlerde genellikle polihedrin,  $\beta$ -galaktosidaze,  $\beta$ -glukuronidaze (R) veya lusiferaze (R) gibi marker genler mevcuttur. Bu şekilde çok sayıda yabancı genlere ait proteinler böcek hücrelerinde üretilmiştir (28).

Baculovirüs'lerin ekspresyon vektörü olarak kullanılması ile ilgili ilk çalışmalar, Smith ve ark (29) ve Pennock ve ark (30) tarafından, AcNPV'ü kullanarak *S. frugiperda* hücrelerinde  $\beta$ -interferon'u ve  $\beta$ -galaktozidaz'ı üretmeleriyle yapılan çalışmalardır. Maede ve ark (31) ipek böceğinde BmNPV'ü kullanarak  $\beta$ -interferonunu sentezlediler. Sonraki yıllarda, baculovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS) kullanılarak tıbbi, ekonomik ve endüstriyel öneme sahip viral (32), fungal (33), bakteriyal (2), bitkisel (34) ve hayvansal (35) orjinli çeşitli rekombinant proteinler bol miktarda üretildi. Günümüzde ise özellikle tıbbi alanda yapılan çalışmalarla çeşitli hastalıklara karşı yeni antijenler, büyüme faktörleri ve kinazlar üretilip, yaygın olarak kullanılmaktadır (36). Geliştirilen yeni ilaçlarla birlikte yeni tedavi yöntemleri de ortaya çıkarılmıştır. Bunların sonucunda, başta rekombinant ve sentetik olmak üzere birçok yeni aşı geliştirilmiştir. Yine bu alanda yapılan çalışmalar sayesinde immünoglobulinler, insülin, interferon ve interlökin gibi proteinler bol miktarda üretilmiştir. Endüstriyel öneme sahip çeşitli bitkisel proteinler de bu sistemde yaygın olarak sentezlenmektedirler. Ayrıca, zirai mücadelede zararlı böceklere karşı etkili olan bazı toksik özelliğe sahip proteinler de BEVS'de üretilerek zirai mücadele çalışmalarında kullanılmaktadır (2).

### **1.8. Baculovirüs Ekspresyon Vektör Sisteminin Avantajları**

Tüm rekombinant proteinlerin üretimi için ideal bir sistem henüz geliştirilememiştir. Protein üretiminde kullanılan bakteriyel, plazmid, faj, viral ve YAC vektörlerinin herbiri, rekombinant protein yapısına ve onun kullanılış özelliğine uygunluk gösterir. Çoğu durumda mükemmel bir yöntem olan baculovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS), diğerlerine göre aşağıda belirtildiği gibi birçok avantaja sahiptir (23):

a) Protein üretimi için ökaryotik bir ortam olması: BEVS'nin iyi bir ökaryotik ortam olması, biyolojik olarak aktif ökaryotik proteinlerin üretimi için oldukça önemlidir. Bu sistem uygun katlanma, disülfid bağ oluşumu, oligomerizasyon ve/veya biyolojik olarak aktif olan bazı proteinlere özgü olan post translasyonel modifikasyonları kontrol eder. Buna ilave olarak, bu sistemde sinyal parçalaması, proteolitik parçalama, N- glikozilasyon, O- glukolizasyon, açılasyon, amidasyon, fosforilasyon ve karboksilasyon gibi post translasyonel değişiklikler de olur. Tablo 3'de baculovirüs ekspresyon vektör sistemi kullanılarak üretilmiş proteinlerdeki translasyon sonrası değişiklikler görülmektedir.

Tablo 3 . Baculovirüs'deki translasyon sonrası değişiklikler

<b>İşlem tipi</b>	<b>Alt-tip</b>	<b>Protein</b>
Proteolitik işlem	Sinyal parçalanma	İnsan dokusu plasminojen aktivatörü (37)
N-terminal bloklama	N-terminusunda asetilalanini	İnsan aldose redüktase (38)
Fosforilasyon	Serin/Treonine fosforilasyonu	SV40 geniş T antijeni (39)
Glikozilasyon	N-glikozilasyon	Herpes simplex virüs glikoprotein D (40)
	O-glikolizasyon	Pseudorabies virüs glikoproteini (41)
Yağ modifikasyonu	Yağ asitleri açılması	SV40 geniş T antijeni (42)
	Polyisoprenilasyon	H-ras, Rap-1A (43)
$\alpha$ -amidasyon		M.sexta diüretik hormon (44)
Hücre alt lokalizasyonu		Fare glukokortikoid reseptörü (45)
Katlanma	Disülfid bağları oluşumu	İmmunoglobulin heterodimers (46)
	Dimerizasyon Oligomerizasyon	İnsan interlökin-5 (47)
Gen splicing		İpek güvesi kromozomal genleri (48)

b) Çeşitli virüs gen ürünlerinin kullanılabilmesi: Virüs, hücre kültüründe virüs partiküllerinin üretiminin devamı için gerekli olmayan iki gen ürününe sahiptir (polihedrin ve p10). Bu yüzden, bu ürünlere karşılık gelen genlerin kodlayan bölgeleri yerine, üretilmek istenen proteini kodlayan yabancı genler yerleştirilebilir.

c) Güçlü gen promotorlarının olması: *polh* ve *p10* genleri, enfekte olmuş hücrelerde proteinlerin fazla miktarda sentezlenmesini sağlayan, oldukça aktif, güçlü promotora sahiptirler. Polihedrin proteini toplam viral proteinlerin %90'undan fazlasını oluşturur. Bu güçlü promotorun kullanılmasıyla toplam hücresel proteinin %25-%50 oranında üretilmesi ( $10^9$  hücre/1 litre kültürden 1 gr protein) mümkün olmaktadır.

d) İnsertin büyüklüğü: Baculovirüs genleri çeşitli büyüklüklere sahiptir (90-200 kbp). Normal replikasyon ve DNA paketlenmesini etkilemeksizin büyük miktarda (100 kb veya daha fazla) yabancı DNA virüse yerleştirilebilir. Aynı zamanda, gen sayısı da birden fazla olabilir.

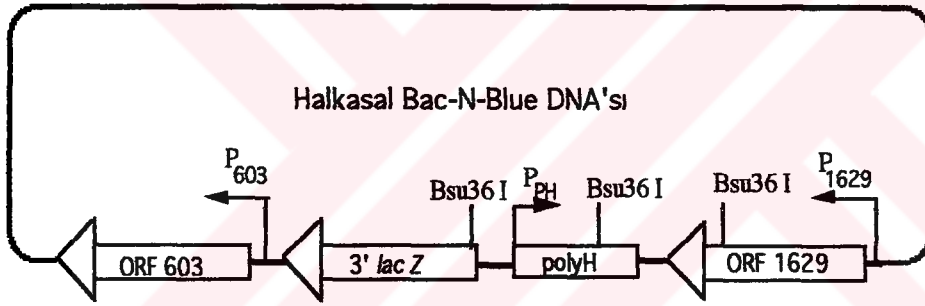
e) Düşük sıcaklıkta protein üretimi: Baculovirüsler  $27^{\circ}\text{C}$ 'de üretilirler. Bu sıcaklık  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kültür edilen hayvan hücrelerine ait sıcaklık-duyarlı mutantlar için üretken bir ortamdır. Bu yüzden, BEVS bir genin sıcaklık duyarlı alleli tarafından kodlanan aktif bir proteini büyük oranda üretmek için kullanılabilir. Bu durum vektörün  $37^{\circ}\text{C}$ 'de üretildiği ortamlarda mümkün değildir.

f) Güvenilir olması: Baculovirüslerin replikasyonu sadece omurgasızlarda gerçekleştiğinden sistemin kullanıcılarına karşı herhangi bir riski yoktur.

g) Bol miktarda protein üretimi: Böcek hücreleri *in vitro* sistemlerde geniş hacimde protein üretmeye uygundur.

### 1.9. *AcNPV* DNA'sının Özellikleri

*AcNPV*'den izole edilen ve Bac-N-Blue olarak adlandırılan virüs DNA'sı, tamamen lineer hale gelme ihtimalini arttırmak ve virüsün üremesi için gerekli sekansların uzaklaştırılmasını sağlamak için 3 tek *Bsu36 I* restriksiyon bölgesini ihtiva edecek şekilde inşa edilmiştir (7). Açık okuma zinciri (ORF) 1629'un viral çoğalma için önemli olduğu gösterilmiştir. Özel olarak, ORF 1629'un 3' ucundaki *SnaB I* bölgesindeki insersiyonlar toksik protein üretimi sağlar. ORF 1629'un 3' ucundaki sekanslar *Bsu36 I* ile kesme sırasında uzaklaştırılır. Görülebilir virüsü izole etmenin tek yolu, gerekli ORF 1629 sekansının transfer vektörü ile biraraya getirilmesidir. Transfer vektöründeki ve lineer hale getirilmiş DNA'daki sekanslar, genellikle ORF 603 ve ORF 1629 arasındaki rekombinasyon, rekombinant virüsün üretilmesi ile sonuçlanır (49).



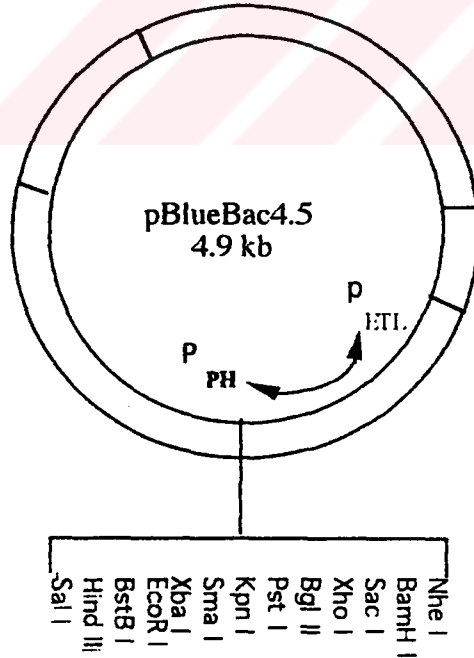
Şekil 3. *AcNPV* DNA'sının şematik gösterilişi



### 1.10. Baculovirüs Transfer Vektörü (pBlueBac4.5)'nün Özellikleri

pBlueBac4.5 (4940 bp) füzyon olmayan bir vektör olup, çok geç AcNPV polihedrin promotörü altında böcek hücrelerinde, yabancı bir gene ait proteini üretebilecek şekilde dizayn edilmiş bir baculovirüs transfer vektörüdür. *Lac Z* geni ürünü, rekombinant virüs için görülebilirlik işareti olarak, "erken-geç" (ETL) promotörü altında sentezlenir. Bu transfer vektörü ile oluşturulmuş viral yapıların meydana getirdiği plaklar occ'dirler ve yayma agaroz içinde kromojenik bir subtrat var ise mavi plaklar oluşacaktır.

pBlueBac4.5 (4.9 kb), böcek hücrelerinde istenilen genin ekspresyonuna müsaade edecek şekilde düzenlenmiştir. Ekspresyon çok geç AcNPV polihedrin promotörü tarafından gerçekleştirilir. pBlueBac4.5 vektörü, pJVETL-Z (Invitrogen, USA)'den oluşturulmuş olup ETL promotörü ile AcNPV'nin çok geç polihedrin promotörüne ( $P_{PH}$ ) sahiptir. ETL promotörü,  $\beta$ -galaktosidazın bir belirleyici gen olarak sentezini yönetir.  $P_{PH}$  ise yabancı gen ürününün sentezini kontrol eder.



Şekil 4. Baculovirüs transfer vektörü (pBlueBac4.5)'nün şematik gösterilişi

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyaller

#### 2.1.1 Kimyasallar, Besiyerleri ve Enzimler

Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasal maddeler ve enzimler değişik firmalardan sağlanmıştır. Bunlardan agaroz, ampicilin, dimetil sülfoksit (DMSO), etidyum bromür, fetal bovine serum (FBS), gliserol, leupeptin, gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), sitrik asit, trisma base, trisma hidroklorid, X-gal, pepstatin A, RNaz Sigma (ABD); amonyak ( $\text{NH}_3$ ), asetik asit,  $\beta$ -merkaptöetanol, bromfenolblue, bovine serum albumin (BSA), etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), fikol 400, formaldehid, izopropanol, magnezyum klorür ( $\text{MgCl}_2$ ), metanol, polietilen glikol (PEG) MW 8000, potasyum klorür (KCl), potasyum asetat, potasyum difosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sodyum bifosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum dodesil sülfat (SDS), triton X-100 Merck (Almanya); bacto-tryptone, yeast extract Difco (ABD); Insectin Plus Liposom, Grace's Insectin Plus Medium (TNM-FH) Invitrogen (USA); *Nco* I MBI (USA), rezin, *Pst* I Promega (USA), *Sac* I, T4 DNA Ligaz Bio Lab (İngiltere), firmalarından temin edildi.

#### 2.1.2. Plazmidler ve Bakteri Suşları

Çalışmada *cryIVA* ve *cryIVD* genlerine ait DNA fragmentlerini ihtiva eden pHE4-AD plazmidi Dr. Arie ZARITSKY (Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'er-Sheva 84105) ve bu genleri subklonlamada kullanılan pAMP18 plazmidi Dr. Ali O. KILIÇ (KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.)'dan temin edildi.

*cryIVAD* fragmentlerini baculovirüs ekspresyon vektörüne rekombinasyonla taşımak için pBlueBac4.5 (Invitrogen, USA) transfer vektörü kullanıldı.

Plazmidlerin ve transfer vektörünün çoğaltılmasında *Escherichia coli*'nin JM109 suşu kullanıldı.

### 2.1.3. Konak Hücre ve Ekspresyon Vektörü

Konak olarak *S. frugiperda* IPLB-SF-9 hücreleri kullanıldı. Hücreler doku kültürü kaplarında, %10 FBS içeren TNM-FH besiyerisinde çoğaltıldı.

*cryIVAD* genlerinin ekspresyonu (transkripsiyon=yazılım ve translasyon=çevrilme) için Bac-N-Blue (Invitrogen, USA) ekspresyon vektörü kullanıldı.

Polihedrin geninin rekombinant virüste inhibe edildiğini göstermek için kontrol amacıyla yabancı tip (wild type) virüs olarak AcNPV (Invitrogen, USA) kullanıldı.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. *E. coli* Kültürünün Üretilmesi

*E. coli* kültürü, kompetant hücre hazırlanması, transformasyon ve plazmid izolasyonu Ausubel ve ark (51)'na göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirildi.

*E. coli* JM109 stok kültüründen bir öze yardımıyla tek bir koloni alınıp, 10 ml Luria Bertani (LB; %1 Bacto-Tryptone, %0.5 Yeast Extract, %0.5 NaCl, pH 7.4) sıvı besiyerine ekim yapıldı ve yaklaşık 16 saat 37°C'de 200 rpm hız ile çalkalanan su banyosunda üretildi.

### 2.2.2. Kompetant *E. coli* Hazırlanması

Bir gecelik *E. coli* kültürü, %0.2 glukoz içeren LB'ye 1/100 oranında aşılandı ve OD<sub>600</sub> = 0.3-0.5 oluncaya kadar su banyosunda 200 rpm de üretildi.

İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler 7.000 rpm'de 10 dak çöktürüldü. Çökelek (pelet) 2 ml soğuk ve steril transformasyon saklama solüsyonu (%1 Bacto-Tryptone, %0.5 Yeast Extract, %0.5 NaCl, %10 PEG 8.000, %5 DMSO ve 50 mM MgCl<sub>2</sub>) içerisinde pipetlenerek buz üzerinde homojen hale getirildi. Hazırlanan kompetant hücreler taze olarak kullanıldı veya tekrar kullanılıncaya kadar -70°C'de saklandı.

### 2.2.3. *E. coli* 'nin Plazmid ile Transformasyonu

Kompetant *E. coli* hücrelerinden 200 µl mikrosantrifüj tüplerine buz üzerinde alınarak 0.1-1 µg rekombinant plazmid veya vektör DNA ile karıştırıldı ve buz üzerinde 40-60 dak bekletildi. Hücreler 42°C'de 2 dak şoklandı ve tekrar buz üzerine alındı. Daha sonra 20 mM glukoz içeren 1 ml LB besiyerine transfer edilerek 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı su banyosunda 150 rpm'de 1 saat inkübe edilerek fenotipik ekspresyon sağlandı. Transform edilen hücreler antibiyotik içeren LB agara cam bagetle yayılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kolonilerden birkaçı alınarak plazmid izolasyonu için antibiyotik içeren 3 ml LB sıvı besiyerinde bir gece 37°C'de üretildi.

### 2.2.4. Plazmid İzolasyonu

Plazmid alkali lizis metoduna göre izole edildi. Plazmid bulunduran *E. coli*'nin bir gecelik kültürlerinden, 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 10.000 rpm'de 2 dak santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Sıvı kısım (süpernatant) atıldı, pelet 200 µl solüsyon I [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8), 10 µg/µl RNaz] içinde vortekslenerek çözüldü. Bunun üzerine 200 µl taze olarak hazırlanmış solüsyon II [0.2 N NaOH, %1 SDS] ilave edildikten sonra yavaşça karıştırılarak viskoz bir akışkanlık ile hücrelerin parçalanmaları (liz olmaları) sağlandı. Liz olan hücreler 200 µl 5 M potasyum asetat (pH 4.9) ile muamele edilerek buz üzerinde 15 dak bekletildi. Protein ve kromozomal DNA 10.000 rpm'de 10 dak santrifüj edilerek çöktürüldü. Plazmid içeren süpernatant steril bir mikrosantrifüj tüpe alındı ve üzerine iki hacim önceden 37°C'de ısıtılmış rezinden ilave edilerek 65°C'de 30 sn tutulduktan sonra oda sıcaklığında rezinin DNA'ya bağlanması için 15 dak daha bekletildi. Plazmid-rezin kompleksi kolonlardan (Promega, USA) süzülerek %80'lik isopropanol ile yıkandı. Kolonlarda kalan alkolü uzaklaştırmak için, kolonlar mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve 30 sn santrifüj edildi. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi. Plazmidin kolondan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için üzerlerine 100 µl 65°C sıcaklıkta distile su veya TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ilave edildikten sonra 10.000 rpm'de 1 dak santrifüj edildi.

### **2.2.5. Restriksiyon Endonükleazlar ile DNA'nın Kesilmesi ve Agaroz Jel Elektroforezi**

Plazmidler restriksiyon enzimlerini üreten firmaların belirttiği şartlarda gerekli tampon içinde ve sıcaklıkta 2 saat kesildi. Reaksiyon 65°C'de 10 dak tutularak sonlandırıldı. Yükleme solüsyonu (%20 fikol 400, 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, %1 SDS, %0.25 bromfenol blue, %0.25 ksilen) ile 1/10 oranında karıştırıldıktan sonra TAE tamponu (%0.48 gr Trisma-Base, %0.11 ml asetik asit, %0.07 gr Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH 8.5) içinde hazırlanmış %0.8 veya %1.5'lik agaroz jelde 50 volt akımda yürütüldü. DNA 0.1 µg/ml etidyum bromür ile boyandı, distile su ile yıkandı ve UV transillüminatörde gözlendikten sonra polaroid kamera ile görüntüledi.

### **2.2.6. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması**

DNA fragmentleri temiz bir bistüri ile jelden kesilerk çıkartıldı ve GeneCleanII Sample Kit (BIO101, USA) ile temizlendi. Mikrosantrifüj tüplerine konulan jel parçalarının üzerine 2 hacim %1'lik sodyum iyodür (NaI) ilave edildi. Tüpler 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda yaklaşık 15 dak veya jel iyice eriyinceye kadar bekletildi. Bu süre zarfında tüpler alt üst edilerek jelin erimesi sağlandı. Jel solüsyonuna 10 µl "glassmilk" ilave edildikten sonra oda sıcaklığında belli aralıklarla alt üst edilerek DNA'nın glassmilke bağlanması sağlandı. Daha sonra tüpler 5 sn santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Pelet 1 ml %80'lik izopropanol ile pipetlenerek 3-4 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra tüpler 5 sn santrifüj edildi ve peletin üzerindeki bütün sıvı uzaklaştırıldı. Pelet 60 µl suda çözüldü ve 65°C'de 5 dak inkübe edilerek DNA'nın glassmilkten ayrılması sağlandı. DNA içeren sıvı 10.000 rpm'de 1 dak santrifüj işleminden sonra temiz tüplere alındı. İzole edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve 100 µg/ml olan fragmentler klonlamada kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### **2.2.7. Gen Klonlanması**

Aynı restriksiyon endonükleazlar ile kesilmiş insert (klonlanacak gen) DNA fragmenti ile vektör DNA'sı 3:1 oranında (0.3 µg insert ve 0.1 µg

vektör DNA) toplam 20-30 µl hacim içinde, 1-2 ünite T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak 16°C'de bir gece inkübe edildi.

### 2.2.8. *S. frugiperda* Konak Hücre Kültürü

*S. frugiperda* (Sf-9) hücre stoğu sıvı azottan alınıp, 37°C'lik su banyosunda eritildi ve buz üzerine yerleştirildi. Tüpün dış kısmı %70'lik alkol ile iyice silindikten sonra, tüpün içeriği 4°C'de soğutulmuş, T-25 flask (Corning T-25, USA) içindeki % 10 FBS katkılı 4 ml TNM-FH besiyerine transfer edilerek iyice yayılmaları sağlandı. Hücreler 27°C'de yaklaşık 1 saat inkübe edildi. Flaska tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı ve flaska 5 ml taze besiyeri ilave edildi. Hücreler %90'lık bir tek tabaka tutunan (monolayer) kültür oluşturuncaya kadar (yaklaşık 5-6 gün) 27°C'de inkübe edildi.

Hücreler monolayer oluşturduktan sonra alt kültür yapıldı. Bunun için flask içindeki besiyeri pastör pipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 5 ml taze katkılı besiyeri konulup flaskın kapağı kapatıldı ve kenarları el içine 4-5 kez vurularak hücrelerin tabandan ayrılmaları sağlandı. Flaskın iç yüzeyi, içindeki besiyeri ile, kenarlara yapışmış hücrelerin süspansiyona karışması ve oluşmuş kümelerin dağılması için, pastör pipeti ile yıkandı. 1:10 oranında yenilenen kültür 5-6 gün sonra yeniden %90'lık tutunan bir tabaka oluşturdu. Bu hücreler tekrar altkültüre alındı.

### 2.2.9. Konak Hücrenin Virüs DNA'sı ve Transfer Vektörü ile Transfeksiyonu

Rekombinant transfer vektörü ile rekombinasyon yüzdesini arttırmak için lineer hale getirilmiş yabancı tip virüs DNA'sı birlikte konak hücrelere transfer edildi. Deney 35 mm'lik petri kaplarında gerçekleştirildi. *S. frugiperda* hücreleri hemositometre ile sayılarak 2 petriye  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde konuldu. Hücrelerin tabana yapışmasını sağlamak için en az iki saat 28°C'de inkübe edildi. Bu arada transfeksiyon karışımı hazırlandı. Bunun için bir mikrosantrifüj tüpüne 10 µl (1 µg) lineer hale getirilmiş Bac-N-blue DNA'sı, 7 µl rekombinant transfer plazmidi (1 µg/µl), 1 ml katkısız "Grace's Insect Medium" ve 20 µl Insectin Plus Liposom konuldu 10 sn vortekslendi. Hazırlanmış olan transfeksiyon karışımı 15 dak oda sıcaklığında inkübe edildi. İki saatlik tutunma işleminden sonra besiyeri

petrilerden pastör pipeti ile hücrelere zarar vermeden dikkatlice uzaklaştırıldı. Liposomun transfeksiyon verimini düşürmesine neden olan serum kalıntılarının ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla hücreler 1 ml katkısız besiyeri ile yıkandı. Oda sıcaklığında 15 dak inkübe edilen 1 ml transfeksiyon karışımı eşit olarak iki petrideki katkısız besiyeri ile yıkanmış hücrelerin üzerine damla damla ilave edildi. Daha sonra petriler 50 rpm hıza ayarlı sallayıcıda 4 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda petrilerin üzerlerine 1 ml katkılı TNM-FH ilave edildi. Petriler parafilm ile sarıldı ve 5 mM EDTA (pH 8) ile nemlendirilmiş peçetelerin içinde bulunduğu poşetlere konarak 28°C'de inkübe edildi.

Dört günlük inkübasyon sonunda petrilerdeki besiyeri alınarak 0.45 µm'lik filtreden süzildikten sonra 4°C'de saklandı.

### 2.2.10. Plak Deneyi

Transfeksiyon sonucu elde edilen virüs süspansiyonundan rekombinant virüsleri seçmek için plak deneyi yapıldı. Deney 35 mm'lik petri tabaklarında yapıldı. Petri sayısı kullanılacak seyreltik sayısına göre tespit edildi. Bu petrilere, *S. frugiperda* hücrelerinden hemositometrede sayılarak,  $1 \times 10^6$  / ml hücre bırakıldı. Petriler parafilm ile iyice sarıldılar ve 150 rpm hıza ayarlanmış sallayıcı platformda 10 dak bekletildi. Daha sonra hücreler 28°C'de 4 saat inkübe edildi.

Virüs son hacmi 350 µl olan katkılı TNM-FH besiyeri içinde istenilen konsantrasyonlarda 10 faktörlü ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) seyreltildi.

Dört saatlik inkübasyon sonunda hücreler inkübatörden alındı ve herbirinden 600 µl besiyeri alınıp uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine virüs süspansiyonları ilave edildi. Daha sonra petriler çalkalayıcı platform üzerinde 50 rpm hızda 90 dak çalkalandı. Bu esnada %2.5'lik "baculovirüs agaroz" hazırlandı ve otoklavda steril edildi. Steril olmuş agaroz steril kabin içerisine daha önceden yerleştirilmiş ve 45°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirildi ve agaroz ile besiyeri birleştirildi. Her petri için 1'er tüp hazırlandı. Bu tüplere 3 µl 50 mg/ml X-gal içeren supplement TNM-FH'dan 1'er ml ilave edildi. Virüs enfeksiyonundan 90 dak sonra petriler alınıp steril kabinin içine yerleştirildi. Önce bir tanenin içindeki tüm besiyeri alınıp uzaklaştırıldı. Bu arada 45°C'de bekleyen TNM-FH + virüs karışımından 1 ml alınıp, steril kabinin içine yerleştirilmiş tüplerden bir tanesinde bulunan 1 ml TNM-FH + X gal ile karıştırıldı ve bu petrinin üzerine nazikçe döküldü. Yavaş dökülerek hücrelere zarar verilmemeye

çalışıldı. Diğer petriler içinde aynı işlem tekrarlandı. Agaroz donunca petrilerin kapakları kapatıldı ve petriler parafilm ile iyice sarıldıktan sonra bunlar 5 mM EDTA ile ıslatılmış peçetelerin bulunduğu kutu içine yerleştirilip, 28°C'de inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra petrilerde görülen mavi plaklar rekombinant virüsü göstermektedir. Bu plaklardan 1 tane alınıp 1 ml katkısız besiyeride çözüldü. Oluşturulan bu virüs karışımından saflaştırmanın iyi olması için yeniden plak deneyi yapıldı. Plak deneyi toplam 3 kez tekrarlandı. Üçüncü plak deneyi sonunda rekombinant virüs saf olarak elde edildi.

### 2.2.11. Yüksek Konsantrasyonlu Virüs Stoğu Hazırlanması

Yüksek konsantrasyonlu rekombinant virüs stoğu üretimi için öncelikle hücreler hazırlandı. *S. frugiperda* hücreleri hemositometre ile sayıldı ve 35 mm'lik petri tabağına  $1 \times 10^6$  hücre koyuldu. Hücrelerin tabana yapışması için petriler 4 saat 28°C'de inkübe edildi ve inkübasyon sonunda petrilerdeki besiyeri 1.5 ml taze besiyeri ile değiştirildi. Petriler daha önce yapılan plak deneyinde oluşan plaklardan birer tanesi ile enfekte edilerek 28°C'de 8 gün süresince hücrelerin %80-90'ı parçalanıncaya kadar inkübasyona bırakıldı. Daha sonra petrilerdeki besiyeri alındı ve hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için 2500 rpm de 10 dak santrifüj edildi. Virüs bulunan üst sıvı temiz tüplere alındı ve virüs stoğu olarak 4°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

### 2.2.12. Virüs Konsantrasyonunun Hesaplanması

Protein üretiminde etkili bir enfeksiyon elde edebilmek için virüs konsantrasyonunun (titer) bilinmesi gerekir. Virüs konsantrasyonu plak deneyi yapılarak tespit edildi. Plak deneyi daha önce izah edildiği şekilde yapıldı. Hesaplama  $10^{-6}$ . ve  $10^{-7}$ . seyreltiklerdeki plaklarının ayrı ayrı sayılması ile gerçekleştirildi. Her iki petrideki virüs konsantrasyonu  $1/(\text{seyreltik sayısı} \times \text{plak sayısı} \times \text{mililitredeki hacmin çarpımı}) = \text{pfu/ml}$  (ml'deki virüs sayısı) formülüne göre hesaplandı. Daha sonra her iki konsantrasyonun ortalaması alınarak ortalama virüs konsantrasyonu tespit edildi.



### 2.2.13. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Protein örneklerinin hazırlanışı Invitrogen kataloğunda belirtildiği şekilde yapıldı. Elde edilen çökelekler buz üzerine yerleştirildi. Her çökelek 100 µl parçalama tamponunda (%0.1 Triton X-100; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.5 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin A) vortekslenerek karıştırıldı. Örnekler her 10 dak da bir vortekslenmek üzere 45 dak buz üzerinde tutuldu. 5.000 rpm'de 10 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları steril tüplere transfer edildi.

### 2.2.13. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi temel olarak Laemmli (52)'nin geliştirdiği metoda göre yapıldı. 24, 48 ve 72. saatlerde alınan sıvılardan elde edilen protein örnekleri ile kontroller (orijinal tip virüs ile enfekte olmuş *S. frugiperda* hücresi protein örnekleri ile hiç enfekte olmamış *S. frugiperda* hücresi protein örnekleri) den 25'er µl alındı. Bunlara eşit miktarda 2X muamele tamponu (0.15 M Tris-HCl pH 6.8, %4 SDS, %20 Gliserol, %6 β-merkaptotanol) ve 5µl Bromfenolblue (BPB) boyası ilave edildi. Daha sonra numuneler 5 dak kaynatılarak %8'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 30 mA'lik akımda yaklaşık 4 saat koşturuldu.

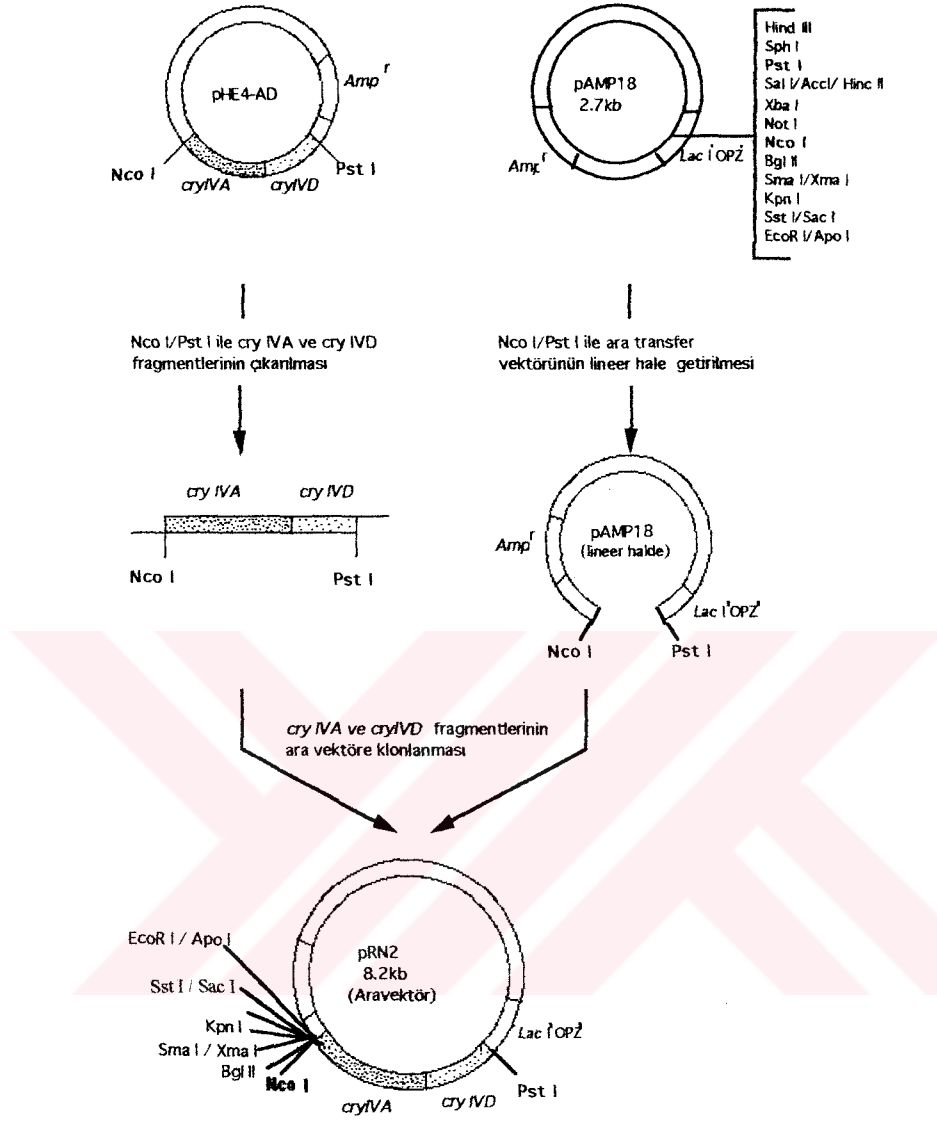
Jeller gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) ile boyandı. Boyama işlemi Hames ve Rickwood (53)'un geliştirdikleri metoda göre yapıldı. Jel önce en az bir saat temizlenmesi için % 50'lik metanole alındı. 15 dak gümüş boya solusyonu (1.177 M AgNO<sub>3</sub>, 0.0189 M NaOH, %0.014 NH<sub>3</sub>) içinde bekletildi. Boyadan alınan jel deiyonize su ile 2-3 kez yıkandı. Bant belirleyici solusyona (%0.05 formaldehid, 0.023 M sitrik asit) alındı. Bantlar görülünceye kadar (yaklaşık 10 dak) bu sıvı içerisinde bekletilen jel daha sonra boyamayı durdurucu fiksatife (%15.7 metanol, %7.40 asetik asit) alındı. Jeli uzun süre saklamak gerekiyorsa kurutmak şarttır. Kurutma işlemi, jelin selefona yapraklar arasında 80°C vakumlu jel kurutma aletinde 1 saat bekletilmesi ile gerçekleştirildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *cryIVAD* Geninin Klonlanması

*B. thuringiensis*'e ait insektisidal kristal proteinlerini kodlayan 5568bp'lık *cryIVAD* genleri pHE4-AD plazmidinden *Nco* I/*Pst* I restriksiyon enzimleri ile kesilerek izole edildi ve aynı enzimler ile kesilmiş pAMP18 vektörüne klonlandı (Şekil 5).

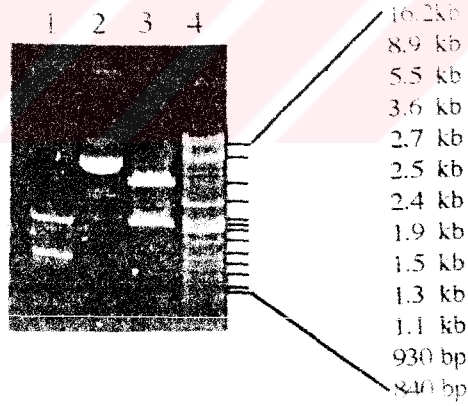
Rekombinant plazmidler *E. coli* JM109 kompetent hücrelere transform edilerek rekombinant plazmid taşıyan klonlar 100 µg/ml ampisilinli LB agarda seçildi. Ampisiline dirençli kolonilerden 4 tanesi plazmid DNA izolasyonu için sıvı besiyerisinde çoğaltıldı. Plazmid DNA'sı agaroz jelde elektroforez edilerek pAMP18 vektörü ile karşılaştırıldı. Dört klonun da pAMP18'den daha büyük oldukları görüldü (Şekil 6). Bu plazmidlerden biri pRN2 (8.2 kb) olarak adlandırıldı. pRN2 *Nco* I/*Pst* I restriksiyon enzimleri ile kesilerek *cryIVAD* fragmentinin istenilen oryantasyonda klonlandığı doğrulandı (Şekil 7).



Şekil 5. *cryIVAD* genlerinin pAMP18 plazmidine klonlanması.

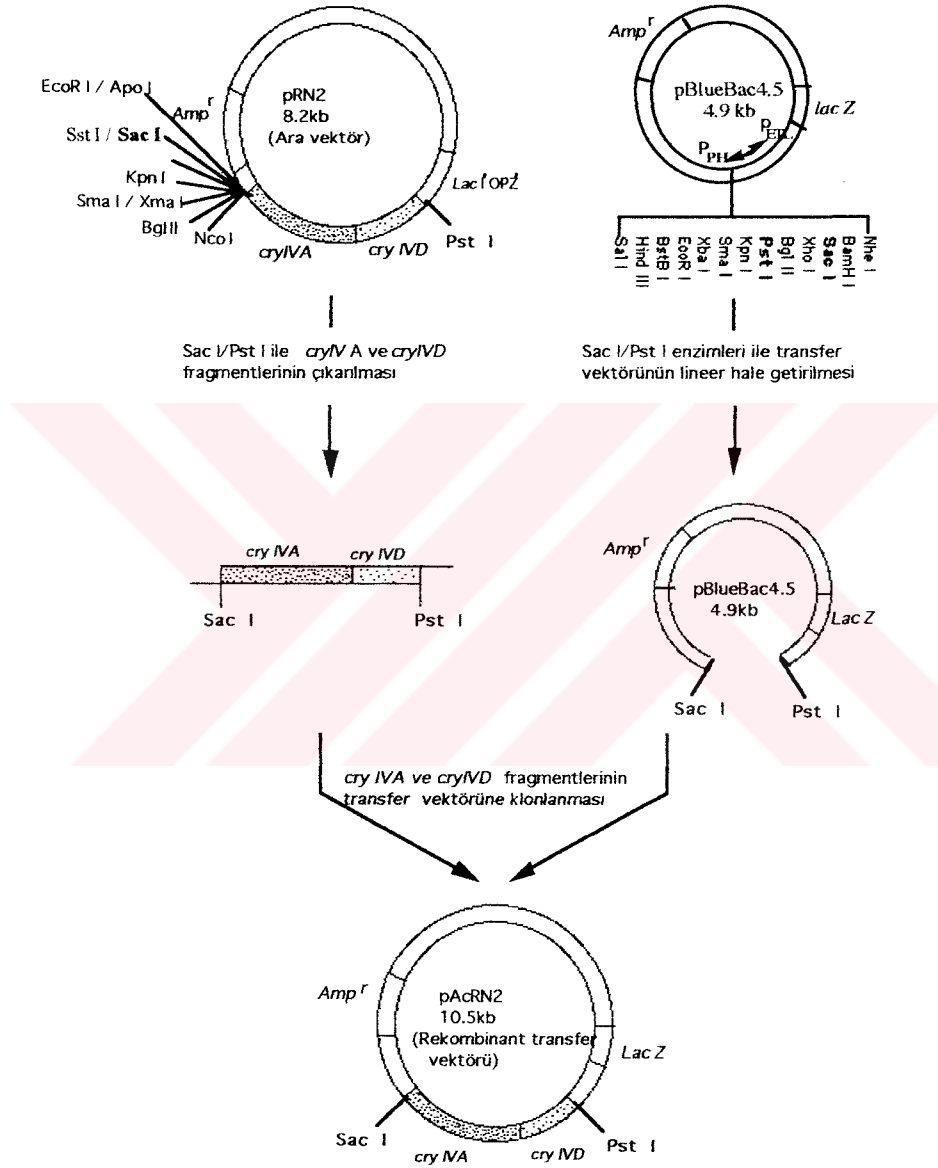


Şekil 6. Rekombinant plazmidlerin %0.8'lik agaroz jelde görüntülenmesi.1: pAMP18 (kontrol), 2-5: *cryIVAD* genlerini ihtiva eden muhtemel klonlar.



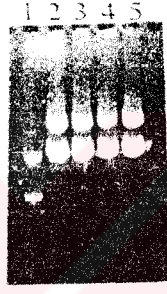
Şekil 7. pRN2'nin restriksiyon analizi. 1. pAMP18 (kesilmemiş), 2. pRN2 (kesilmemiş), 3. pRN2 (*Nco* I/*Pst* I ile kesilmiş), 4. moleküler ağırlık standardı.

*cryIVAD* geni pRN2 plazmidinden *Sac* I/*Pst* I restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkartıldıktan ve jelden temizlendikten sonra yine aynı enzimler ile kesilmiş pBlueBac4.5 (4.9 kb) transfer vektörüne *E. coli*'de klonlandı (Şekil 8). Rekombinant baculovirüs transfer vektörü olan bu plazmid pAcRN2 (10.5 kb) olarak adlandırıldı.

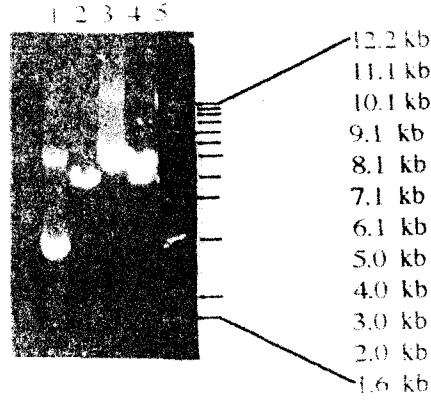


Şekil 8. *cryIVAD* fragmentlerinin baculovirüs transfer vektörüne klonlanması.

*cryIVAD* gen fragmentlerinin transfer vektörü pBlueBac4.5'e klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek için, ampisiline dirençli kolonilerin 4 tanesinden plazmid DNA izole edildi. Bu klonların DNA'ları %0.8'lik jelde yürütülerek pBlueBac4.5 ile büyüklük bakımından karşılaştırıldı. Dört plazmidin de agaroz jelde pBlueBac4.5'den daha geride gittiği gözlemlendi (Şekil 9). pAcRN2 (10.5 kb) olarak adlandırılan bu rekombinant plazmidlerden biri *Sac I/Pst I* enzimleri ile kesilerek *cryIVAD* genlerini doğru oryantasyonda bulundurduğu doğrulandı (Şekil 10). pAcRN2 transfeksiyon için kullanıldı.



Şekil 9. Baculovirüs transfer vektörünün seçilmesi ve %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüleri. 1: pBlueBac4.5, 2-5: *cryIVAD* genlerini ihtiva eden pBlueBac4.5 (pAcRN2)

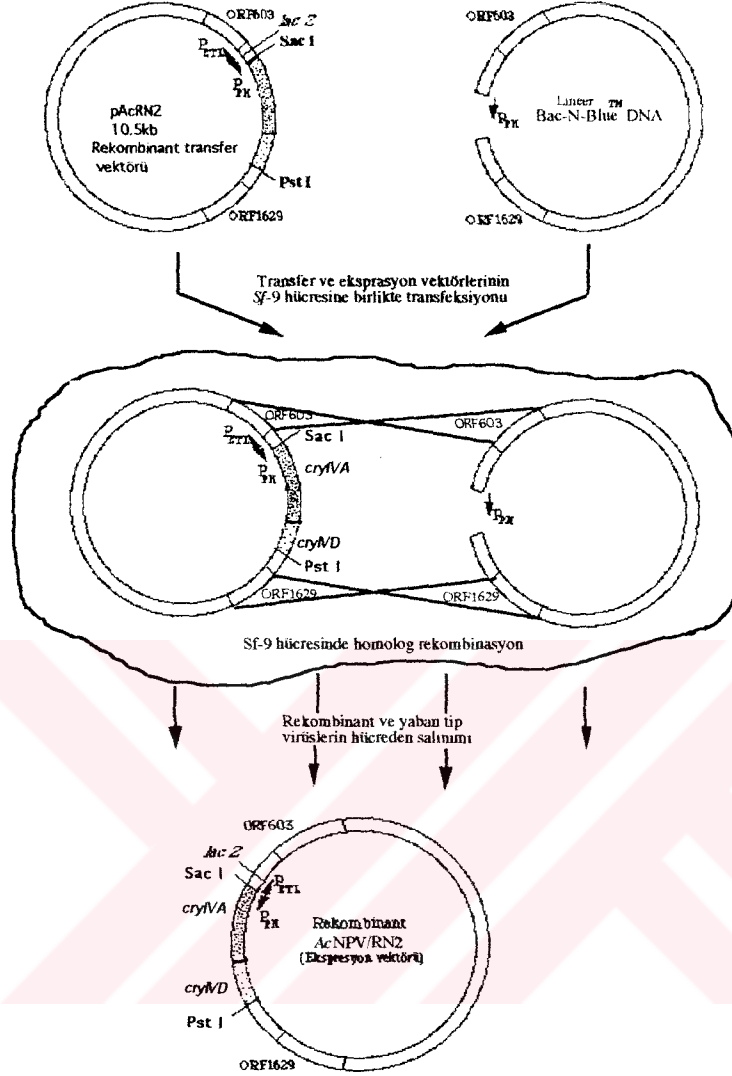


Şekil 10. Baculovirüs transfer vektörünün agaroz jel analizi.

1. pBlueBac4.5 (kesilmemiş), 2. pBlueBac4.5 (*Sac I/Pst I* ile kesilmiş), 3. pAcRN2 (kesilmemiş), 4. pAcRN2 (*Sac I/Pst I* ile kesilmiş), 5. moleküler ağırlık standardı

### 3.2. Ekspresyon Vektörü ile Transfer Vektörünün *S. frugiperda* Hücrelerine Transfeksiyonu

*AcNPV*'nin genomu direkt insersiyon için oldukça büyük olduğundan, yabancı genin genoma sokulması homolog rekombinasyon ile gerçekleştirildi. Rekombinasyon yüzdesini arttırmak için *AcNPV*'nin *Bsu36 I* ile lineer hale getirilmiş DNA'sı kullanıldı. Bunun için rekombinant transfer vektörü, lineer hale getirilmiş *AcNPV* DNA'sı (Bac-N-Blue DNA) liposom karışımı ile birlikte *S. frugiperda* hücre kültürüne transfekt edildi. Hücreye giren transfer ve ekspresyon vektörlerinin her ikisinde birbiri ile rekombinasyon oluşturacak homolog bölgelere sahiptir. Bu homolog bölgeler birleşerek iki vektör arasında fragment değişimi oldu. Böylece, transfer vektöründeki *cryIVAD* genlerinin fragmentleri homolog rekombinasyonla *lac Z* işaret geniyle birlikte ekspresyon vektörünün *polh* geni promotorunun arkasına yerleşmiş oldu (Şekil 11).



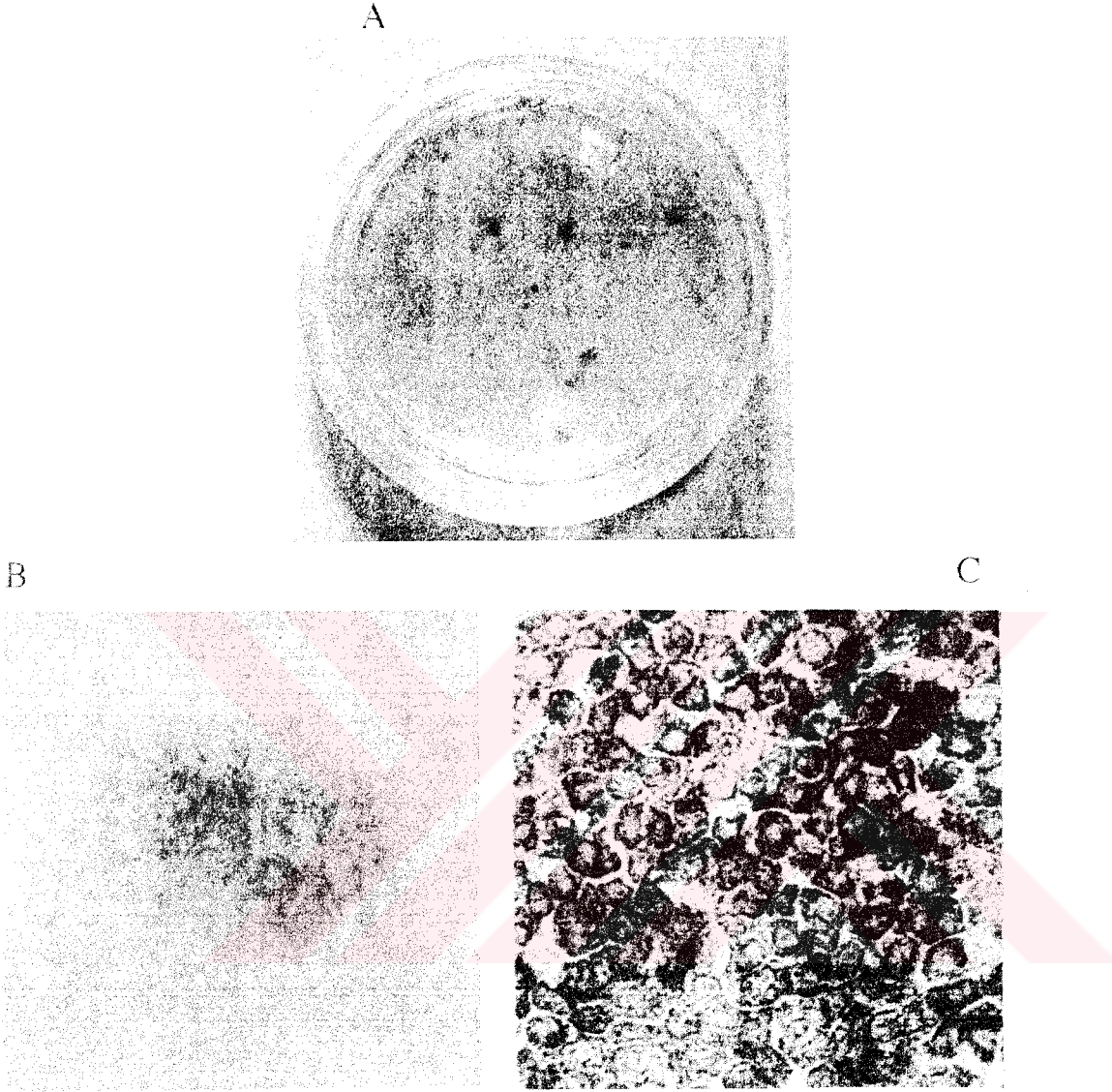
Şekil 11. *cryIVAD* fragmentlerinin baculovirüs ekspresyonu vektörüne klonlanması.



### 3.3. Plak Deneyi ile Rekombinant Virüsün Seçimi ve Saflaştırılması

Transfeksiyon işleminin kontrolü ve rekombinant baculovirüs'ün saflaştırılması "plak deneyi" ile gerçekleştirildi. Virüs seyreltikleri kullanılarak yapılan plak deneyinde bir rekombinant virüs sadece bir hücreyi enfekte edebildi. Burada çoğaldıktan sonra hücre parçalandı. Açığa çıkan yavru virüsler ortam katı olduğundan uzağa gidemeyip, ancak yakın çevredeki hücreleri enfekte edebildiler. Bir hücre normal şartlarda tek bir virüs tarafından enfekte edildiği için, hücrede oluşan ve diğer hücreleri enfekte eden virüsler aynı genomik yapıya sahip ve saf virüslerdir. Çevredeki hücrelerinde enfekte olmasıyla, 5. günde petrilerde ölü hücrelerden oluşan bir "plak" meydana geldi. Plak oluşturan virüslerin ihtiva etikleri *lac Z* geninin faaliyeti sonunda, daha önce ortama ilave edilmiş olan X-gal parçalandı ve mavi renkli plaklar oluştu. Bu rengin oluşumu ekspresyon vektörünün *cryIVAD* genlerine ait fragmentleri almış olduğunu gösterdi (Şekil 12).

Plak deneyi toplam 3 kez tekrarlandı. 1. plak deneyi sonucunda bir petriden alınan bir plak ile 2. plak deneyi, 2. plak deneyi sonucunda yine bir petriden alınan bir plak ile 3. plak deneyi yapıldı ve neticede saf rekombinant virüs elde edildi.



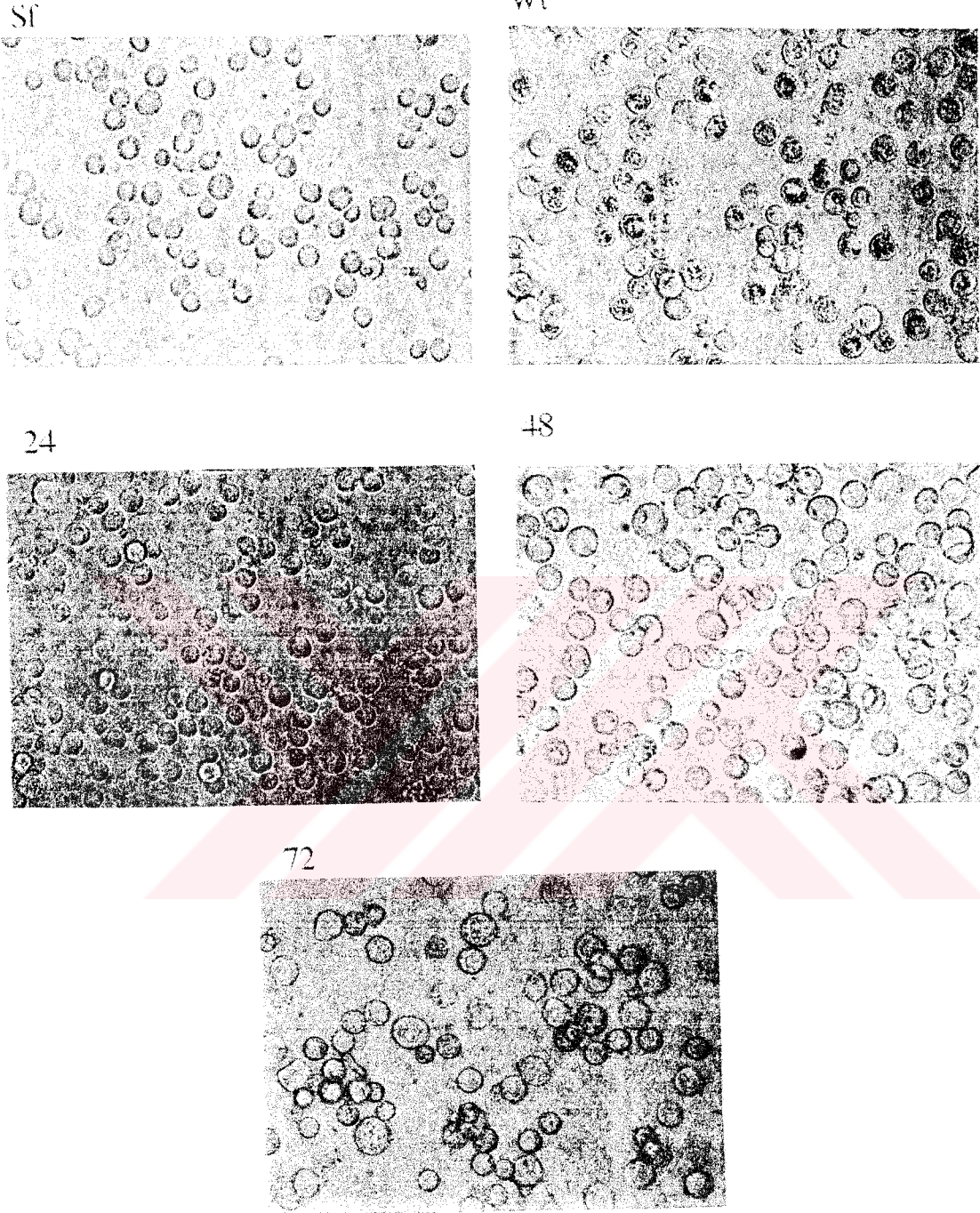
Şekil 12. Rekombinant virüslerin oluşturduğu plakların görünümleri. A: petrideki tüm plaklar, B: tek bir plak (10x1.5), C: plakta bulunan hücreler (10x40).

### 3.4. Yüksek Konsantrasyonlu Virüs Stoğu Hazırlanması

Rekombinant virüsten yüksek konsantrasyonlu virüs stoğu üretimi için, Sf-9 hücreleri plak oluşturan virüsler tarafından enfekte edildi. Enfeksiyonlar 8 gün boyunca 28°C'de inkübe edildi. Virüs stoğunun konsantrasyonunu plak yöntemiyle tespit edildi. Plak deneyi daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 10<sup>-6</sup>. seyreltikte 22 plak, 10<sup>-7</sup>. seyreltikte ise 8 plak gözlemlendi. Virüs konsantrasyonu [1/seyreltik sayısı x plak sayısı = pfu (plak oluşturan ünite)/ml (ml'deki virüs sayısı)] formülü kullanılarak hesaplandı. Buna göre virüs konsantrasyonu (350 µl içinde) [1/10<sup>-6</sup> x 22 x 1.000/350 = 6.27x10<sup>-7</sup> pfu/ml], 10<sup>-7</sup>. seyreltikde ki ise (350 µl içinde) [1/10<sup>-7</sup> x 8 x 1.000/350= 2.28x10<sup>8</sup> pfu/ml] olarak tespit edildi. Her iki seyreltiğin ortalaması alınarak [(6.27x10<sup>-7</sup> + 2.28x10<sup>8</sup>)/2 = 1.4x10<sup>8</sup> pfu/ml] ortalama virüs konsantrasyonu (titer) tespit edildi.

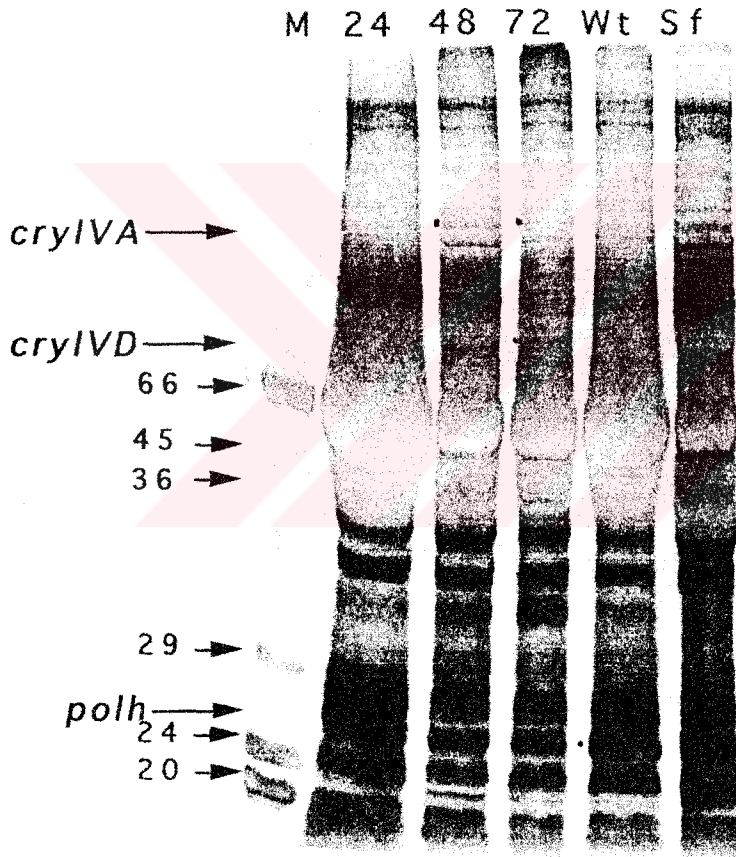
### 3. 5. Rekombinant Proteinlerin Üretilmesi ve SDS-PAGE Analizi

Rekombinant proteinin ekspresyon zamanının belirlenmesi için 6 gözlü kültür kabında enfeksiyon yapıldı. Her bir göze 10<sup>6</sup> hücre kondu ve kabın üç gözü 1.4x10<sup>4</sup> pfu/ml konsantrasyonlu rekombinant virüs stoğu ile MOI=10'a göre (100 µl) enfekte edildikten sonra 24, 48 ve 72 olarak işaretlendi. Rekombinant virüs ile enfekte olmamış diğer üç gözden bir tanesi kontrol olarak orijinal tip virüs ile enfekte edilirken, diğer bir göze ise enfeksiyon yapılmadı. Rekombinant virüs ile enfekte olmuş gözlerden birincisindeki sıvı 24 saat sonra tabandaki hücreler ile birlikte mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi ve 3.000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet -30°C'de muhafaza edildi. Diğer gözlerde belirlenen saatlerde aynı işlemler uygulandı. Yaban tip virüs ile enfekte edilen ve hiç enfeksiyon yapılmayan gözlerdeki sıvılar 48 saat sonra alındı. Enfeksiyondan 48 saat sonra yaban tip virüsler ile enfekte olmuş hücrelerde PIB'ler oluşurken, rekombinant virüs ile enfekte olmuş hücrelerde PIB oluşmamakla birlikte, hücrelerde şekil bozuklukları, parlaklıklarını kaybetme ve yaban tipe yakın bir ölüm oranı olduğu görüldü (Şekil 13).



Şekil 13. Rekombinant AcNPV ile enfekte olmuş Sf-9 hücreleri. Sf: enfekte olmamış, Wt: yaban tip virüs ile enfekte olmuş, Rakamlar: enfeksiyondan sonra geçen süreyi saat olarak göstermekte, büyütme: 200X

Tüm peletler biraraya getirilerek protein örnekleri hazırlandı. 24. 48. ve 72. saatlere ait protein örnekleri ile kontroller (orijinal tip virüs ile enfekte olmuş *S.frugiperda* hücresi protein örnekleri ile enfekte olmamış *S. frugiperda* hücresi protein örnekleri) % 8'lik jelde elektroforez edildi. Jel gümüş nitrat ile boyandı. *cryIVA*'nın kodladığı 134 kDa'luk ve *cryIVD*'nin kodladığı 72 kDa'luk protein bantları jelde görüntüledi (Şekil 14). Orijinal tip virüs ile enfekte olmuş hücrelerde *polh* promotörü önünde polihedrin genini kodlayan sıralar varken, bunun yerine rekombinant virüste *cryIVAD* genlerine ait proteinleri kodlayan sıralar vardır. Bu nedenle orijinal tip virüste polihedrin proteini bantı görülürken, rekominant tipte bu bant oluşmamış, bunun yerine 72 kDa'luk ve 134 kDa'luk iki farklı bant oluşmuştur.



Şekil 14. Rekombinant proteinlerin SDS-PAGE Analizi. *S. f.* enfekte olmamış, W: orijinal tip virüs ile enfekte olmuş, 24, 48, 72: rekombinant virüs ile enfeksiyondan sonra geçen zaman (saat), M: ağırlıkları bilinen standart protein molekülleri ( $\times 10^3$  Da).

#### 4. TARTIŞMA

Kimyasal insektisitler, etkilerini çabuk göstermeleri ve ucuz oluşlarından dolayı uzun yıllardan beri ziraat ve ormancılıkta zararlı böceklerin kontrolünde kullanılmaktadırlar.

Ancak kimyasal insektisitler uygulandıkları alanda uzun süre kalarak insan sağlığını tehdit etmeleri, zararlı olmayan organizmalarıda olumsuz yönde etkilemeleri ve bu insektisitlere karşı böceklerin dirençlilik geliştirmeleri nedeniyle eski ilgilerini kaybetmişlerdir.

Kimyasal insektisitlerin bu olumsuz etkileri, insanları biyolojik olarak güvenilir alternatiflerin araştırılması yoluna sevketmiştir. Baculovirüs'ler insanlarda ve yararlı organizmalar üzerinde enfeksiyon oluşturmamaları, sadece Lepidoptera, Hymenoptera ve Coleoptera gibi birkaç grup üzerinde etkili olmaları bakımından böcek virüsleri arasında en çok ilgi çekenlerdir (50).

Bu avantajlarına rağmen baculovirüs'ler biyolojik kontrol ajanı olarak yaygın bir şekilde kullanılamamaktadırlar. Bunun nedenleri arasında yaban tip virüs enfeksiyonunun yavaş olması, konak spektrumlarının dar olması, UV ışığına karşı dayanıksız olmaları sayılabilir. Moleküler yöntemler uygulanarak baculovirüs enfeksiyonunun kısa süre içerisinde meydana gelebilmesi, insektisidal etkilerinin ve konak spektrumlarının genişletilmesi mümkündür (23).

Baculovirüs ekspresyon vektör teknolojisi sayesinde AcNPV'nin enfeksiyon gücü, böcek için spesifik toksinler (örn. *Bacillus thuringiensis* toksinleri), hormonlar ve hormonları ayarlayan enzimleri kodlayan genler virüs genomuna dahil edilerek geliştirilmektedir (2).

Baculovirüslerin ekspresyon vektörü olarak kullanılmaları iki çok geç (VL) genin promotorları, *polh* ve *p10*'nın gücünden kaynaklanmaktadır. Bu genler enfekte olmuş hücrelerde virüs replikasyon siklusunun en geç safhasında fazla miktarda ekspres edilip *in vitro* virüs replikasyonu için gerekli değildirler. Bu genlerin açık okuma zincirleri (ORF) diğer genlerinki ile kolaylıkla değiştirilebilir ve böylelikle yabancı genler yüksek seviyede ekspreslenirler (1).

Martens ve arkadaşları (2) bir çalışmalarında *B. thuringiensis*'e ait *cryIA(b)* geninin rekombinant bir baculovirüs tarafından *polh* promotörü altında, böcek hücrelerinde ifadesini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen *cryIA(b)* gen ürününün *Pieris brassicae* larvaları üzerinde yüksek derecede toksik olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada da *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*'e ait insektisidal kristal proteinlerini (ICP) kodlayan *cryIVA* ve *cryIVD* genlerinin böcek hücrelerinde (*Spodoptera frugiperda*), AcNPV'ü kullanılarak ifadesi yapılmıştır.

Bunun için öncelikle *B. thuringiensis*'e ait *cryIVAD* genlerinin kodlayan bölgesi bir ara transfer vektörüne, oradan da baculovirüs transfer vektörü pBlueBac4.5'e aktarıldı. pBlueBac4.5 bir transfer vektörünün sahip olması gereken tüm özelliklere (32); konak içerisinde replike olmasını sağlayan bir replikona, kolayca tanınmasını sağlayan bir işaret genine, yabancı DNA'nın klonlanmasında hareket genişliği sağlayan özel restriksiyon endonükleaz kesme noktalarına, klonlanmış DNA'nın ekspresyonu için uygun kontrol elementleri, promotor ve ribozom bağlanma bölgelerine ve ekspresyon vektörü ile uygun homolog bölgelere sahip bir vektördür. Transfer vektörü böylece polihedrin genine ait kodlayan bölgeden mahrum fakat, askı bölgelerine sahip ve işaret geni taşıyan bir plazmidir.

*cryIVAD* genlerini ihtiva eden transfer vektörü Bsu 36I ile lineer hale getirilmiş viral DNA ile karıştırıldı ve IPLB-SF-9 böcek hücrelerine transfekte edildi. Hücre içindeki konak enzimleri, *cryIVAD* genleri ile viral DNA'daki homolog bölgeler arasında rekombinasyon olmasını sağladılar. Viral DNA'nın lineer olması normalde %0.1-1 olan rekombinasyon yüzdesini (54), %24'lere çıkarmıştır.

Çalışmada *polh* geni yerine klonlanan *cryIVAD* genlerinin, normal olarak polihedrin proteini kadar sentezlenmeleri beklenmekteydi. Ancak bu böyle olmadı. Jel fotoğrafında da görüldüğü gibi polihedrin proteini oldukça kalın bir bant oluştururken, *cryIVAD* proteinleri ise ince bantlar oluşturmuşlardır. Buna neden olarak *cryIVAD*'nin pAMP18'den çıkartılırken başına eklenen dört enzim bölgesini gösterebiliriz. Muhtemelen *cryIVAD*'nin başına eklenen bu dört enzim bölgesi, polihedrin

promotorunun *cryIVAD* proteinlerinin sentezini yavaşlatmasına sebep olmuştur.

Bu çalışma neticesinde elde edilen rekombinant virüs ve proteinin, ilerki çalışmalarda, enfeksiyon özelliğinin test edilmesi düşünülmektedir. Bu numunelerin çeşitli sebze ve meyve zararlılarına karşı etkilerine bakılması faydalı olacaktır.





## 5. SONUÇLAR

1. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*'e ait insektisidal kristal proteinlerini kodlayan *cryIVAD* genlerinin kodlayan bölgeleri, *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüsü (AcNPV, Baculovirüs)'ndeki polihedrin (*polh*) promotorunun arkasına yerleştirilerek rekombinant virüs oluşturuldu.

2. Neticede insektisidal kristal proteinlerini kodlayan *cryIVAD* genlerinin baculovirüs ekspresyon vektör sisteminde ekspresyonları gerçekleştirildi.

3. Orijinal tip ve rekombinant virüsten elde edilen protein örneklerinin SDS-PAGE analizleri neticesinde orijinal tipte 28 kDa'luk polihedrin proteininin varlığı gözlenirken, rekombinant virüste bu proteinin varlığına rastlanılmadı.

4. Rekombinant virüste polihedrin promotorunun arkasına yerleştirilen *cryIVA* ve *cryIVD* genlerinin 72 ve 134 kDa'luk protein bantları SDS-PAGE ile tespit edildi.

5. Zirai açıdan önemli olan aktif proteinlerin *in vitro* olarak baculovirüs ekspresyon vektör sisteminde üretilme imkanları geliştirildi.

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda elde edilen rekombinant baculovirüs zirai mücadele maksadıyla endüstri bitkilerine, sebzelere ve meyvelere zarar veren böceklere karşı kullanılabilir.

Benzer çalışmalar neticesinde tıbbi, zirai ve ekonomik açıdan önemli olan proteinlerin üretildiği baculovirüs ekspresyon vektör sistemleri, geliştirilerek ülke ekonomisine önemli ölçüde katkıda bulunulabilir.

Aynı zamanda bu çalışmanın dünyada çok popüler olan moleküler viroloji ve hücre kültürü araştırmaları için üniversitemizde bir temel oluşturduğu kanaatindeyim.



## 7. KAYNAKLAR

1. Bilimoria, S.L.: The Biology of Nuclear Polyhedrosis Viruses: Viruses of Invertebrates, Inc.,1, New York, 1991.
2. Martens, J.W.M., Honee, G., Zuidema, D., Van Lent, J.W.M., Visser, B. ve Vlak, J.M., Insecticidal Activity of a Bacterial Crystal Protein Expressed by a Recombinant Baculovirus in Insect Cells, Appl. Environ. Microbiol., 56 (1990) 2764-2770.
3. Atkinson, A.E., Earley, F.G.P., Beadle, D.J. ve King, L.A., Expression and characterization of the chick nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit in insect cells using a baculovirus vector, Eur. J. Biochem., 192 (1990) 451-458.
4. Ray, R., Galinski, M.S. ve Compans, R.W., Expression of the Fusion Glycoprotein of Human Parainfluenza Type 3 Virus in Insect Cells by a Recombinant Baculovirus and Analysis of its Immunogenic Property, Virus Res., 12 (1989) 169-180.
5. Baum, J.A., Geever, R. ve Giles, N.H., Expression of  $qa$ -1f Activator Protein: Identification of Upstream Binding Sites in the  $qa$  gene Cluster and Localization of the DNA-binding Domain, Mol. Cell. Biol., 7 (1987) 1256-1266.
6. Jasny, B.R., Insect Viruses Invade Biotechnology, Science, 238 (1987) 1263 -1563.
7. MaxBac<sup>R</sup> 2.0 Transfection and Expression Manual, Version D, Catalog no. K835-01, Invitrogen.
8. Demirbağ, Z. ve A.O. Beldüz, Baculovirus'un Biyolojik Mücadeledeki Önemi. T. Biyoloji Dergisi, 20 (1997) 49-58.
9. Fraser, M. J. Ultrastructural Observations of Vira miktarda üretilebilmektedir (*galifornica* Nuclear Polyhedrosis Infected *Spodoptera frugiperda* Cell Cultures. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res., 95 (1987) 189-195

10. Granados, R.R. ve Williams, K.A., *In Vivo* Infection and Replication of Baculoviruses: The Biology of Baculoviruses, Granados, R.R. ve Federici, B.A., (II). Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 89,1986.
11. Hershberger, P. A., Dickson, J. A., ve Friesen, P. D., Site-specific Mutagenesis of the 35-kilodalton Protein Gene Encoded by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: Cell Line-Specific Effects on Virus Replication. J. Virol., 66 (1992) 5525-5533.
12. Charlton, C.A. ve Volkman, L.E. Penetration of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells Induces Actin Cable Formation. Virology., 197 (1993) 245-254.
13. Granados, R.R. ve Lawler, B.A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* Baculovirus Invasion and Infection. Virology, 108 (1981) 297-308.
14. Filipssen, J. T. M., Martens, J.W.M., van Oers, M.M., Vlak , J.M. ve van Lent, J.W.M. Passage of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus through the Midgut Epithelium of *Spodoptera exigua* Larvae, Virology, 207 (1995) 000-000.
15. Blissard, G.W. ve Wentz, J.R. Baculovirus gp64 Envelope Glycoprotein is Sufficient to Mediate pH-dependent Membrane Fusion. J. Virol., 66 (1992) 6829-6835.
16. Clem, R.J., Robson, M. ve Miller, L.K. Influence of Infection Route on the Infectivity of Baculovirus Mutants Lacking the Apoptosis-Inhibiting Gene *p35* and adjacent gene *p94*. J. Virol., 68 (1994) 6759-6762
17. Devlet İstatistik Enstitüsü (D. İ. E.), Dış Ticaret İstatistikleri, Ankara, 1987.
18. Miller, L.K., Baculoviruses as Gene Expression Vectors. Ann. Rew. Microbial., 42 (1988) 177-199.
19. Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J. ve Faulkner, P., A cytopathological investigation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virüs *p10* gene Function Using Insertion/deletion Mutant., Journal of General Virology. 70 (1989) 187-202.

20. Smith, G. E., Fraser, M. J., ve Summers, M. D., Molecular Engineering of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene. J. Virol., 46 (1983) 584-593.
21. Blisard, G.W. ve Rohrmann, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol. 35 (1990) 127-155.
22. Steinhaus, E.A. Microbial Control: The emergence of an idea. J. Agric. Sci., 26 (1956) 107-160.
23. Maeda, S., Kamita, S.G. ve Kondo, A. Host range Expansion of Characterization of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) following Recombination of a 0.6-Kilobase-Pair DNA Fragment Originating From *Bombyx mori* NPV. Journal of Virology, 67 (1993) 6234-6238.
24. Martens, J. Development of a Baculovirus Insecticide Exploiting the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein, Cip-Data Koninklijke Bibliotheek, Den-Hag, Hollanda, 9.,1994
25. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 4, Ankara, 1995.
26. Çanakçıoğlu, H., Zararlı Böceklerle Savaş, İstanbul Üniv., Orman Fak. Yayınları, İstanbul, 1971.
27. Demirbağ, Z., Beldüz A.O.ve Demir.İ., Baculovirus'un Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması. T. Biyoloji Dergisi., (baskıda).
28. Vlak, J. M., A. Schouten, M. Usmany, G. J. Belsham, E. C. Klinge-Roode, A. J. Maule, J. W. M. van Lent ve D. Zuidema., Expression of a Cauliflower Mosaic Virus Gene I using a Baculovirus Vector Based upon the p10 Gene Using a Novel Selectin Method. Virology, 179 (1980) 312-320.
29. Smith, G.E., Summers, M.D. ve Fraser, M.J., Production of human  $\beta$ -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol., 3 1983 2156-2165.

30. Pennock, G.D., Shoemaker, C. and Miller, L.K., Strong and Regulated Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in Insect Cells with a Baculovirus Vector. Mol. Cell. Biol., 4 (1984) 399-406.
31. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M., Production of Human  $\alpha$ -interferon in Silkworm Using a Baculovirus Vector. Natura, 315 (1985) 592-594.
32. Morikava, Y., Overton, H.A., Moore, J.P., Wilkinson, A.J., Brady, R.L., Lewis, S.J. ve Jones, I.M., Expression HIV-1 gp120 and Human Soluble CD4 by Recombinant Baculoviruses and their Interaction *in vitro*. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 6 (1990) 765-773.
33. Pease, E.A., Aust, S.D. ve Tien, M., Heterologous Expression of Active Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Using the Baculovirus Expression System. Biochem. Biophys. Res. Comm., 179: 897-903, 1991.
34. Bustos, M.M., Luckow, V.A., Griffing, L.R., Summers, M.D. and Hall, T.C., Expression, Glycosylation and Secretion of Phaseolin in a Baculovirus System, Plant. Mol. Biol., 10: 475-488, 1988.
35. Iatrou, K. ve Meidinger, R.G., Tissue-specific Expression of Silkworm Chorion Genes *in vivo* Using *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Transducing Vector, Proc. Natl. Acad. Sci., 87 (1990) 3650-3654.
36. Fiebich, B., Hug, H. and Marme, D., High-efficiency Expression of Rat Protein Kinase C- $\gamma$  in Baculovirus-infected Insect Cells, FEBS Lett., 277 (1990) 15-18.
37. Jarvis, D.L. ve Summers, M.D., Glycosylation and Secretion of Human Tissue Plasminogen Activator in Recombinant Baculovirus-Infected Cells, Mol. Cell. Biol., 9 (1989) 214-223.
38. Nishimura, C., Yamoaka, T., Mizutani, M., Yamashita, K., Akera, T. ve Tanimota, T., Purification and Characterization of the Recombinant Human Aldose Reductase expressed in the Baculovirus System, Biochim. Biophys. 1078 (1991) 171-178.

39. Hoss, A., Moarefi, I., Scheidtmann, K. H., Cisek, L. J., Corden, J. L., Dornreiter, I., Arthur, A. K. ve Fanning, E., Altered Phosphorylation Pattern of Simian Virus 40t Antigen Expressed In Insect Cells by Using a Baculovirus Vector, J. Virology , 64 (1990) 4799-4807.
40. Krishna, S., Blacklaws, B. A., Overton, H. A., Bishop, D. H. L. ve Nash, A. A., Expression of Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus Type I in a Recombinant Baculovirus-- Protective Responses and T-cell Recognition of the Recombinant-infected Cell Extracts. J. Gen. Virol., 70 (1989) 1805-1814.
41. Thomsen, D. R., Post, L. E. ve Elhammer, A. P., Structure of O-Glycosidically Linked Oligosaccharides Synthesized by the Insect Cell Line Sf-9, J. Cell. Biochem., 43 (1990) 6779.
42. Lanford, R. E., Expression of SV-40 T Antigen In Insect Cells Using a Baculovirus Expression Vector, Virology, 167 (1988) 72-81.
43. Buss, J. E., Quilliam, L. A., Kato, K., Casey, P. J., Solski, P. A., Wong, G., Clark, R., McCormick, F., Bokoch, G. M. ve Der, C. J., The Carboxyl-terminal Domain of the rap1 a krev-1 Protein is Isoprenylated and Supports Transformation By an h-ras rap 1a Chimeric Protein, Mol. Cell. Biol., 11 (1991) 1523-1530.
44. Maeda, S., Increased Insecticidal Effect by a Recombinant Baculovirus Carrying a Synthetic Diuretic Hormone Gene, Biochem. Biophys. Res. Comm., 165 (1989) 1177-1183.
45. Alnemri, E. S., Maksymowych, A. B., Robertson, N. M. ve Litwack, G., Characterization and Purification of a Functional Rat Glucocorticoid receptor Overexpressed in a Baculovirus system. J. Biol. Chem., 266 (1991) 3925-3936.
46. Hasemann, C. A. ve Capra, J. D., High Level Production of a Functional Immunoglobulin Heterodimer in a Baculovirus Expression System, Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990) 3942-3946.
47. Ingley, E., Cutler, R. L., Fung, M. C., Sanderson, C. J. ve Young, I. G., Production and Purification of Recombinant Human Interleukin-5 from Yeast and Baculovirus Expression Systems, Eur. J. Biochem., 196 (1991) 623-629.

48. Iatrou, K. ve Meidinger, R. G., Bombyx nuclear Polyhedrosis virus- based Vectors for expressing Passenger Genes in Silkworm Cells Under Viral or Cellular Promoter Control, Gene 75 (1989) 59-71.
49. Kitts, P. A. ve Possee, R. D., A Method for Producing Recombinant Baculovirus Expression Vectors at High Frequency, BioTechniques, 14 (1993) 810-817.
50. Ausubel, M.F., Brent, R., Kingston, E.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, A.J. ve Struhl K. Short Protocols In Molecular Biology. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 1990.
51. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 680-685.
52. Hames, B. D. ve Rictwood, D., Gel Electrophoresis of Proteins, Second Edition, Oxford University Press, London, 1990.
53. Martignoni, M.E., Baculovirus: An Attractive Alternative, . In W. Y. Garner and J. Harvey (eds.), Chemicals and Biological Controls in Agriculture and Forestry,ASM,p.51-67, 1984
54. Peakman, T., Page M. ve Gewert D., Increased Recombinational Efficiency in Insect cells Irradiated with Short Wavelength Ultraviolet light. Nucleic Acids Res., 17 (1989) 5403.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1992-1993 öğretim yılında K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1996 yılında bu bölümden biyolog ünvanı alarak birincilikle mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans eğitime başladı ve şu anda Biyoloji Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

