

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MALACOSOMA NEUSTRIA* NÜKLEOPOLİHEDROVİRÜS (ManeNPV)' ÜN
MALACOSOMA DISSTRIA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE *IN VITRO* REPLİKASYONU
VE KONAK SPEKTRUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurten GÜREL

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MALACOSOMA NEUSTRIA* NÜKLEOPOLİHEDROVİRÜS (ManeNPV)'ÜN
MALACOSOMA DISSTRIA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE *IN VITRO* REPLİKASYONU
VE KONAK SPEKTRUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Nurten GÜREL

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10. 06. 2008
Tezin Savunma Tarihi : 04. 07. 2008**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ersan KALAY**

Enstitü Müdür Vekili: Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

“*Malacosoma neustria*” Nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)’ün *Malacosoma disstria* Hücre Kültüründe *In Vitro* Replikasyonu ve Konak Spektrumunun Araştırılması” başlıklı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konunun seçiminde gerekse çalışmaların planlanıp yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, tezin geliştirilip, planlanmasında yardımcı olan hocam Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve tez çalışmalarımın yürütülmesi esnasında desteklerini esirgemeyen başta Mikrobiyoloji Laboratuvarı Araştırma Görevlileri olmak üzere, Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ediyorum ve tez çalışmalarım süresince bana her konuda destek olan aileme minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca, tez çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan (2007.111.004.11) Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırmalar Birimine de teşekkür ediyorum.

Nurten GÜREL
Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLO DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Bakülovirüsler	2
1.2.1. Bakülovirüslerin Yapı ve Sistematığı.....	2
1.2.2. Bakülovirüslerin Virionları	4
1.2.3. Bakülovirüs DNA'sı	5
1.2.4. Bakülovirüs Replikasyonuna Genel Bakış	6
1.2.4.1. Virüsün Konağa Girişi.....	7
1.2.4.2. Nükleokapsid Taşınması ve Kabuğun Atılması	8
1.2.4.3. Virüs Erken Genlerinin İfadesi.....	9
1.2.4.4. Viral DNA Replikasyonu	9
1.2.4.4.1. Erken Sitopatoloji ve Virojenik Stroma	10
1.2.4.5. Geç Gen Ekspresyonu	11
1.2.4.6. En Geç Gen Ekspresyonu ve Viral Birleşme.....	12
1.2.4.7. Sitoliz ve Gömülü Yapıların Salınması	12
1.2.5. Bakülovirüslerin Konak Seçiciliği	13
1.2.6. Bakülovirüs Gen Ekspresyonunun Önemi	15
1.2.7. Bakülovirüslerin Biyoteknolojideki Önemi	17
1.2.8. Tezin Amacı	18

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1.	Hücreler, Besiyeriler ve Virüs.....	19
2.2.	Primer İnokulumun Elde Edilmesi.....	19
2.3.	Stok Virüs Üretimi.....	20
2.4.	Stok Virüs Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	20
2.5.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücrelerde Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi.....	21
2.6.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücrelerde Üretilen Ekstrasellüler Virüslerin Çoğalma Eğrisi.....	21
2.7.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyonu ile Belirlenmesi.....	22
2.7.1.	Prob Geliştirme.....	22
2.7.1.1.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs DNA'sının İzolasyonu.....	22
2.7.1.2.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs DNA'sının PCR ile Çoğaltılması.....	22
2.7.1.3.	PCR Ürününün Elde Edilmesi ve Probenin İşaretlenmesi.....	23
2.7.2.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Nitroselüloz Membrana Geçirilmesi.....	23
2.7.3.	Hibridizasyon.....	24
2.8.	ManeNPV-Protein Sentezinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi.....	25
2.9.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüsün <i>In Vitro</i> Konak Spektrumu.....	26
2.9.1.	Farklı Hücre Kültürlerinin ManeNPV ile Enfeksiyonu ve Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi.....	26
2.9.2.	ManeNPV ile Enfekte Olan Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Ekstrasellüler Virüs Miktarları.....	26
2.9.3.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyonu ile Belirlenmesi.....	27
3.	BULGULAR.....	28
3.1.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüsünün Md203 Hücrelerindeki Verimliliği.....	28
3.2.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Md203 Hücrelerinde Meydana Gelen Sitopatik Etkiler.....	28
3.3.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Md203 Hücrelerinde Ekstrasellüler Virüs Üretim Eğrisi.....	32
3.4.	Md203 Hücrelerinde <i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonu.....	33

3.5.	<i>Malacosoma neustria</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Md203 Hücrelerindeki Protein Profilleri	34
3.6.	Farklı Hücre Kültürlerinde ManeNPV'nin Replikasyon Özellikleri.....	35
3.6.1.	ManeNPV ile Enfekte Olan Farklı Hücre Kültürlerinde Meydana Gelen Sitopatik Etkiler	35
3.6.2.	ManeNPV ile Enfekte Olan Farklı Hücre Kültürlerinde Ekstrasellüler Virüs Üretimi.....	44
3.6.3.	Farklı Hücre Kültürlerinde ManeNPV'nin DNA Replikasyonu	45
4.	TARTIŞMA.....	46
5.	SONUÇLAR.....	56
6.	ÖNERİLER	57
7.	KAYNAKLAR.....	58
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Çalışmada, *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ün *Malacosoma disstria* Md203 hücre kültüründeki replikasyonu araştırıldı. Enfeksiyon, sitopatik etkiler, ekstrasellüler virüs üretimi ve virüs çoğalma eğrisi, polihedral inklüzyon yapı oluşumu, viral DNA replikasyonu ve viral yapısal proteinlerin sentezi ile belirlendi.

ManeNPV ile enfekte Md203 hücrelerinde sitopatik etkilerin (CPE) enfeksiyondan 24 saat sonra meydana geldiği görüldü. İlk polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu enfeksiyondan 36 saat sonra gözlemlendi. Enfeksiyondan 4 gün sonra hücrelerin çoğunun kültür kabının tabanından koptuğu tespit edildi. Hücrelerde, granülleşme, yuvarlaklaşma, parçalanma ve nükleusun kararması gibi tipik NPV sitopatik etkileri görüldü. Ekstrasellüler virüs (BV) üretiminde önemli miktarda artış enfeksiyondan 48 saat sonra gözlemlendi. Enfeksiyondan 96 saat sonra Md203 hücrelerinde 10^3 kat ekstrasellüler virüs üretildiği belirlendi. Viral DNA replikasyonunun enfeksiyondan 24 saat sonra başladığı slot blot hibridizasyonu ile belirlendi. Viral proteinlerin sentezi poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlendi ve polihedrin proteini enfeksiyondan 36 saat sonra ortaya çıktığı tespit edildi.

ManeNPV'nin konak spektrumunu belirlemek amacıyla Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücreleri ManeNPV ile enfekte edildi. Hücrelerin virüse olan duyarlılıkları; CPE'lerin tespiti, ekstrasellüler virüs üretimi ve DNA replikasyonu ile belirlendi. Tn5 ve LdElta hücrelerinin tipik NPV CPE'lerini gösterdikleri ve ManeNPV için üretken hücre kültürleri oldukları tespit edildi. Her iki hücrede de üretilen BV miktarının enfeksiyondan 120 saat sonra 10 kat arttığı belirlendi. Aynı zamanda viral DNA replikasyonunun Tn5 ve Md203 hücrelerine göre LdElta hücrelerinde daha yüksek seviyede olduğu gözlemlendi.

Tüm sonuçlar ManeNPV'nin Md203 hücre kültüründe verimli olarak üretildiğini gösterdi. Üretkenlik seviyesinin tipik üretken bakülovirüs enfeksiyonuna eşdeğer ve ManeNPV-Md203 sisteminin bilimsel ve ticari olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Bakülovirüs, ManeNPV, Md203 Hücre Kültürü, Virüs Replikasyonu, Konak Spektrumu

SUMMARY

Replication of *Malacosoma neustria* Nucleopolyhedrovirus in *Malacosoma disstria* Cell Line and Investigation of the Host Range

In this study, replicational properties of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) in Md203 cell line derived from *Malacosoma disstria* were investigated. Infection was determined by cytopathic effects (CPE), budded virus (BV) production and viral growth curve, polyhedral inclusion body (PIB) formation, viral DNA replication, and synthesis of viral structural proteins.

CPEs were determined 24 h p.i. in ManeNPV infected Md203 cells. The first PIB formation was detected at 36 h p.i. It was determined that the most cells detached from the bottom of the culture plate four days post infection. Typical NPV cytopathic effects (CPE) like granulated and rounded cells, disruption and darkening were observed. Significant increase in BV production was observed 48 h p.i. 10^3 times extracellular virus production was determined in Md203 cells at 96 h p.i. The viral DNA replication which was started 24 h p.i. was identified by slot blot hybridization. Viral protein synthesis was determined by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) and polyhedrine synthesis was observed at 36 h p.i. in Md203 cells.

To determine the host range of ManeNPV Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1 and Cf-124T cell lines were infected with ManeNPV. The susceptibility of the cells to the virus were determined by CPE's, extracellular virus production and DNA replication. It was observed that Tn5 and LdElta cells showed typical NPV CPE's and they were determined as productive cell lines for ManeNPV. Extracellular virus production at both cell lines was increased 10 times 120 h.p.i. Also it was observed that viral DNA replication in LdElta was at high level compared to Tn5 and Md203 cell lines.

All these results showed that ManeNPV is produced efficiently at Md203 cell culture. This productivity level is observed as equivalent to typical productive baculovirus infection and it is determined that ManeNPV-Md203 system has scientific and commercial usage potential.

Key Words: Baculovirus, ManeNPV, Md203 Cell Line, Virus Replication, Host Range

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Bakülovirüslerin genel yapı ve sistematığı.....	3
Şekil 2.	Bakülovirüs partiküllerinin ultrayapısal görüntüsü	4
Şekil 3.	Bakülovirüs virion fenotiplerinin karşılaştırılması.....	5
Şekil 4.	Bakülovirüs enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi	8
Şekil 5.	Bakülovirüs replikasyonu ve gen ekspresyonu safhaları.....	16
Şekil 6.	ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde 0, 24, 36 ve 48. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler	30
Şekil 7.	ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde 60, 72, 84 ve 96. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler	31
Şekil 8.	ManeNPV'nin Md203 hücrelerinde çoğalma kinetiği	33
Şekil 9.	ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde viral DNA Replikasyonu	34
Şekil 10.	ManeNPV ait proteinlerin Md203 hücrelerinde üretilmesi.....	35
Şekil 11.	ManeNPV ile enfekte olan Tn5 hücreleri.....	37
Şekil 12.	ManeNPV ile enfekte olan LdElta hücreleri	38
Şekil 13.	ManeNPV ile enfekte olan Bm-5 hücreleri	39
Şekil 14.	ManeNPV ile enfekte olan Sf21 hücreleri.....	40
Şekil 15.	ManeNPV ile enfekte olan Se-1 hücreleri.....	41
Şekil 16.	ManeNPV ile enfekte olan Cf-124T hücreleri	42
Şekil 17.	ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücreleri.....	43
Şekil 18.	ManeNPV ile enfekte olan Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 Hücrelerindeki BV Üretimi.....	44
Şekil 19.	ManeNPV ile enfekte Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 hücrelerinde viral DNA replikasyonu	45

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Çeşitli hücre suşlarının ManeNPV ile enfeksiyonu.....	55
--	----

SEMBOLLER DİZİNİ

BV	: Tomurcuklanan virüs
CPE	: Sitopatik etki
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FBS	: Fetal bovin serum
GV	: Granulozis virüs
ManeNPV	: <i>Malacosoma neustria</i> nükleopolihedrovirüs
Md203	: <i>Malacosoma disstria</i> hücre kültürü
NOV	: Gömülü olmayan virüs
NPV	: Nükleopolihedrovirüs
MNPV	: Çok nükleokapsidli nükleopolihedrovirüs
MOI	: Hücre başına düşen enfeksiyon yapan virüs sayısı
OB	: Gömülü yapı
ODV	: İnklüzyondan elde edilen virüs
OV	: Gömülü virüs
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PIB	: Polihedral inklüzyon yapı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNPV	: Tek nükleokapsid nükleopolihedrovirüs
vDNA	: Viral deoksiribonükleik asit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs (ManeNPV), *Baculoviridae* familyasına ait bir böcek virüsüdür. Bakülovirüsler, ziraat ve ormancılıkta büyük zararlar oluşturan böceklere karşı kullanılan alternatif ve güvenilir biyolojik mücadele etmenleridir. Ayrıca, bakülovirüsler önemli gen ürünlerinin üretilmesinde ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılırlar. Aynı zamanda, insanlarda hastalık oluşturan DNA virüsleri için iyi bir model oluşturlar (Szewczyk vd., 2006).

Bakülovirüsler, geniş bir virüs grubu olup, özellikle böceklerde bulunurlar (Theilmann vd., 2005). Konakları sadece omurgasızlarla sınırlı olduğundan, tek başına veya pestisidler ve diğer kimyasal etmenlerin kullanıldığı ekolojik zararlı mücadele programlarında, önemli böcek zararlılarının kontrolü için kullanılma potansiyeline sahip faydalı etmenlerdir (Moscardi, 1999; Inceoglu vd., 2001; Lacey vd., 2001). Bu virüslerin biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmasının pek çok avantajı vardır. Bunların başında dar konak spektrumuna sahip olmaları, yani direkt hedeflendikleri organizmalar üzerinde etkili olmaları ve bir kez doğaya uygulanmayla 4-5 yıl etki göstermeleri gelmektedir. Ayrıca, insanlar üzerinde zarar oluşturmamaları ve çevreyi kirletmemeleri açısından da oldukça büyük önem arz ederler.

Rekombinant bakülovirüsler, farklı ökaryotik genleri araştırmak ve biyoteknolojik uygulamalarını arttırmak için böcek hücrelerinde üretilirler (Miller, 1989; Luckow, 1991; O'Reilly vd., 1992; Yin vd., 2007). Bakülovirüsler, günümüzde besin maddesi olarak ihtiyaç duyulan bazı proteinlerin üretilmesinde ve çeşitli genlerin tanımlanmasında, oldukça geçerli olan ve etkili sonuçların alındığı biyoteknolojik çalışmalarda da önemli bir materyal haline gelmiştir (Demirbağ vd., 1998; Demir vd., 2000; Ghosh vd., 2002; Kost ve Condreay, 2002; Summers, 2006). Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminin kullanılmasıyla, birçok hastalığa karşı tedavi amacıyla kullanılan proteinlerin üretilmesi, ilaç hammadde eksikliğinin giderilmesi (Vlak ve Keus, 1990) ve çeşitli organizmalara ait genlerin tanımlanması sağlanmıştır. Öte yandan, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik, viral ve fungal genlerin bu virüsler aracılığıyla eksprese edilmeleri, bu virüsleri biyoteknolojide önemli kılmaktadır (O'Reilly vd., 1992; Volkman,

1995; Demirbağ vd., 1998; Beljelarskaya, 2002).

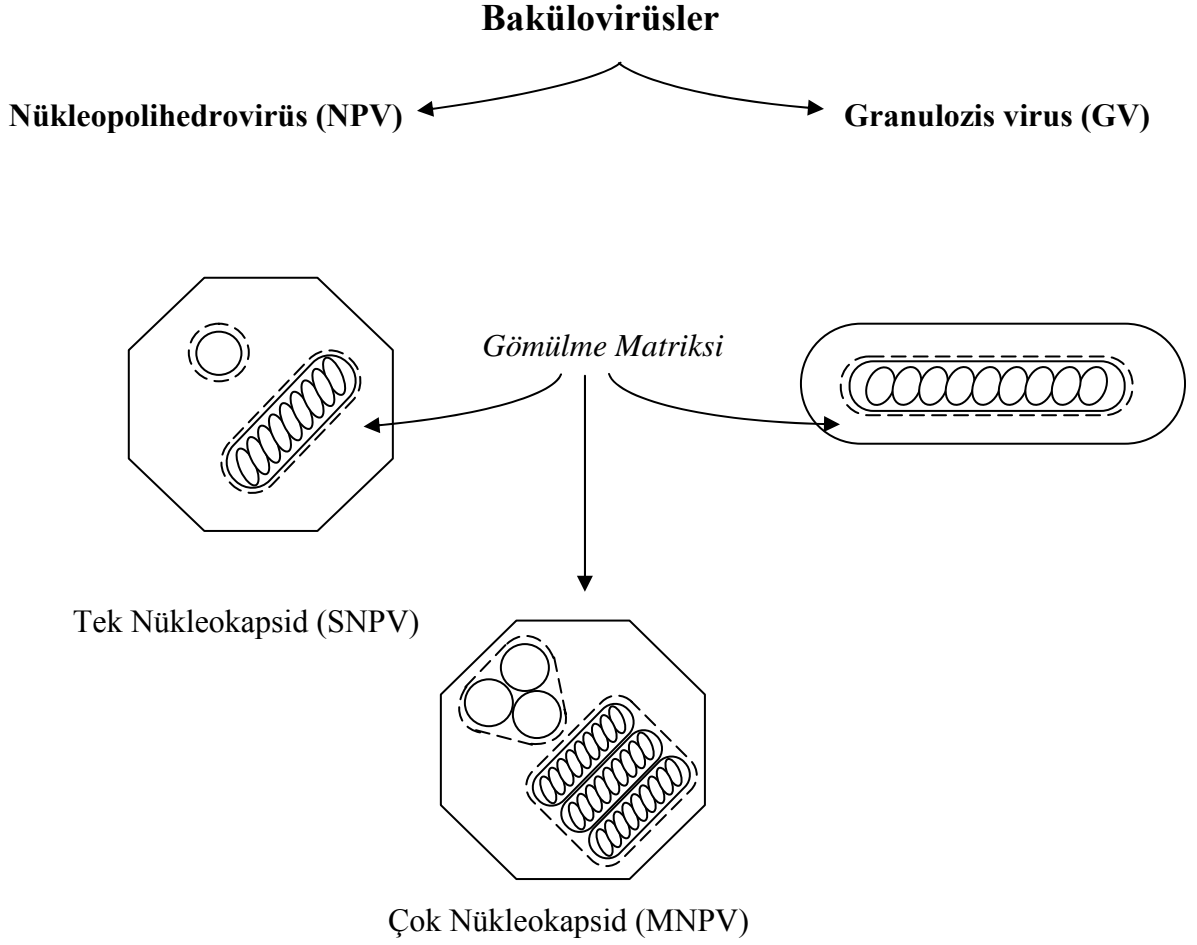
Genomları prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan daha küçük olmasına rağmen, bakülovirüsler gen yapısı ve düzeyleri bakımından bu organizmaların genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadır (Blissard ve Rohrmann, 1990; Bilimoria, 1991).

1.2. Bakülovirüsler

1.2.1. Bakülovirüslerin Yapı ve Sistematığı

Bakülovirüslerin genel yapısı incelendiğinde, öz kısmında dairesel ve çift zincir DNA genomu olduğu görülür (Şekil 1). Bunun dışı, p36 adında bir proteininden yapılmış bir kapsid ile çevrilidir. DNA ile kapsid nükleokapsid olarak adlandırılır. Nükleokapsid ise en dışta, zarf olarak adlandırılan membran yapısındaki bir örtü ile çevrilidir ve tüm bu yapı virion olarak adlandırılır.

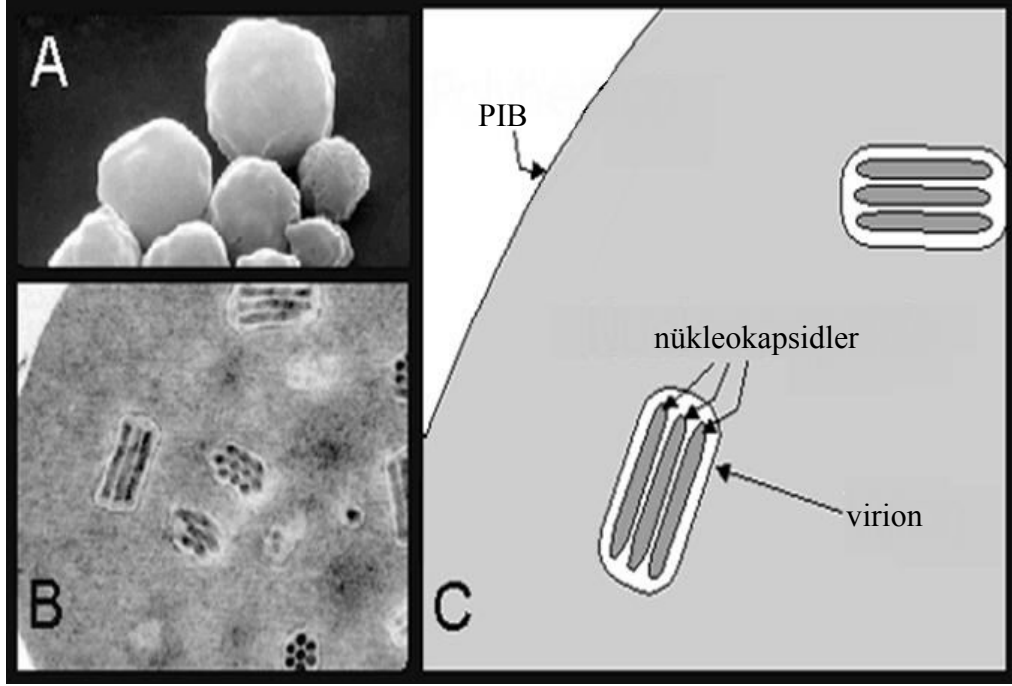
Bakülovirüsler polihedrin veya granulin proteininden oluşan gömülü yapılar içinde bulduklarından gömülü virüsler olarak adlandırılırlar (Şekil 1). Bunlar, sekizgen ve oval şeklindeki inklüzyon yapılarına göre nükleopolihedrovirüs (NPV, polihedrin proteinine gömülü) ve granulozis virüs (GV, granulin proteinine gömülü) olarak iki ana gruba ayrılırlar. Bunlardan NPV'ler de kendi aralarında tek nükleokapsid (SNPV, zarf içerisinde tek nükleokapsid bulunan) ve çok nükleokapsid (MNPV, zarf içerisinde birden fazla nükleokapsid bulunan) olmak üzere ikiye ayrılır.



Şekil 1. Bakülovirüslerin genel yapı ve sistematığı. NPV: Polihedrin proteinine gömülü virionlar (nükleopolihedrovirüs), GV: Granulin proteinine gömülü virion (granulozis virüs) (van Oers ve Vlak, 2007)

MNPV'ler, 1-18 nükleokapsidin bir zarf içerisine gömülmesinden oluşur (Şekil 1 ve Şekil 2). Sonra bu zarfa sahip virüsler (virionlar), polihedrin (28 kDa) olarak bilinen tek bir proteinden oluşmuş kristal benzeri yapılar içerisine gömülür. Hücre kültürü çalışmalarında bu virüslerden en başarılı olarak kullanılanı, çok nükleokapsidli nükleopolihedrovirüs (MNPV)'lerdir. MNPV'lerin farklı çok sayıda hücre suşunda çoğalmaları ve polihedrin proteininden yapılmış polihedral inklüzyon yapı (PIB) ile çevrili olmaları, bunların başarılı bir şekilde zirai mücadele çalışmalarında kullanılmalarının nedenidir. İçine gömüldükleri PIB, virüsün böcek savunma mekanizmalarına karşı direnç kazanmasını sağlar. PIB'ler aynı zamanda doğada virüs enfeksiyonlarını böcekte böceğe transfer eden, enfeksiyon özelliğine sahip yapılardır. PIB'lerin böcek hücre kültürü için enfeksiyon yapma özelliği

yoktur. Bakülovirüslere ait PIB'lerin büyüklükleri 1-15 µm arasındadır. Hücre kültüründe enfeksiyon yapan virüsler ise hücrelerden zarf kazanarak salınan tomurcuklanan virüslerdir (BV).

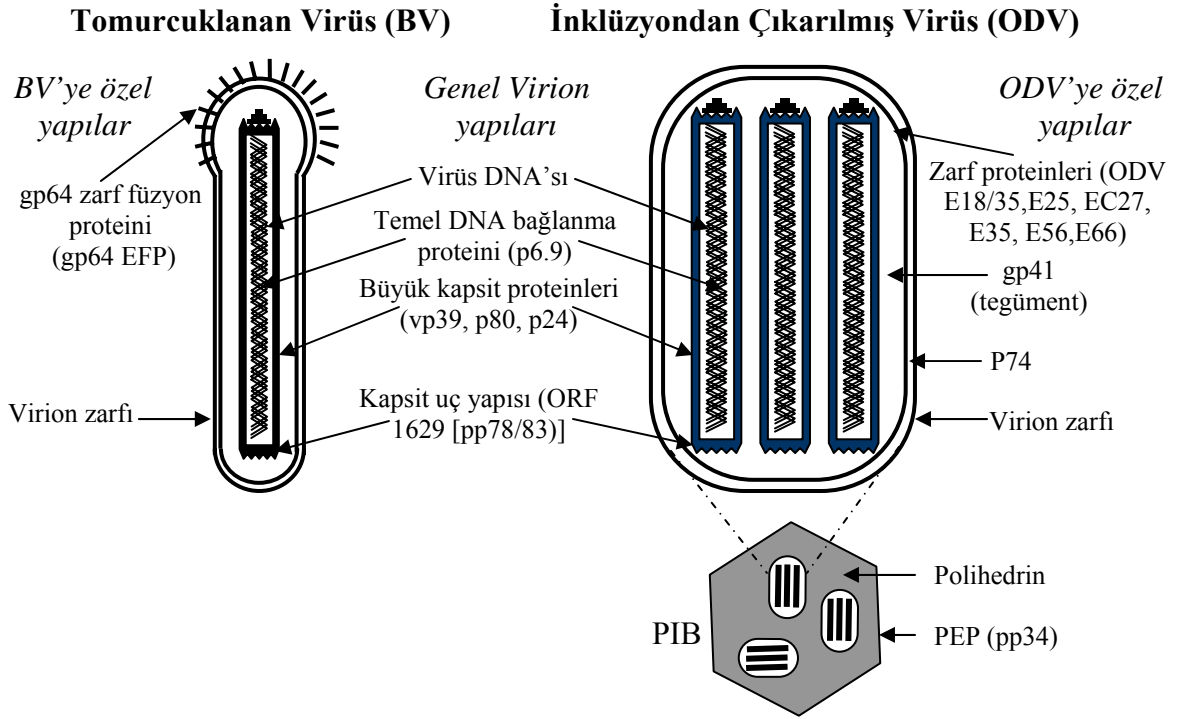


Şekil 2. Bakülovirüs partiküllerinin ultrayapısal görüntüsü, A: Polihedral inklüzyon yapı (PIB, doğada böcekte böceğe enfeksiyonun yayılmasını sağlayan yapı), B: Çok nükleokapsidli bir NPV'ye ait PIB'nin enine kesiti, C: PIB'nin enine kesit diyagramı (URL-1)

1.2.2. Bakülovirüslerin Virionları

Baculoviridae familyasında, enfeksiyonun yayılmasında özel fonksiyonlara sahip olduğu bilinen iki virion fenotipi tespit edilmiştir (Şekil 3). Bunlar, hücrelerin farklı bölgelerinde ve enfeksiyon döngüsünün farklı zamanlarında üretilir. Şüphesiz farklı fonksiyonel rollere hizmet ederler. Hücreye girişleri de farklı mekanizmalarla meydana gelir. Tomurcuklanan virüs (BV)'ler enfeksiyonun geç döneminde, nükleokapsidlerin enfekte hücre yüzeyinden tomurcuklanmasıyla meydana gelir. Böylece, BV zarfları konak hücrenin modifiye olmuş plazma membranından oluşur. En geç enfeksiyonda nükleokapsidler gömülü virüsleri (OV) oluşturmak için nükleus içerisinde zarf kazanır. Bundan sonra OV, bir inklüzyon matris proteini (NPV'lerde polihedrin, GV'lerde

granulin) içine gömülür. Hem BV hem de OV'lerin nükleokapsidleri nükleus içinde oluştuğu için BV ve OV'nin nükleokapsid ve viral DNA'larının aynı olmasına rağmen (Şekil 3), BV ve OV zarfları ve birleşmiş yapılarının kompozisyonları temelde farklıdır. Bu farklar BV ve ODV'lerin (inklüzyondan çıkarılmış virüs) farklı fonksiyonel rollere sahip olmalarıyla sonuçlanır.



Şekil 3. Bakülovirüs virion fenotiplerinin karşılaştırılması. Bu şekildeki ODV, çok nükleokapsidli NPV'ye aittir. Ortada gösterilen proteinler hem BV hem de ODV için ortak olan proteinlerdir. Soldaki proteinler BV için, sağdaki proteinler ise ODV için özel proteinlerdir (Blissard, 1996)

1.2.3. Bakülovirüs DNA'sı

Bakülovirüsler, 25x250 nm büyüklükte ve 80-180 kbp dairesel ve çift zincir, süpersarmal DNA ihtiva ederler (Arif, 1986; Hayakawa vd., 2000; Theilmann vd., 2005). Bazı nükleopolihedrovirüslerin DNA'ları tanımlanmış (Bud ve Kelly, 1984; Ayres, vd., 1994; Ahrens, vd., 1997; Gomi vd., 1999; Kuzio vd., 1999) ve restriksiyon endonükleazlar kullanılarak, genetik haritaları elde edilmiştir (Friesen ve Miller, 1986; Hyink vd., 1998; Sadler vd., 2000). Haziran 2007 itibarıyla 41 bakülovirüse ait komple genom dizin

analizleri tamamlanmıştır (van Oers ve Vlaskamp, 2007; Long, 2007). Bu dizin analizleri karşılaştırıldığında birçok bakülovirüs izolatının bir diğerinden küçük oranlarda farklı olduğu ve bu farkların da delesyon ve inversiyon mutantlarıyla meydana geldiği görülür. Temelde bakülovirüs genomları benzer gen içeriklerine sahiptir. Genomda kodlanan genlere ilave olarak genoma yerleşmiş durumda homolog bölge (*hr*)'ler olarak bilinen birkaç küçük tekrar sıraları vardır. Genomda birden fazla olabilen bu bölgelerin erken gen transkripsiyonunu arttırdığı ve replikasyon orijini olarak davrandığı gösterilmiştir (Kool vd., 1993; Bjornson vd., 1992).

1.2.4. Bakülovirüs Replikasyonuna Genel Bakış

Hücre kültürlerinde yapılan ultrayapısal ve histokimyasal çalışmalar, viral DNA replikasyonunun, nukleus içinde "virojenik stroma" olarak adlandırılan bölgede meydana geldiğini göstermiştir (Volkman ve Keddie, 1990; Slack ve Arif, 2007). Bu replikasyon işlemi iki safhada meydana gelir.

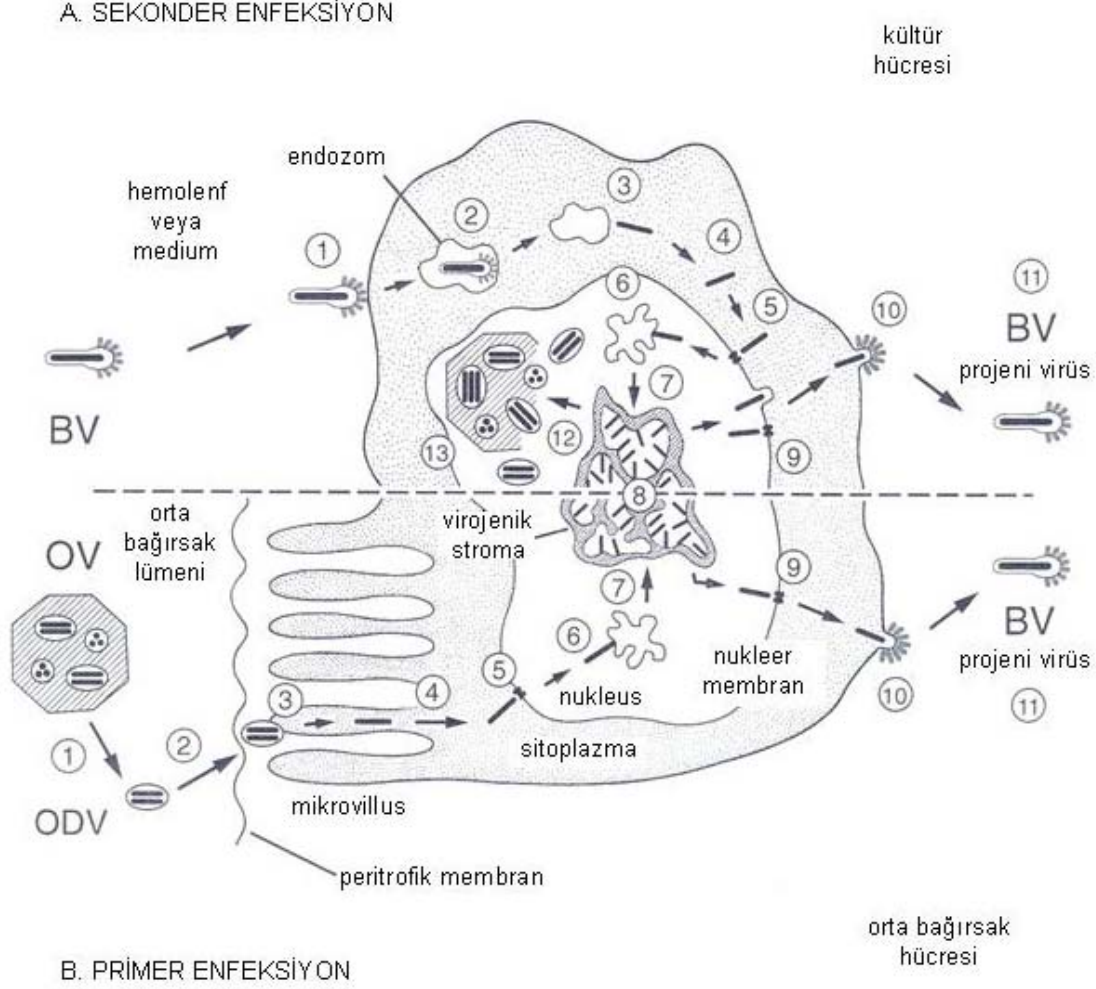
A: *In vitro* sistemde veya konakta hücreler arasında meydana gelen BV enfeksiyonu (Sekonder enfeksiyon): Zarflı BV'ler hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunur (1. adım) ve endositozis ile hücreye girerler (2. adım). Viral zarf ile endozomun füzyonu (3. adım) sonucunda nükleokapsidler sitoplazmaya dağılır. Bu nükleokapsidler nukleusa doğru ilerler (4. adım) ve nukleer por ile interaksiyona girerler (5. adım). DNA, nukleusta viriondan salınır (6. adım) ve transkripsiyon başlar (7. adım). Yeni oluşmuş virojenik stroma ile birleşme gerçekleşir, viral DNA replike olur ve nükleokapsidlerin içerisine paketlenir (8. adım). Geç fazda, nükleokapsidler nukleustan çıkar (9. adım), plazma membranına doğru hareket eder ve ekzositozis ile buradan tomurcuklanarak salınırlar (10. adım). Böylece, virüs zarf proteini sağlanmış ve enfektif BV'ler de üretilmiş olur (11. adım). Oluşan bu zarflı virüsler (Budded virüs, BV) konak organizmalarda ve hücre kültüründe, hücreler arasında enfeksiyon yapma özelliğine sahip, çomak şeklinde virüs formlarıdır. Çok geç fazda, nükleokapsidler tekrar nukleusa döner, burada zarf kazanır (12. adım) ve OV oluşturmak üzere bir polihedrin matriksine gömülür (13. adım). Hücrenin parçalanmasıyla OV'ler yayılır (şekil 4).

B: OV ile bir orta bağırsak hücresinin enfeksiyonu (Primer enfeksiyon): Böcek tarafından beslenme yoluyla alınan OV'nin kristal yapısı orta bağırsak lümeninde alkali ortam nedeniyle çözülür (1. adım). ODV'ler lümene yayılır ve bağırsak epitel hücrelerine

girmek üzere peritrofik membranı geçerler (2. adım). ODV zarfı ile mikrovillus membranı füzyon olayı ile kaynaşır (3. adım). Nükleokapsidler sitoplazmaya dağılır ve buradan nukleusa hareket ederler (4. adım). Diğer replikasyon olayları (5-11. adımlar) kültür hücrelerindeki gibi gerçekleşir.

1.2.4.1. Virüsün Konağa Girişi

Virüsün konağa giriş işlemi, inklüzyondan elde edilen virüslere göre BV'de daha fazla çalışılmış ve mekanik olarak her iki virüste de giriş işleminin farklı olduğu görülmüştür (Volkman ve Keddie, 1990). BV'ler, böceklerde enfeksiyonun yayılmasında rol oynayan virüs formlarıdır (Keddie vd., 1989). Bu fenotipik form, hücre kültürü uygulamalarında virüs üretiminde kullanılan etmenlerdir. Zarflı virüslerin hücreye girişi ya direk hücre yüzeyine membran füzyonu ya da zarf füzyon proteini (gp64 EFP) tarafından gerçekleştirilir. Virüs, reseptör tarafından gerçekleştirilen endositozis yoluyla hücreye girer. Endositozis yoluyla virüsün hücreye girişi genellikle 1) virionun bir konak hücre reseptörüne bağlanması, 2) konak plazma membranının invajinasyonu, 3) zarflı virionları ihtiva eden bir endositik vesikül oluşumu, 4) endozomun asidifikasyonu, 5) virüs zarf füzyon proteininin aktivasyonu, 6) viral ve endozomal membranların füzyonu ve 7) viral nükleokapsidlerin sitoplazma içine salınımını ihtiva etmekte olan çok basamaklı bir işlemdir. BV, plazma membranına bağlandıktan ve virionun bir endositik vesikül içine alınmasından sonra, nükleokapsidler sitoplazmaya dağılmadan önce membran füzyonu oluşmalıdır.



Şekil 4. Bakülovirüs enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi (Friesen ve Miller, 2001).

1.2.4.2. Nükleokapsid Taşınması ve Kabuğun Atılması

Bakülovirüs nükleokapsidleri sitoplazmaya girdikten sonra nukleusa taşınır. Bu işlem hakkında az şey bilinmesine rağmen, konak hücre aktin ipliklerinin enfeksiyonun erken safhalarında rol oynadığı düşünülmektedir. Aktin, çeşitli hücresel aktiviteleri (hücre hareketi, fagositozis, sekresyon, vb.) ve hücresel yapıları kapsayan, hücrelerde bol miktarda bulunan bir hücresel proteindir. Bakülovirüs DNA'sının kabuk atılması nukleus dışında veya nukleusta oluşur. Elektron mikroskobu çalışmaları, iki bakülovirüs grubunda (NPV ve GV) viral DNA kabuğunun atılma yerlerinde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. NPV'lerin nükleokapsidlerinde kabuğun atılması konak hücre nukleusunda

gerçekleşmesine rağmen (Granados, 1978), GV nükleokapsidlerinin sitoplazmada kaldığı ve viral DNA'nın nukleer porlardan nukleusa girdiği gösterilmiştir (Summers, 1971).

1.2.4.3. Virüs Erken Genlerinin İfadesi

Nukleusta kabuğun atılmasından sonra ilk önce replike olmamış viral DNA, bir konak RNA polimerazı tarafından transkrip edilir. Erken viral transkripsiyonların çoğunun, fungal toksin olan alfa (α) amanitin tarafından inhibe edilen, konak RNA polimeraz tarafından gerçekleştiğine inanılmaktadır (Fuchs vd., 1983). Bazı bakülovirüs erken genlerinin transkripsiyonları ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Pullen ve Friesen, 1995). Elde edilen sonuçlar bakülovirüs erken genlerinin promotor sıralarının böcek RNA polimeraz II promotorlarına benzer olduğunu göstermiştir.

1.2.4.4. Viral DNA Replikasyonu

Bakülovirüs DNA replikasyonu virogenik stroma içerisinde (Volkman ve Keddie, 1990) yapısal oluşumlar ile birlikte gerçekleşir (Knudson ve Harrap, 1976) ve virüs tarafından kodlanan 126 kDa DNA polimeraza bağlıdır (Wang ve Kelly, 1983; Tomalski vd., 1988). Bazı konak hücre bileşenlerinin kullanımları hariç, DNA replikasyon mekanizmasının büyük bir kısmının virüs tarafından kodlandığı düşünülmektedir. Viral DNA sentezi enfeksiyondan 6-8 saat sonra başlar ve enfeksiyondan 18 saat sonrasına kadar uzayarak en az 12 saat devam eder (Erlandson ve Carstens, 1983). *p143* olarak isimlendirilen başka bir viral gen, bilinen helikaz proteinlerine homolog 7 bölgeye sahiptir (Lu ve Carstens, 1992). Son yıllarda rastgele komplementasyon deneyi, böcek hücrelerinde plazmid DNA replikasyonu için ihtiyaç duyulan önemli *trans*-aktifleyici faktörleri ortaya çıkarmıştır. Bir çalışmada kozmid klonların birlikte transfeksiyonu, viral DNA replikasyonu için önemli olan en az 7 geni kodlayan 6 genom bölgesinin aydınlatılmasını sağlamıştır (Kool vd., 1994a; Rapp vd., 1998). Bu deney, viral DNA replikasyonu için *p126* (DNA polimeraz) ve *p143* (helikaz) genlerinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Öteki analizler, ie-1 ve geç enfeksiyon faktörleri (lef) 1, 2 ve 3'ü kodlamakta olan viral genlerin de zorunlu olduklarını ve viral DNA replikasyonunun, p35, ie-2 (önceki ie-n) ve pe38 proteinleri tarafından uyarıldığını göstermiştir (Kool vd., 1994b).

1.2.4.4.1. Erken Sitopatoloji ve Virojenik Stroma

Konak hücre iskeletindeki erken morfolojik değişiklikler, NPV'nin böcek hücrelerine girişine bağlıdır ve F-aktin paketlerinin oluşumuna sebep olan mikrofilamentlerin geçici değişimlerini kapsar (Charlton ve Volkman, 1993). Virionların bu alanları kullanarak kabuğun atılması için hücre nukleusuna göç ettiğine inanılmaktadır. ODV ile enfeksiyonda böcek orta bağırsak hücrelerine nükleokapsid girişten sonra, sitoskeletal elementler arasından nukleusa göç ettiği de rapor edilmiştir (Granados, 1978). Bu durum, genel bir transfer mekanizmasını desteklemektedir ve iki fenotipteki aynı nükleokapsidler için yayınlanan raporlar ile uyum içerisinde oldukları gösterilmiştir (Rohrmann, 1992). Virüs kapsidleri böcek orta bağırsak hücre nukleusunda enfeksiyondan sonra 2-4 saat içerisinde görülebilir (Granados, 1978). Bu durum, hücre kültür sisteminde hücre nukleusunda enfeksiyondan 1-3 saat sonra görülenlere benzerdir (Knudson ve Harrap, 1976). İnokülasyonun 1-4 saat sonrası, genel olarak bakülovirüslerin penetrasyonu ve kabuk atılması için gerekli zaman olduğu düşünülmektedir.

Enfekte olmuş hücrelerde ilk göze çarpan önemli değişiklik nukleusun büyümesiyle birlikte hücrelerin yuvarlaklaşmasıdır. Nukleer heterokromatin kaybolur ve virojenik stroma olarak bilinen bir intranukleer viral replikasyon merkezi oluşur (Volkman ve Knudson, 1986; Vaughn ve Dougherty, 1985). Bu çok erken morfolojik olaylar, yapısal proteinlerin ve viral DNA (vDNA) sentezi ile geç (gama) faz gen ekspresyonunun başlamasının aynı zamanda meydana geldiğini göstermektedir.

Morfolojik olarak nukleus kanallarına benzeyen nukleer membranın kıvrılmaları, sıklıkla enfeksiyondan sonra erken zamanlarda görülür ve yüksek metabolik aktiviteye veya viral replikasyona bağlı olarak karyoplazmik değişikliklerin devamına yansiyabilir. Bu değişikliklerin oluşması geçicidir ve virojenik stroma oluşumu ile aynı zamanda meydana gelebilir.

İçerisinde projeni virionların birleştiği virojenik stromanın, bakülovirüs enfeksiyonunun bir *de novo* ürünü olduğu düşünülür. Stroma, vDNA'nın replikasyonu başladığı zaman (yaklaşık enfeksiyondan 6-8 saat sonra) oluşur (Knudson ve Harrap, 1976) ve ondan hemen sonra projeni virüs partikülleri stromal ağla örülür (yaklaşık enfeksiyondan 10 saat sonra). Başlangıçta stroma, nukleoplazmaya baştan başa yayılmış veya gevşek olarak görülür. Fakat, enfeksiyondan 16-18 saat sonra genellikle nukleusun merkez bölgesinde yer alan ve içerisinde virionun nukleer sarılmasının ve gömülü yapı

oluşumunun gerçekleştiği, peristromal halka bölgesi oluşumuna sebep olan sıkı bir yapı içerisine yoğunlaşır. Elektron mikroskopuyla incelendiğinde olgun stromada iki büyük bölge görülür. Bunlar, büyük “kromatin kütle”yi oluşturan bir fibrilar elektro-yoğun cisim ve aralara serpilmiş elektronca yoğun intrastromal yerlerdir (Harrap, 1972; Summers, 1971; Young vd., 1993).

1.2.4.5. Geç Gen Ekspresyonu

Enfeksiyonun geç fazı, alfa amanitin dirençli RNA polimeraz aktivitesinin ve geç genlerin transkripsiyonlarının görülmesiyle belirlenir (Gruha vd., 1981). Bakülovirüs ile enfekte olmuş hücrelerden alınan nukleer ekstraktlar, geç promotorlardan tam transkripsiyon olduğunu desteklemiştir (Glocker vd., 1993). Geç transkripsiyon için ihtiyaç duyulan viral gen ürünlerinin bir kaçı geçici ekspresyon çalışmasıyla aydınlatılmıştır. En az 18 bakülovirüs geni geç ekspresyon faktör veya “*lef*” genleri olarak tanımlanmıştır (Todd vd., 1995). Bu 18 *lef* geninin, 10 tanesi direkt olarak geç transkripsiyonu etkilerken, 9 tanesinin DNA replikasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Kool vd., 1994a; Lu ve Miller, 1995). *lef* genlerine ilaveten, yüksek seviyede eksprese olan en geç genler (*polh* ve *p10* genleri) için özel olarak ihtiyaç duyulan bir viral gen tanımlanmış ve “en geç faktör-1” veya *vlf-1* olarak adlandırılmıştır (McLachlin ve Miller, 1994).

AcMNPV polihedrin geni çalışmaları, transkripsiyonun temel sorumlusu olarak transkripsiyon başlangıç ucunda 8 bp’lik (TAAG-ihativa etmekte olan) bir dizin olduğunu göstermiştir (Rankin vd., 1988; Ooi vd., 1989). Transkripsiyonlarının aşırı derecede olmasından dolayı, *polh* ve *p10* genleri “aşırı derecede eksprese olan” en geç genler olarak adlandırılmıştır. Polihedrin gen promotorlarının karşılaştırılması sonunda TAAG kor dizininin hemen aşağısında AT’ce zengin korunmuş bir dizin olduğu görülmüştür (Rorhmann, 1986). Mutasyonel analizler, polihedrin TAAG’nin hemen yukarısı ve aşağısındaki dizinlerin transkripsiyonlarının fevkelade yüksek seviyede olması için önemli olduğunu göstermiştir (Ooi vd., 1989).

1.2.4.6. En Geç Gen Ekspresyonu ve Viral Birleşme

Enfeksiyonun çok geç fazı, birçok geç faz gen transkripsiyonunun azalması veya kesilmesiyle ve inklüzyon yapı proteini olan polihedrin (Hooft vd., 1983) ve gömülme işlemine iştirak eden p10 proteini gibi en geç gen ürünlerinin bol miktarda ekspresyonuyla karakterize edilir (Zuidema vd., 1993; van Oers vd., 1994). Geç gen ürünlerinin sentezini takiben, nukleus içerisinde nükleokapsid birleşmesi başlar. Boş kapsidler elektronca yoğun olan “virojenik stroma” ile birleşir (Fraser, 1986; Young vd., 1993). İmmünofloresan boyama ile yapılan çalışmalarda, F-aktinin nükleokapsid oluşumunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Charlton ve Volkman, 1991). Viral DNA'nın paketlenildiği nükleokapsidlerin ilk önce birleştiği ve sonra DNA ile doldukları gösterilmiştir (Fraser, 1986). En geç fazda, gömülü yapı proteinleri birleşir ve sonra kristal yapılar nukleus içerisinde bulunan zarflı virionları sarar. Bu gömülme işlemi, inklüzyon yapıyı saran bir protein-karbohidrat “zarf yapısı” (polihedral zarf proteini: PEP veya pp34 ihtiva eden) ilavesiyle tamamlanır (Gombart vd., 1989; Whitt ve Manning, 1988; Rohrmann, 1992) (Şekil 3). Nükleokapsidlerin plazma membranına (tomurcuklanıp BV'yi oluşturmak için) göç etmeleri veya sarılma ve gömülme için nukleus içerisinde kalma mekanizmaları hakkında fazla bir şey bilinmemektedir.

1.2.4.7. Sitoliz ve Gömülü Yapıların Salınması

BV sentezi, enfeksiyonun en geç safhasında, ODV fenotipinin sentezini kolaylaştırmak için hem böcek hem de hücre kültüründe azaltılır. Bakülovirüs enfeksiyonunun en geç fazında, gömülü yapılar üretilip, olgunlaştıktan sonra, bu yapıların dağılmasını kolaylaştırmak üzere bir nukleer parçalanma gerçekleşir (Williams vd., 1989; van Oers vd., 1993). *Spodoptera frugiperda* ve *Trichoplusia ni* hücrelerinde yapılan bir çalışmada parçalanma işleminin yaklaşık olarak, enfeksiyondan 60 saat sonra başladığı ortaya konulmuştur (Williams vd., 1989).

Enfeksiyon döngüsünün en geç fazında, polihedrin sentezi hızlanır ve protein kristalizasyonunun başladığı yer olan nukleusa transfer olur. Bununla aynı anda p10 proteini de bol miktarda üretilir ve hem sitoplazmada hem de nukleusta farklı ipliksi yapılar olarak yoğunlaşır (Williams vd., 1989). Polihedrinin yoğunlaşması esnasında ODV matriks içerisine gömülmüş olarak meydana gelir. Sonunda polihedrozis hastalığından dolayı

böceğin ölmesi, gömülü yapıların (OB) etrafa saçılmasıyla ve etraftaki yüzeylerin bu yapılarla bulaşmasıyla sonuçlanır. OB'lerin saçılmaları muhtemelen, virüs tarafından kodlanan ve sırasıyla larval dokuların ve kütikülanın çözülmesine sebep olabilen, bir sistein proteaz (Slack vd., 1995) ve kitinaz etkisiyle hızlanır. Ölümünden ve konak böcek doku ve kütikülasının parçalanmasından sonra OB, diğer larvalar tarafından yenilmeden önce ODV'yi korur. Gömülü yapılar, mevsimsel beslenme döngülerine sahip böcek popülasyonlarında virüs devamlılığında önemli bir rol oynar (Jaques, 1985).

Enfekte olmuş hücrelerden inklüzyon yapılarının olgunlaşması ve salınımı p10 proteinine ihtiyaç duyar. *p10* geninin delesyonu, ölüme neden olmazken, “zarfın” inklüzyon yapılarına kusurlu ilavesi, zayıflatılmış nukleer dağılma ve kusurlu hücre parçalanması (Van Oers vd., 1994; Williams vd., 1989) gibi bazı önemli etkilere neden olabilir. Böylece, fonksiyonel bir p10'dan yoksun bakülovirüslerde, polihedra normal hücre parçalanmasıyla enfekte hücrelerden salınmaz. Bu virüslerden üretilmiş polihedralar kolay kırılır ve fiziksel streslerle parçalanmaya duyarlıdır.

1.2.5. Bakülovirüslerin Konak Seçiciliği

NPV'lerin çoğu türe has seçici olmamasına rağmen, dar bir konak spektrumuna sahiptir. NPV'ler genellikle cinsin, bazan da orjinal konak familyalarının üyelerini enfekte ederler.

Omurgalı hücre suşları ile yapılan çalışmalar, virüs nakillerinin oluşmasına rağmen, hücre suşlarında NPV replikasyonunun inandırıcı olmadığını göstermiştir (Tjia vd., 1983). Himeno ve arkadaşları (1967) yaptıkları çalışmada, *Bombyx mori* NPV DNA'sının bir memeli amnion hücre kültüründe PIB üretimine sebep olduğunu rapor etmiştir. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarla bu sonuç ispatlanamamış, hatta farklı laboratuvarlarda bu raporun tersi gösterilmiştir (McIntosh ve Shamy, 1980). *Autographa californica* multikapsid nükleopolihedrovirüs (AcMNPV)'ün, sıçan ovaryum hücre suşu (Gröner vd., 1984) ve farklı insan hücre suşlarında replike olmadığı gösterilmiştir (Tjia vd., 1983). AcMNPV'nin kurbağa, deniz kaplumbağası ve alabalıktan türetilmiş hücre suşlarının nukleusunda görüldüğü ancak, viral DNA veya RNA sentezinin meydana gelmediği tespit edilmiştir (Brusca vd., 1986). Rice ve Miller (1986), AcMNPV için özel transkriplerin üretken olmayan *Drosophila melanogaster* hücrelerinde sentezlendiğini fakat, geç viral transkrip sentezinin gözlenmediğini kaydetmiştir.

Bakülovirüs konak spektrumu üzerindeki bazı bilgiler, *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde kullanılmaktadır (McIntosh vd., 1985; Granados ve Hashimoto, 1989; Doyle vd., 1990). Genellikle MNPV'lerin hem larva hem de hücre kültürü açısından daha geniş konak spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir.

Lepidoptera konaklarından elde edilen bakülovirüslerin diğer takım üyelerini enfekte etmediği önceleri kesin kabul edilen bir durum idi. Ancak, sonraki çalışmalar, Orthoptera ve Isoptera üyelerinin, Lepidoptera bakülovirüsleri tarafından enfekte edildiği rapor edilmiştir (Al Fazairy ve Hassan, 1988). *In vitro* sistemde gözlenmemesine rağmen, McIntosh ve arkadaşları (1992), pamuk kurdundan, *Anthonomus grandis*, elde edilen bir Coleoptera hücre suşunda AcMNPV'nin replikasyonunu göstermiştir. Bunlar, bakülovirüslerin Arthropoda'dan farklı takım üyelerini de enfekte ettiğini ortaya koymaktadır (McIntosh ve Grasela, 1994).

Çoğunluğu böceklerden olmak üzere 800'den fazla bakülovirüs Arthropodlardan izole edilmiştir (Adams ve McClintock, 1991; Murphy ve arkadaşları, 1995; Federici, 1997). Bunların bazıları birçok Lepidoptera, Hymenoptera ve Coleoptera zararlılarının kontrolü için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (McIntosh ve Grasela, 1994). En çok çalışılan bavculovirus'lerden *Autographa californica* multikapsid nükleopolihedrovirüs (AcMNPV) ve *Anagrapha falcifera* multikapsid nükleopolihedrovirüs (AfMNPV)'ün sırasıyla 12 ve 10 Lepidoptera üyelerini enfekte ettikleri tespit edilmiştir (Granados ve Williams, 1986; Hostetter ve Puttler, 1991; Demirbağ, 1993; Ahres vd, 1997; Herniou, 2001; Mikhailow, 2003). Her iki bakülovirüs 30'dan fazla Lepidoptera türünü enfekte eder. Başka bir bakülovirüs olan *Mamestra brassicae* MNPV'nin 4 familya arasında 32 Lepidoptera türünü enfekte ettiği belirlenmiştir (Doyle vd., 1990).

Son yıllarda, gerek yukarıda bahsedilen, gerekse daha sonra farklı böceklerden izole edilmiş bakülovirüslerin farklı böcek (Orlovskaya, 1998) ve hücre kültürlerinde (Demirbağ vd, 1997; Demir, 2004; Lynn, 1999; McIntosh vd., 1999) konak spektrumuyla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu ve benzeri çalışmalar, farklı hücre suşlarının bakülovirüs replikasyonlarında çeşitli seviyelerde farklılıklar gösterdiklerini ve hücrelerin farklı duyarlılık derecelerine sahip olduklarını göstermiştir (Lynn, 2003a; Lynn, 2003b; Demir ve Demirbağ, 2006)

Şu ana kadar *Malacosoma neustria*'dan birkaç nükleopolihedrovirüs izole edilmiştir ve bunların biyolojik ve morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır (Jankevica vd., 1998; Kikhno ve Stokovskaya, 1997; Yaman vd., 2003). Ancak, bu virüsün hücre kültürü

sistemindeki biyolojik özellikleri ve replikasyon döngüsü hakkında bir şey bilinmemektedir. Mitsuhashi (1996), *M. neustria testacea*'nın larval hemositinden geliştirilen daimi hücre kültürünü *M. neustria testacea* NPV'nin enfekte ettiğini göstermiştir. Ancak, bu enfeksiyonun detayları hakkında herhangi bir bilgi vermemiştir. Bu nedenle, yeni bir mikrobiyal insektisid ve biyoteknolojik ajan geliştirmek için ManeNPV'nin replikasyon özelliklerinin detaylı bir şekilde bilinmesi oldukça önemlidir.

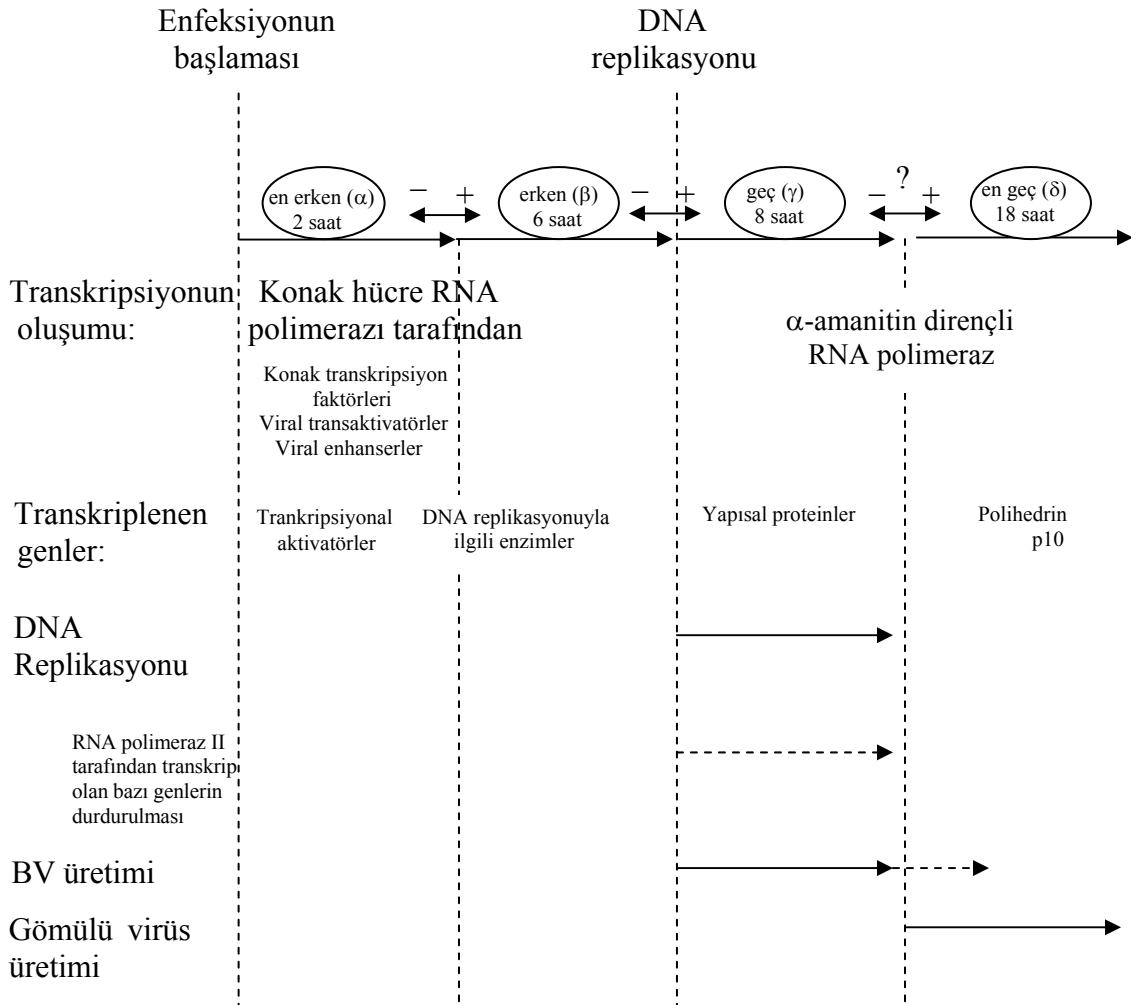
Bu çalışmada kullanılan *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV), KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Viroloji grubu tarafından arazi çalışmaları sırasında Gümüşhane'den toplanan hasta *M. neustria* larvalarından izole edilmiştir ve Yaman ve arkadaşları (2003) tarafından bazı ekolojik ve biyolojik özellikleri belirlenmiştir.

1.2.6. Bakülovirüs Gen Ekspresyonunun Önemi

Bakülovirüsler ile enfekte olmuş hücrelerde virüse ait proteinlerin enfeksiyondan sonra 2-60 saatler arasında sentezlendikleri tespit edilmiştir. Enfekte edilen hücrelerden ardına alınan örneklerin SDS-PAGE'de incelenmeleri neticesinde, bakülovirüs gen ekspresyonlarının basamaklı bir şekilde meydana geldiği, bu genlere ait proteinlerin farklı zamanlarda oluşmalarıyla gözlenmiştir. İlk zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde, üç basamaklı sınıfın olduğu tespit edilirken (Maruniak ve Summers, 1981) sonraki çalışmalar, yeterince ayırt edilebilen 4 gen ekspresyon sınıfının olduğunu göstermiştir (Miller, 1988) (Şekil 5).

En erken (α) olarak bilinen ilk sınıfa ait genlerin ekspresyonları, enfeksiyondan yaklaşık iki saat sonra başlar. Bu genlerin ekspresyonları için konak faktör (enfekte edilen hücrelere ait bazı protein)'lere ihtiyaç vardır. *Erken* (β) olarak bilinen ikinci sınıfa ait polipeptidlerin enfeksiyondan altı saat sonra görülmeye başladığı tespit edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonları için de bir veya daha fazla en erken sınıf proteinlerine ihtiyaç vardır (Guarino ve Summers, 1986). Bu iki grup genlerin ekspresyonlarının virüs DNA replikasyonundan önce olduğu ve bunların, enfekte eden ilk virüse ait DNA'dan sentezlendikleri tespit edilmiştir (Miller vd., 1983). Üçüncü sınıf, *geç* (γ) safha olarak bilinir. Bu sınıf genlerin ekspresyonları enfeksiyondan yaklaşık sekiz saat sonra başlar. Bu safhada, büyük ölçüde, yeni oluşan virüs DNA'sının sentezlendiği ve tomurcuklanan virüslerin, enfekte edilmiş hücrelerde üremeye başladıkları gözlenmiştir (Miller vd., 1983).

On sekiz saatlik virüs enfeksiyonunu müteakip, *en geç* (δ) safha başlar. Bu safha, PIB yapısını (% 90) oluşturan polihedrin proteininin sentezlenmesi, nükleokapsidlerin *de novo* yoluyla zarf kazanmaları ve hücre içi virüslerin polihedral inklüzyon yapı oluşturmaları ile belirlenir. Son iki sınıfa ait genlerin yeni oluşan DNA'dan sentezlendikleri tespit edilmiştir. En erken polipeptidler hariç, her takip eden sınıfın önceki sınıf proteinlerin ekspresyonuna ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir (Kelly, 1982). Açıklamalardan da anlaşıldığı gibi, bakülovirüs gen regülasyonu karmaşık bir yapıya sahiptir. Yapılan çalışmalar neticesinde çeşitli bakülovirüslere ait gen regülasyonlarının transkripsiyonel seviyede kontrol edildikleri tespit edilmiştir (Krappa ve Knebel-Morsdorf, 1991; Demirbağ, 1993).



Şekil 5. Bakülovirüs replikasyonu ve gen ekspresyonu safhaları. +: arttırıcı, -: engelleyici

1.2.7. Bakülovirüslerin Biyoteknolojideki Önemi

Tıbbi, endüstriyel ve zirai bakımdan önemli olan çeşitli viral, fungal, bakteriyel, bitkisel ve hayvansal proteinlerin değişik ekspresyon vektörleri aracılığıyla sentezlenmeleri biyoteknolojide oldukça önemlidir. Bakülovirüsler, moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir model olmaları (Charlton ve Volkman, 1991; O'Reilly vd., 1992), zirai mücadelede zararlı böceklere karşı kullanılmaları (Demirbağ ve Beldüz, 1997; Hunter-Fujita vd., 1998; URL-2) ve son zamanlarda DNA'larından önemli proteinlerin üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak yararlanılmalarından (O'Reilly vd., 1992; Demir vd., 2000; Beljelarskaya, 2002; Mikhailov, 2003) dolayı biyoteknolojide yeni bir dönem başlatmıştır.

Son 30 yıl böcek hücre kültürünün olağan üstü gelişimi ve uygulamalarının sağladığı birçok biyoteknolojik avantajla geçmiştir. Bunların en önemlisi, klonlanmış genlerin konak böcek hücrelerinde ekspresyonu için rekombinant DNA teknolojisi uygulamalarının 1980'li yıllardaki gelişimi idi. Bu arada çok yönlü gen ekspresyon sistemi olarak bakülovirüs-böcek hücre sisteminin ortaya çıkması, bakülovirüslerin moleküler biyolojileri üzerinde yoğun ve gayretli çalışmalardan ve yüksek miktarda protein üretimini destekleyen yeni böcek hücre kültür sistemlerinin kurulmasından kaynaklanmaktadır. Rekombinant bakülovirüsler, güçlü polihedrin ve p10 geni promotorlerinin kontrolü altında ilgi duyulan genlere ait çeşitli proteinlerin ekspresyonunda biyoteknolojide kullanılmaktadırlar. Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi, sadece araştırma için önemli bir sistem olmayıp, aynı zamanda ziraat ve insan sağlığında da kullanılmak üzere çeşitli ticari ürünleri üretmek için de önemli bir teknoloji olarak kabul edilir.

İlaç, toksin ve besin maddesi gibi çeşitli ürünleri kodlayan ilgili yabancı genler, özellikle hücre kültüründe bakülovirüslerin replikasyonu için zorunlu olmayan genler (*polh* ve *p10*) yerine klonlanarak, bol miktarda üretilmektedir (Luckow ve Summer, 1988; Maeda, 1989; King ve Posse, 1992; Demirbağ vd., 1998; Nalçacıoğlu vd., 2001; Beljelarskaya, 2002). Pek çok bilim adamı tarafından halen devam ettirilmekte olan bakülovirüslerin daha etkili bir ekspresyon vektörü haline getirilmesi ve virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması çalışmaları, bunları gelecekte de biyoteknolojinin önemli materyallerinden biri yapacaktır.

Bakülovirüsler tek başlarına düşük ve yavaş öldürme gücüne ve yüksek seçiciliğe sahip olmakla birlikte dar konak spektrumuna sahiptir. Bakülovirüs bulaşmış besinler böcek tarafında yenildikten sonra virüse duyarlı böceklerin ölümü 4-8 gün almaktadır.

Bakülovirüslerin bu özelliklerini geliştirerek, ziraat ve ormancılıkta genişletilmiş hedef seçiciliğini ve arttırılmış virülansa sahip viral pestisidleri elde etmek, bakülovirüs genomuna çeşitli toksin, hormon ve enzim genlerinin transferleriyle mümkün olmaktadır (McCutchen vd., 1991; O'Reilly ve Miller, 1991). Stewart ve arkadaşları (1991), kuzey Afrika akrebi (*Androctonus australis*)'nin genomundan böcekler için nörotoksik bir protein kodlayan geni ihtiva eden bir rekombinant AcMNPV'yi oluşturmuştur.

Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi sayesinde çeşitli yeni aşılar, ilaçlar, hormonlar ve büyüme faktörleri üretiminin yanında, insan karaciğer hastalığını tedavi etmek için bakülovirüs vektörleri de geliştirilmiştir. Bu vektörler aracılığıyla etkili bir şekilde insan karaciğer hücrelerine gen transfer edilmektedir (Tomalski ve Miller, 1991; Hofmann vd., 1995; Boyce ve Bucher, 1996).

Bakülovirüslerle ilgili önemli bir husus da bakülovirüs sayesinde sağlanan katkı ve faydaların, henüz başlangıç aşamasında olması ve bu yüzden bu teknolojinin gelecekte büyük istikbal vadetmesidir.

1.2.8. Tezin Amacı

Bakülovirüsler çevresel, zirai ve tıbbi biyoteknolojideki önemleri bakımından yoğun çalışılan araştırma materyali haline gelmişlerdir. Bakülovirüslerden yeni biyolojik mücadele etmenleri ve ekspresyon vektörleri geliştirmek, yeni izolatların elde edilmesi, karakterizasyonlarının yapılması ve bunların *in vitro* replikasyon özelliklerinin belirlenmesiyle mümkündür.

Malacosoma neustria L. (Yüzük kelebeği, Lepidoptera: Lasiocampidae)'dan elde edilmiş bir bakülovirüs olan *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV) bakülovirüs cinsine ait bir virüstür. Bu yüksek lisans tezinde, *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ünün *Malacosoma disstria*'dan geliştirilmiş Md203 hücrelerinde *in vitro* replikasyon özelliklerinin belirlenmesi ve konak spektrumunun araştırılması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücreler, Besiyeriler ve Virüs

Bu çalışmada kullanılan *Malacosoma disstria* larval hemolenfinden geliştirilmiş UA-Md203 (Keddie vd., 1995) hücre suşu Dr. A. Keddie (University of Alberta, Canada)'den temin edilmiştir. Md203 hücreleri ısı ile inaktif edilmiş, %10 fetal bovine serum (FBS, Sigma) ve tryptose (0.25 g /100 ml) katkılı TNMFH (Grace's Insect Medium, Sigma, Hink, 1970) besiyeride, 28°C'de 5'şer gün arayla büyütülüp, 1:5 oranında yeniden kültür edildi (Demirbağ vd., 1997).

Ayrıca, virüsün konak spektrumunu belirlemek amacıyla *Trichoplusia ni* (Lahana mühendis tırtılı) , *Lymantria dispar* (Kır tırtılı), *Bombyx mori* (İpek böceği), *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* (Pamuk tırtılı yaprak kurdu), *Choristoneura fumiferana* (Ladin tomurcuk böceği)'dan geliştirilmiş sırasıyla Tn5 (Granados vd., 1986), LdElta (Lynn vd., 1988), Bm-5 (Grace,1967), Sf21 (Vaughn vd., 1977), Se-1 (Gelernter ve Federici, 1986) ve Cf-124T (Bilimoria ve Sohi, 1977) hücre kültürleri kullanıldı. Tn5, Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücreleri ısı ile inaktif edilmiş %10 fetal bovine serum (FBS, Sigma) katkılı TNMFH (Grace's Insect Medium, Sigma) besiyeri ile 5'er gün arayla büyütülüp 0.5:5 oranında yeniden kültür edildi. LdElta hücreleri ise katkısız Excell400 (JRH Biosciences) besiyerinde, yine 5'er gün arayla büyütülüp 0.5:5 oranında yeniden kültür edildi.

Bu hücrelerin enfeksiyonunda *Malacosoma neustria* multikapsid nükleopolihedrovirüs (ManeMNPV) kullanıldı. Bu virus, arazi çalışmaları sırasında Gümüşhane'den toplanan hasta *M.neustria* larvalarından izole edilmiştir ve Yaman ve arkadaşları (2003) tarafından bazı ekolojik ve biyolojik özellikleri belirlenmiştir.

2.2. Primer İnokulumun Elde Edilmesi

Tomurcuklanan virüsleri elde etmek için *Malacosoma neustria* larvaları PIB (viral gömülü yapılar) bulaştırılmış besinlerle beslendi. Enfeksiyondan 5 gün sonra hastalanmış larvalar %70 alkol içinde 2 dakika bekletildi ve larvalar arka vantuzlarından steril bir

makasla nazik bir şekilde kesilerek larval hemolenf toplandı. Daha sonra buz üzerinde beklemekte olan steril santrifüj tüplere alındı. Tüplere eşit hacimde TMNFH-Tryp besiyeri ilave edildi. 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant filtre ile steril edilerek primer inokülüm olarak kullanıldı. Rivkin ve arkadaşlarının (1998) açıkladığı yönteme göre ilk enfeksiyondan sonra plak saflaştırması ve stok virüs üretimleri yapıldı. Bu stok daha sonraki çalışmalarda kullanıldı.

2.3. Stok Virüs Üretimi

Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs (ManeNPV) stokları *in vitro* olarak duyarlı Md203 hücrelerinde (Lee, 1987) üretildi. Hücreler, 9.0×10^7 hücre/75 cm² olacak şekilde kültür kabına (Grainer) ekildi. Kültür kabı, hücrelerin tabana tutunması için 28°C'de iki saat bekletildi. Tutunma süresinden sonra besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler, MOI (hücre başına düşen enfeksiyon yapan virüs sayısı) 1 olacak şekilde ManeNPV ile enfekte edildi. Virüsün hücrelere tutunması için kültür kabı oda sıcaklığında, düşük hızda iki saat sallanarak bekletildi. Son hacim 10 ml'ye tamamlandı ve virüs üretimi için 28°C'de inkübasyona bırakıldı (Summers ve Smith, 1987). Hücreler %80-90 oranında polihedral inklüzyon yapı (PIB) ihtiva edene kadar (enfeksiyondan 4-5 gün sonra) inkübasyona devam edildi. Üretilen ekstrasellüler virüslerin (BV), hücre kalıntıları ve PIB'lerden ayrılması için besiyeri-hücre süspansiyonu 2.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ekstrasellüler virüs ihtiva eden üstteki sıvı alınıp, 4°C'de muhafaza edildi (Demirbağ vd., 1997).

2.4. Stok Virüs Konsantrasyonunun Hesaplanması

Virüs konsantrasyonu doku kültürü enfektif doz %50 (TCID₅₀) deneyi yapılarak tespit edildi (Brown ve Faulkner, 1975). TCID₅₀, inoküle edilen hücre kültürünün %50'sini enfekte etmek için ihtiyaç duyulan virüs konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bu deney, virüsün enfeksiyon yapma kapasitesinin kalitatif bir testidir. Sadece enfekte edilen gözlerde sitopatik etkilerin (CPE) varlığı veya yokluğu hakkında bilgi verir.

Ekstrasellüler virüs ihtiva eden süspansiyon 10⁻¹'den 10⁻⁸'e kadar seyreltildi. Bu seyreltiklere eşit hacimde $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde Md203 hücreleri ilave edildi.

Oluşan her hücre-virüs karışımından 60 gözlü Terazaki (Grainer) kabının gözlerine 6'şarlı olarak 10'ar µl transfer edildi (Summers ve Smith, 1987) ve kap nemli bir poşet içerisinde 3-7 gün 28°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun 3. gününden sonra hücreler mikroskopik olarak incelendi ve sonuçlar sitopatik etkilerin varlığı veya yokluğu şeklinde kaydedildi. Kültür ortamındaki tomurcuklanmış virüs titerleri TCID₅₀'ye göre hesaplandı (Brown ve Faulkner, 1975). Bunun için son-nokta titrasyon tabloları oluşturuldu ve %50 enfeksiyon oranına karşılık gelen seyreltme aralığı belirlendi. Elde edilen değerler Reed ve Muench (1938)'e göre işlem basamaklarından geçirilerek, virüs konsantrasyonu pfu/ml (ml'de plak oluşturan ünite) olarak hesaplandı.

2.5. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücrelerde Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi

Sitopatik etkileri tespit etmek için Md203 hücreleri ManeNPV ile enfekte edildi. Bunun için hücreler 2.5× 10⁵ hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kaba (Grainer) bırakıldı. Bir gece 28°C'de bekletildikten sonra MOI 10 olacak şekilde Md203 hücreleri için katkılı TNMFH-Tryp besiyeri kullanılarak ManeNPV ile enfekte edildi. Virüsün hücrelere tutunması için 2 saat boyunca oda sıcaklığında düşük hız sallayıcı (Red Rocker, Hoefer) üzerinde sallanır durumda bekletildikten sonra, inokülüm uzaklaştırıldı ve 3 ml taze besiyeri ilave edildi. Enfekte olmuş hücrelerin 28°C'de inkübasyonuna devam edildi (Castro vd., 1997; Shirata vd., 1999). Enfeksiyondan 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96 saat sonra hücreler ışık mikroskobu ile incelendi ve meydana gelen CPE'ler kaydedildi ve enfeksiyondan sonra aynı saatlerde hücrelerin fotoğrafları inverted ışık mikroskobu (Prior) ile çekildi.

2.6. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücrelerde Üretilen Ekstrasellüler Virüslerin Çoğalma Eğrisi

Md203 hücreleri, yukarıda bahsedildiği gibi hücreler 2.5×10⁵ hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kaba (Grainer) bırakıldı ve MOI 10 olacak şekilde ManeMNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 0, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra, kültür sıvısı alındı. Ekstrasellüler virüsleri, hücre kalıntıları ve PIB'lerden ayırmak için 2.000×g'de 10 dakika santrifüj edildi (Demirbağ vd., 1997). Virüsleri ihtiva eden süpernatant alındı ve 4°C'de muhafaza edildi.

Belirtilen saatlerde toplanan ekstrasellüler virüslerin konsantrasyonları TCID₅₀ yöntemiyle hesaplandı (Brown ve Faulkner, 1975). Bulunan değerler x, y koordinat sisteminde x eksenini zamanı, y eksenini de log TCID₅₀'yi gösterecek şekilde virüs büyüme eğrisi çizildi.

2.7. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyonu ile Belirlenmesi

2.7.1. Prob Geliştirme

2.7.1.1. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs DNA'sının İzolasyonu

Md203 hücreleri 2.5×10^5 hücre/petri olacak şekilde 35 mm'lik petri kaplarına (Costar) bırakıldı. Bir gece 28°C'de bekletildikten sonra MOI 10 olacak şekilde *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeMNPV) ile enfekte edildi ve 28°C'de inkübasyona devam edildi. Enfeksiyondan 4 gün sonra (polihedral inklüzyon yapılarının oluştuğu) ManeNPV DNA'sı izole edildi (Invitrogen, 1996). Hücreler 5.000 rpm'de 3 dakika çöktürüldü. Süpernatant alındı ve eşit hacimde soğuk (4°C) %20'lik polietilen glikol ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökelti alındı, 100 µl suda çözüldü ve 10 µl proteinaz K (Sigma) ilave edilip, 50°C'de 1 saat bekletildi. Eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (24 :24 :1) (Sigma) ilave edildi ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz alınıp, sodyum asetat, glikojen ve %100'lük etanol ilave edildi. Çöktürme için 20 dakika -20°C'de bekletildikten sonra, 4°C'de 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelti %70'lik alkol ile yıkandı ve 10 µl steril ddH₂O'da çözüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

2.7.1.2. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs DNA'sının PCR ile Çoğaltılması

Prob geliştirmek üzere yukarıdaki gibi izole edilmiş ManeNPV DNA'sı polihedrin geni için düzenlenmiş (De Moreas ve Maruniak, 1997) F: 5' CCG GAC CGA TGA ACT CAT CC -3' ve R: 5' CAA AGG AAC AAA GAG TCC TAG G -3' primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) termal cyclers aletinde (Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler) çoğaltıldı (Woo, 2001). Reaksiyon karışımı, 4 µl viral DNA (ManeMNPV), 5 µl (10X) PCR tamponu, 1,5 µl (10 mM) dNTP karışımı, 2'şer µl forward ve reverse primer

DNA'sı (10 µM), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl Taq DNA (2.5 u) ve 50 µl'ye tamamlanacak şekilde steril ddH₂O ilave edilerek hazırlandı. PCR reaksiyonu ise denaturasyon için 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra, 94°C'de 1 dakika, 45°C'de 45 saniye ve 72°C'de 1 dakikaya ayarlanarak 10 döngü şeklinde yapıldı ve sonra 94°C'de 45 saniye, 50°C'de 30, 72°C'de 60 saniye 25 döngü olarak yapıldı ve son olarak da 72°C'de 5 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. PCR reaksiyonu sonunda oluşan ürün %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.7.1.3. PCR Ürününün Elde Edilmesi ve Proben İşaretlenmesi

Agaroz jelde yürütüldükten sonra UV ışığı altında görünen DNA fragmenti kesilerek jelden çıkarıldı. PCR sonucu çoğaltılmış DNA fragmentini ihtiva eden jel parçası, cam pamuğu kullanılarak hazırlanmış, fragmenti jelden temizleme ünitesinde, 13.000×rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Jel parçaları cam pamuğa takılıp kalırken, DNA fragmenti sıvı ile birlikte tüpün alt kısmında toplandı.

Bir mikrosantrifüj tüpüne, temizlenmiş DNA fragmentinden 16 µl (~ 1 µg) bırakıldı ve kaynar suda 10 dakika bekletildi. Hemen buz üzerine alınıp karıştırıldıktan sonra DIG High Prime DNA Labeling ve Detection Starter Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Kat. No: 1 745 832)'e ait işaretleme çözeltisinden 4 µl ilave edildi ve nazikçe santrifüj edildi. Karışım, 37°C'de 16 saat inkübe edilerek işaretleme gerçekleştirildi. Sonra 65°C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu ve işaretli prob -20 °C'de muhafaza edildi.

2.7.2. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Nitroselüloz Membrana Geçirilmesi

Md203 hücreleri 2.5x10⁵ hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kabına (Costar) bırakıldı. Hücrelerin tabana tutunması için gece boyu bekletildikten sonra, MOI 10 olacak şekilde ManeNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 saat sonra hücreler parçalanarak karışım haline getirildi (Demirbağ, 1993). Bunun için önce besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler, 800 µl 0,5 N NaOH ilave edilip, pipetlenerek parçalandı. Karışımı nötralize etmek amacıyla 80 µl 10 M amonyum asetat ilave edildi ve oluşan lizat kullanılmaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

Immobilon Transfer Membran (Sigma) gerekli ölçülerde kesildi, 2XSSC (3M NaCl, 0,3 M sodyum sitrat) tamponunda 5 dakika bekletildi ve slot blot ünitesine (Hoefler

Scientific Instruments) yerleştirildi. Hücre karışımlarından 100'er µl ünitenin kuyucuklarına yüklendi ve vakum ile membrana geçirildi. Üniteden çıkarılan membran 0,1XSSC tamponu ile 2 dakika muamele edildikten sonra, 30 dakika oda sıcaklığında ve 2 saat de 80°C'de bekletildi.

2.7.3. Hibridizasyon

Prehibridizasyon ve hibridizasyon, DIG High Prime DNA Labeling ve Detection Starter Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Kat. No: 1 745 832) ve kit tarafından tavsiye edilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi.

Prehibridizasyon öncesi, hibridizasyon tamponu (%0,1 (w/v) N-lauroylsarcosine (Sigma), %0,02 (w/v) SDS, 1/10 bloklama solüsyonu 10X (vial 6), 5XSSC, ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır) kaynayan su banyosunda 10 dakika bekletildi ve hemen buz üzerine alındı. Tampon bir miktar soğutulduktan (yaklaşık 42°C) sonra içinde, daha önce hücre lizatlarının geçirildiği membranı ihtiva eden hibridizasyon tüpüne aktarıldı. Sonra, 42°C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında (BİNDER) 16 saat (yaklaşık gece boyu) döndürülerek bekletildi. Bir sonraki gün, yeni bir tampon alındı ve 5 µl işaretli ManeMNPV probu ilave edilerek, yine kaynamakta olan su banyosunda 10 dakika bekletildi ve hemen buza alındı.

Hibridizasyon tüpünde bulunan prehibridizasyon tamponu döküldü. İşaretli probu ihtiva eden tampon, hibridizasyon tüpüne boşaltıldı ve 42°C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında (BİNDER) gece boyu hibridizasyona tabi tutuldu. Sonraki sabah, tüpün içerisindeki hibridizasyon tamponu alındı ve -20°C'de muhafaza edildi. Hibridizasyon tüpünden alınan membran, 2XSSC, %0,1'lik SDS tamponu içerisinde oda sıcaklığında 2 kez 5'er dakika ve ardından da 0,1XSSC, %0,1 SDS tamponu içerisinde 65°C'de 2 kez 15'er dakika sallayıcı üzerinde yıkandı. Membran, 20 ml maleik asit tamponunda (0,1 M maleik asit, 0,15 M NaCl, pH 7,5) sallayıcı üzerinde 5 dakika yıkandıktan sonra, 70 ml bloklama solüsyonunda (Maleik asit tamponuna 1:10 oranında 10X bloklama solüsyonu (vial 6) ilave edilir) 30 dakika sallayıcı üzerinde bekletildi.

Hibridizasyon DIG High Prime DNA Labeling ve Detection Starter Kit I'deki vial 4 (alkalin fosfataz ekli Fab fragmenti)'ten 4 µl alınıp, 20 ml bloklama solüsyonuna ilave edildi (1:5000 oranında). Membran, hazırlanan bu karışım içerisinde 30 dakika sallayıcı üzerinde bekletildikten sonra 50'şer ml yıkama solüsyonunda (Maleik asit tamponuna %0,3 oranında %100'lük Tween 20 (v/v) ilave edilir) 2 kez 15'er dakika yıkandı.

Membran yıkandıktan sonra, 20 ml belirleme tamponunda (0,1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂) sallayıcı üzerinde 5 dakika bekletildi. Taze olarak hazırlanmış 10 ml renk solüsyonunda (10 ml belirleme solüsyonuna 200 µl vial 5'ten ilave edilir) kapalı bir şekilde ve karanlıkta 10-15 dakika (renk oluşması için gerekli zaman) bekletildi. Oluşan bantların koyulaşması yeterli olunca, membran tarayıcıda (Mustek) taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.8. ManeNPV-Protein Sentezinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi

Md203 hücreleri 2.5×10^5 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kabına bırakıldı ve MOI 10 olacak şekilde ManeNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96 saat sonra protein karışımları elde edildi (Bilimoria vd., 1993). Hücreler tabandan koparıldı ve 4°C'de, 5.000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilerek çökelti oluşturuldu (Demir vd., 2000). Süpernatant atıldı ve çökelti 100 µl parçalama çözeltisinde (50 µg/ml leupeptin ve 100 µg/ml pepsitatin A ihtiva etmekte olan PBS içerisinde hazırlanmış %0,1'lik Triton X-100) vortekslenerek çözüldü. Buz üzerine yerleştirilerek her 10 dakikada bir vortekslenerek 45 dakika bekletildi. Elde edilen karışım, 1.000×g'de, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant alınarak -30°C'de muhafaza edildi (Invitrogen, 1996). Protein örneklerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 2-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildi ve 10 dakika kaynamakta olan suda bekletildikten sonra, %10'luk SDS-Poliakrilamid jele yüklendi (Laemmli, 1970). Protein bantları 30 mA akım kullanılarak ayrıldı.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, Coomassie brillant blue (%0,125 Coomassie brillant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-3 saat boyandı. Jel, %50 metanol ve %10 asetik asit çözeltisinde bekletilerek fazla boya yıkandıktan sonra, %7 asetik asit ve %5 metanol çözeltisine alındı. Daha sonra jel, tarayıcıda (Mustek) taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.9. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs'ün *In vitro* Konak Spektrumu

2.9.1. Farklı Hücre Kültürlerinin ManeNPV ile Enfeksiyonu ve Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi

In vitro koşullara uyarlanan ManeNPV'nin *in vitro* konak spektrumunu belirlemek amacıyla Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 (kontrol olarak) hücreleri ManeNPV ile enfekte edildi. Bunun için hücreler 2.5×10^5 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kabına (Granier) bırakıldı. Bir gece 28°C'de bekletildikten sonra MOI 10 olacak şekilde Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücreleri için katkısız TNMFH, LdElta hücreleri için katkısız ExCell400, Md203 hücreleri için katkılı TNMFH-Tryp besiyerileri kullanılarak ManeNPV ile enfekte edildi. Virüsün hücrelere tutunması için 2 saat boyunca oda sıcaklığında düşük hız sallayıcıda bekletildikten sonra inokulum uzaklaştırıldı ve 3'er ml taze besiyeri ilave edildi. Enfekte olmuş hücrelerin 28°C'de inkübasyonuna devam edildi (Castro vd., 1997; Shirata vd., 1999). Enfeksiyondan sonra 12'şer saat aralıklarla hücreler ışık mikroskobu ile incelendi ve meydana gelen CPE'ler kaydedildi. Enfeksiyondan sonra CPE'lerin en açık şekilde görüldükleri saatlere ait fotoğraflar (enfeksiyondan sonra 0, 24, 36, 48, 72, 96, 120 saat sonra) inverted ışık mikroskobu (Prior) ile çekildi.

2.9.2. ManeNPV ile Enfekte Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Ekstrasellüler Virüs Miktarları

Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 (kontrol olarak) hücreleri bir önceki adımda belirtildiği gibi enfekte edildi. Enfeksiyondan 120 saat sonra kültür sıvıları alındı. Yukarıda (2.6) belirtildiği gibi işlem yapıldı. Belirtilen saatte toplanan ekstrasellüler virüslerin konsantrasyonları TCID₅₀ yöntemiyle hesaplandı (Brown ve Faulkner, 1975). Bulunan değerler x, y koordinat sisteminde x eksenini hücreleri, y eksenini de log TCID₅₀'yi gösterecek şekilde virüs büyüme eğrisi çizildi.

2.9.3. ManeNPV ile Enfekte Olan Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyonu ile Belirlenmesi

Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 (kontrol olarak) hücreleri 2.5×10^5 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kablarına bırakıldı. Hücrelerin tabana tutunması için gece boyu bekletildikten sonra, MOI 10 olacak şekilde ManeNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücreler parçalanarak karışım haline getirildi (Demirbağ, 1993). Önce besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler 800µl, 0.5N NaOH ilave edilip, pipetlenerek parçalandı. Karışımı nötralize etmek amacıyla 80µl 10M amonyum asetat ilave edildi ve oluşan lizat kullanılıncaya kadar 4°C’de muhafaza edildi. Daha sonra 2.7.3’de belirtildiği gibi hibridizasyon yapıldı. Oluşan bantların koyulaşması yeterli olunca, membran tarayıcıda taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

3. BULGULAR

3.1. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüsünün Md203 Hücrelerindeki Verimliliği

Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ünün Md203 hücrelerinde üretim verimliliğini test etmek için, Md203 hücreleri ManeNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 5 gün sonra kültür sıvısı alınıp, Md203 hücrelerinde ekstrasellüler virüs konsantrasyonu “doku kültürü enfektif doz-50 (TCID₅₀)” ye göre hesaplandı. Buna göre virüs konsantrasyonu $2,18 \times 10^6$ pfu/ml olarak bulundu. Bu değer, ManeNPV'nin Md203 hücrelerindeki sitopatolojisi, replikasyonu, transkripsiyonu ve konak spektrumuyla ilgili özelliklerinin ortaya çıkarılması açısından yeterli olduğu düşünüldü.

3.2. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Md203 Hücrelerinde Meydana Gelen Sitopatik Etkiler

Md203 hücrelerinin *M. neustria* nükleopolihedrovirüse olan duyarlılığını test etmek için hücreler ManeNPV ile enfekte edildi. Hücreler enfeksiyondan sonra 12 saat aralıklarla mikroskopta incelendi. Hücrelerde meydana gelen sitopatik etkiler (CPE) kaydedildi ve kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Hücrelerde meydana gelen değişikliklerin ve CPE'lerin en açık şekilde görüldükleri saatlere ait fotoğraflar (enfeksiyondan 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 80 ve 96 saat sonra) çekildi.

Hücrelerde, enfeksiyondan 0 saat sonra, virüs enfeksiyonuna ait özel bir belirtiyeye rastlanmadı ve enfekte olan hücrelerin kontrol hücreleri ile aynı görüntüde oldukları belirlendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra Md203 hücrelerinde enfeksiyonun ilk belirtisi olarak ortaya çıkan sitopatik etkiler hücrelerin “stresli olmaları, granülleşmeleri ve irileşmeleri”dir (Şekil 6). Ayrıca, hücre bölünmesinin durduğu da kontrol ile karşılaştırıldığında hücre sayısının artmamış olmasından anlaşıldı. Enfeksiyondan sonra geçen süre arttıkça (36 saat) bazı hücrelerde şekillerinde “elips şeklini alma veya uzama” gibi şekil değişikliklerinin meydana geldiği tespit edildi. Polihedral inklüzyon yapı (PIB)'lerin oluşumu, ilk olarak enfeksiyondan 36 saat sonra gözlemlendi (Şekil 6). Bu arada hücrelerdeki “esmerleşme, irileşme ve elips şeklini alma” gibi sitopatik etkilerin daha

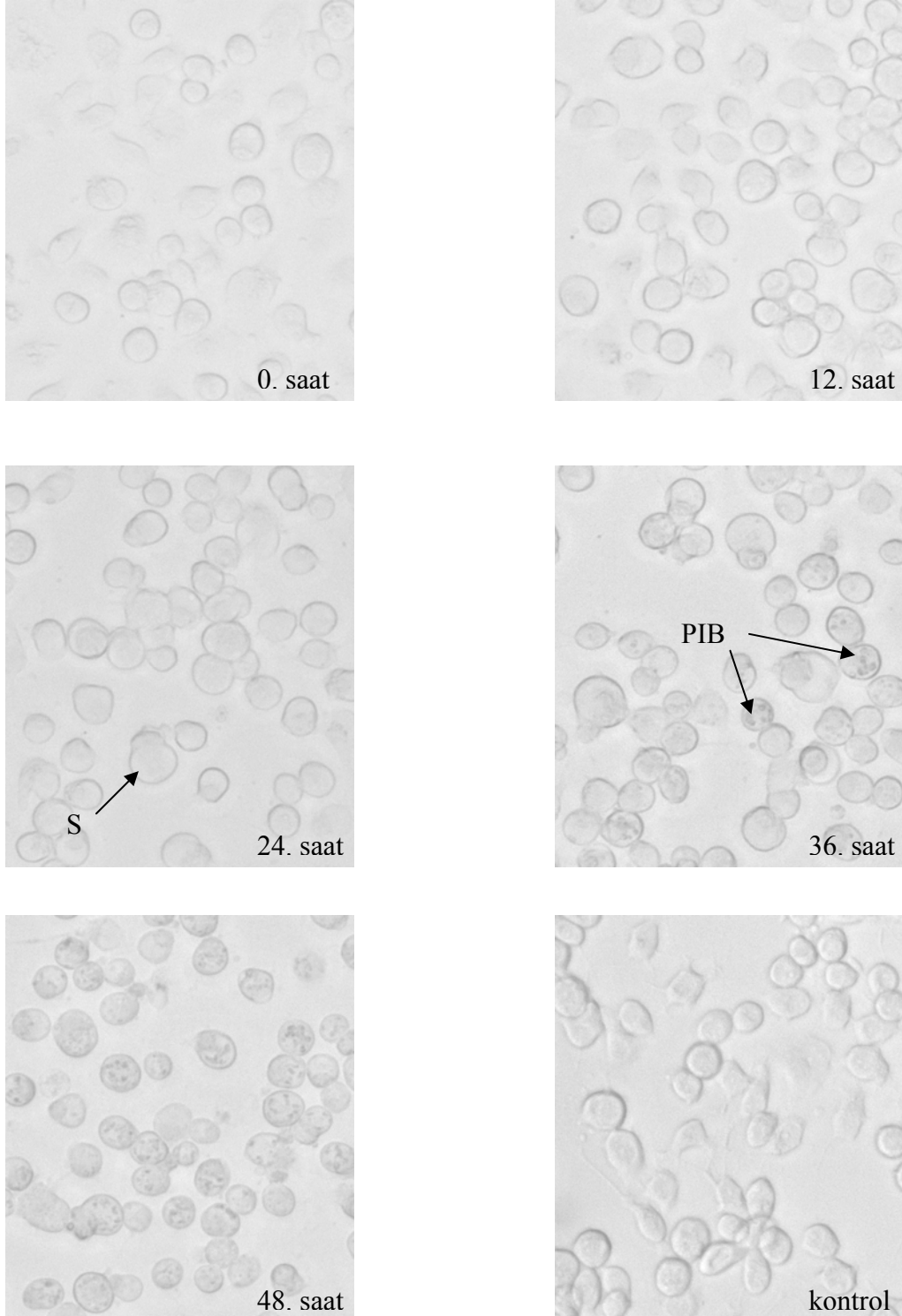
belirgin bir hale geldiği tespit edildi. Bu saat itibarıyla hücrelerin yaklaşık olarak %40'ının PIB ihtiva ettiği ve kontrol ile karşılaştırıldığında canlı görünümünden çok uzak, stresli ve irileşmiş oldukları belirlendi.

Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin %60-65 oranında PIB ihtiva ettikleri, hücrelerin “iyice esmerleştikleri, şekil bozukluklarının arttığı ve çoğu hücrenin tabandan koptuğu” tespit edildi. Tespit edilen özelliklere göre enfekte olan hücrelerin kontrol hücrelerinden farklı bir görüntüde oldukları ve kontrol hücrelerinin ise bölünmeye devam ettikleri belirlendi.

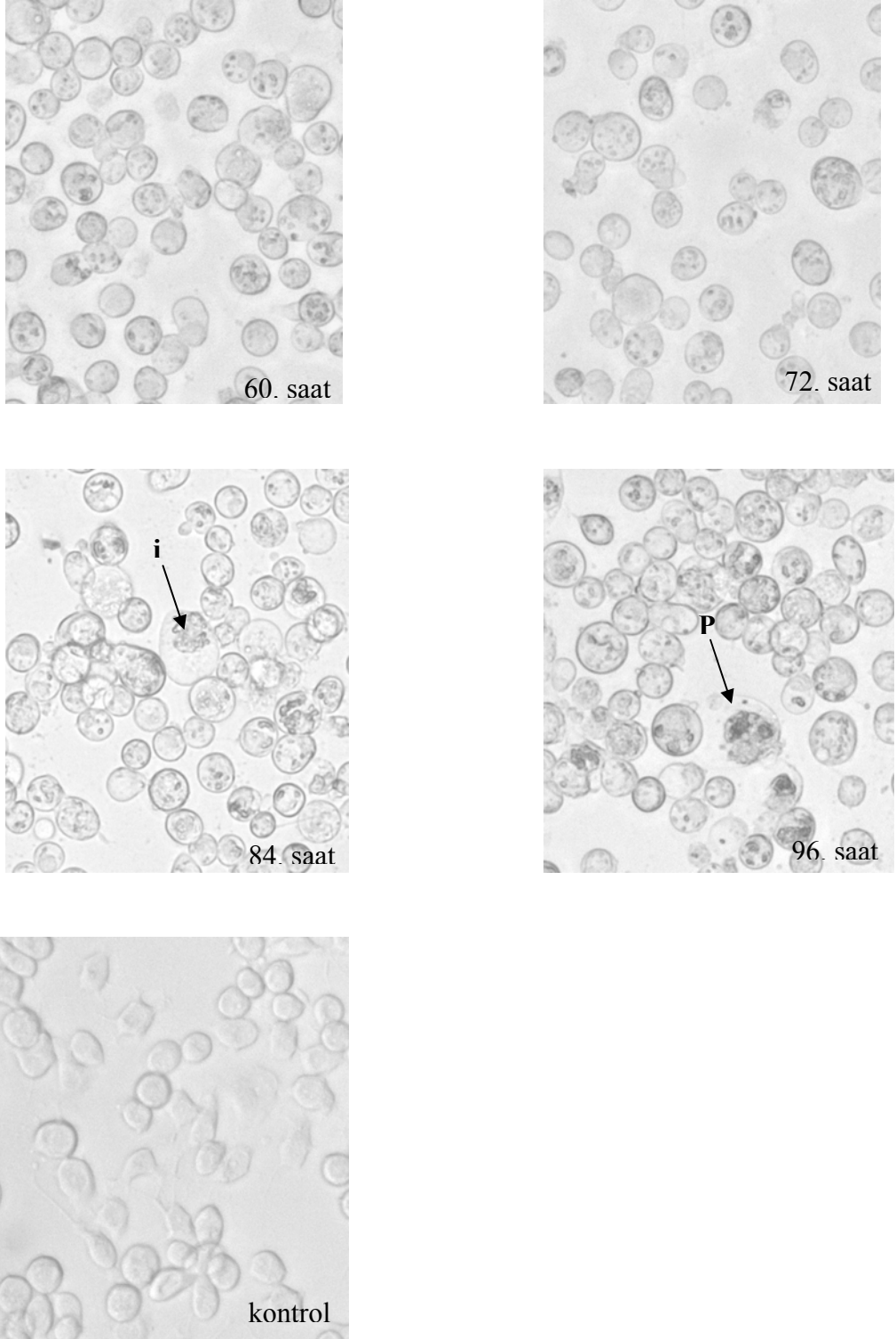
Enfeksiyondan 60 saat sonra hücrelerin PIB ihtiva etme oranı %80'e ulaşırken, hücrelerin “irileşme ve granülleşme” sinin devam ettiği belirlendi.

Enfeksiyondan 72 ve 84 saat sonra hücrelerin PIB ile dolduğu, bunların bazı hücrelerde yoğun bir halde birleşerek kümeler oluşturduğu, bazı hücrelerde ise parlak kristal şeklinde oldukları tespit edildi. Ayrıca, bazı hücrelerin parçalanmasıyla PIB'lerin kültür ortamına dağıldıkları ve hücrelerin bir kısmının tabandan koparak kültür ortamında yüzdüğü gözlemlendi (Şekil 7).

Enfeksiyondan 96 saat sonra hücrelerin tamamının PIB ile dolduğu, PIB'lerin bazı hücrelerde yoğun “siyah kümeler” halinde oldukları tespit edildi. Parçalanmış ve tabandan kopmuş hücre sayılarında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 7). Hücrelerin kontrol hücreleriyle karşılaştırıldıklarında iyice karardıkları, şekillerinin değiştiği ve parçalanmış oldukları tespit edildi.



Şekil 6. ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde enfeksiyondan sonra 0, 12, 24,36, 48. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler. İverted ışık mikroskopunda 10X20'lik büyütme. Rakamlar: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, s: Enfekte olmuş stresli ve irileşmiş hücre, PIB: Polihedral inklüzyon yapı



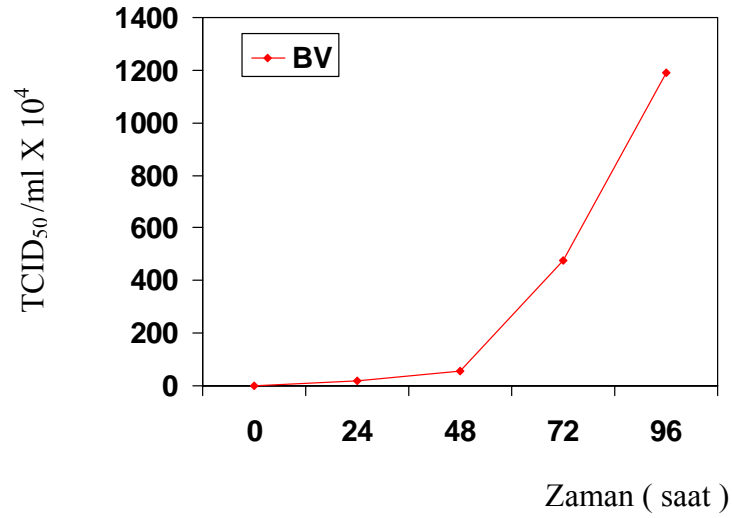
Şekil 7. ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde enfeksiyondan sonra 60, 72, 84 ve 96. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler. İverted ışık mikroskopunda 10X20'lik büyütme. Rakam: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, p: Parçalanmış hücre, i: İrileşmiş hücre

3.3. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Md203 Hücrelerinde Ekstrasellüler Virüs Üretim Eğrisi

Enfeksiyondan 0, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra kültür besiyeri alındı ve ihtiva ettiği ekstrasellüler virüs konsantrasyonu doku kültürü enfektif doz-50 (TCID₅₀)' ye göre hesaplandı.

Enfeksiyondan 0 saat sonra hücrelerde 10⁴ seviyelerinde bir temel titer belirlendi. Ekstrasellüler virüs üretimi enfeksiyondan 24 saat sonra başladı. Bu saatteki BV miktarı 1,73x10⁵ pfu/ml (temel titerin yaklaşık 10 katı) olarak hesaplandı. Enfeksiyondan 48 saat sonra ise hücrelerde üretilen ekstrasellüler virüs miktarının 5.49x10⁵ pfu/ml olduğu belirlendi. Enfeksiyondan 72 ve 96 saat sonra üretilen ekstrasellüler virüs miktarlarının sırasıyla 4,78x10⁶ pfu/ml ve 1,19x10⁷ pfu/ml olduğu tespit edildi. En yüksek miktarda ekstrasellüler virüsün enfeksiyondan 96 saat sonra üretildiği belirlendi. Md203 hücrelerinde başlangıç titerine göre yaklaşık 3 kat daha fazla BV üretildiği tespit edildi

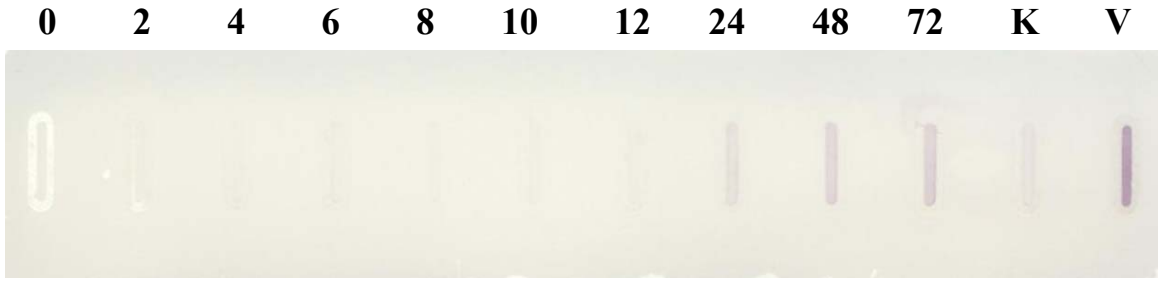
Md203 hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarı logaritması y eksenini, zaman ise x ekseninde gösterilerek virüs çoğalma eğrisinin Şekil 8'deki gibi olduğu belirlendi.



Şekil 8. ManeNPV'nin Md203 hücrelerinde çoğalma kinetiği. X eksen: Zaman; 0, 24, 48, 72 ve 96 enfeksiyondan sonra örnek alınan saatler, Y eksen: Virüs konsantrasyonu; Log TCID₅₀ / mlx10⁴

3.4. Md203 Hücrelerinde *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonu

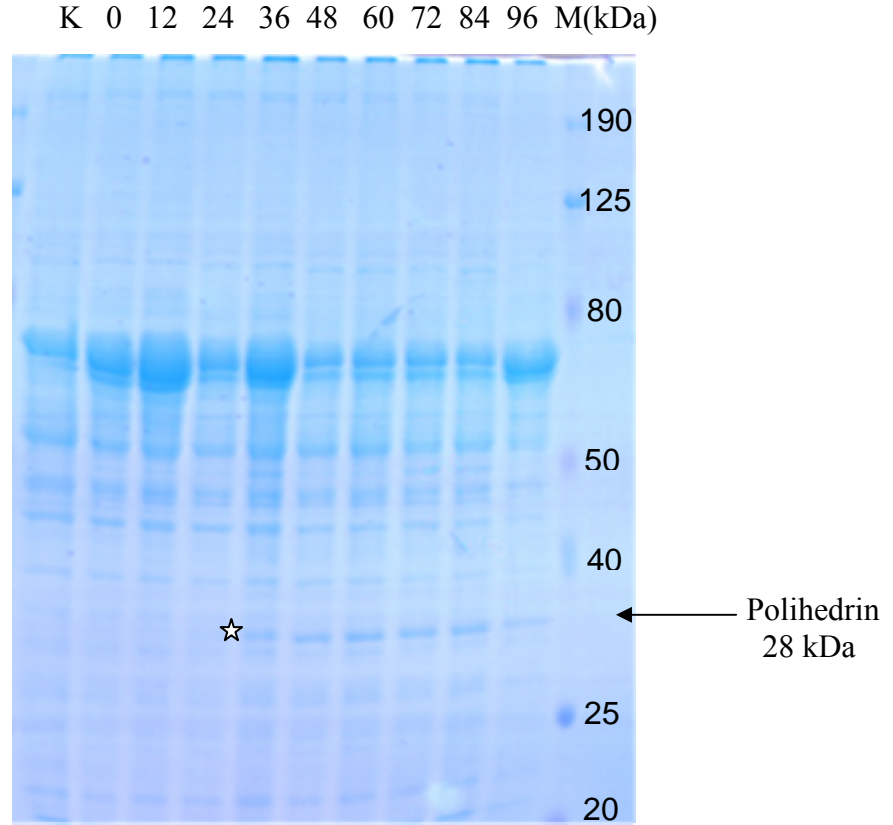
Md203 hücre kültüründe ManeNPV DNA replikasyonu yukarıda da belirtildiği gibi slot blot hibridizasyonu ile DIG High Prime DNA Labeling ve Detection Starter Kiti (Roch Diagnostics, GmbH, Kat. No: 1 745 832) kullanılarak belirlendi. Enfeksiyondan 0-12 saat sonra herhangi bir bant oluşmaması prob ile hibritleşecek DNA'nın ortamda olmadığını, yani DNA replikasyonunun meydana gelmediğini göstermektedir. Ancak, enfeksiyondan 24 saat sonra çok koyu olmamakla birlikte, oluşan bant DNA replikasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 9). Ortaya çıkan bu sonuç Md203 hücrelerinde *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüsün replike olduğunu ve bu replikasyonun enfeksiyondan 24 saat sonra başladığını göstermektedir. Enfeksiyondan sonra 48 ve 72 saate doğru ilerlediğinde, hibridizasyon sonunda oluşan bantların daha da koyulaşması DNA replikasyonunun giderek arttığını göstermektedir.



Şekil 9. ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde viral DNA replikasyonu. DNA replikasyonu slot blot hibridizasyon yöntemiyle belirlendi. Rakamlar: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, bantlar: ManeNPV probu ile hibridize olmuş enfekte hücrelerdeki ManeNPV DNA'sı, K: Enfekte olmayan hücrelerden alınan örnek, V: ManeNPV DNA'sı

3.5. *Malacosoma neustria* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Md203 Hücrelerindeki Protein Profilleri

ManeNPV'ye ait proteinlerin bazılarının Md203 hücrelerinde sentezlenip sentezlenmedikleri SDS-Poliakrilamid jel elektroforez analizi ile tespit edildi. NPV'ler için çok karakteristik olan ve en geç fazda bol miktarda üretilen proteinlerden biri olan polihedrinin bu hücrelerde (çok ince bir bant halinde de olsa) enfeksiyondan 36 saat sonra yaklaşık 28.000 Da ağırlığında bir bant olarak ortaya çıktığı tespit edildi. Aynı protein enfeksiyondan 48 saat sonra çok daha net ve açık bir şekilde görüldü (Şekil 10). Sonraki saatlerde ise polihedrin proteini üretiminin giderek arttığı tespit edildi. Bakülovirüs replikasyonunda bu proteinin görülmesi, replikasyonun tamamlanması açısından oldukça önemlidir.



Şekil 10. ManeNPV'ye ait proteinlerin Md203 hücrelerinde üretilmesi. Protein sentezi %10'luk SDS-PAGE yöntemiyle belirlendi. K: Enfekte olmamış, kontrol, M: Ağırlıkları bilinen standart proteinler, Rakamlar: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, ☆ : Polihedrin proteini

3.6. Farklı Hücre Kültürlerinde ManeNPV'nin Replikasyon Özellikleri

3.6.1. ManeNPV ile Enfekte Farklı Hücre Kültürlerinde Meydana Gelen Sitopatik Etkiler

ManeNPV'nin *in vitro* replikasyonel özellikleri ayrıntılı bir şekilde ilk kez Md203 hücrelerinde belirlendi. Md203 hücrelerindeki replikasyonu kontrol olarak kullanılarak virüsün Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücrelerindeki replikasyon özellikleri ortaya çıkarıldı.

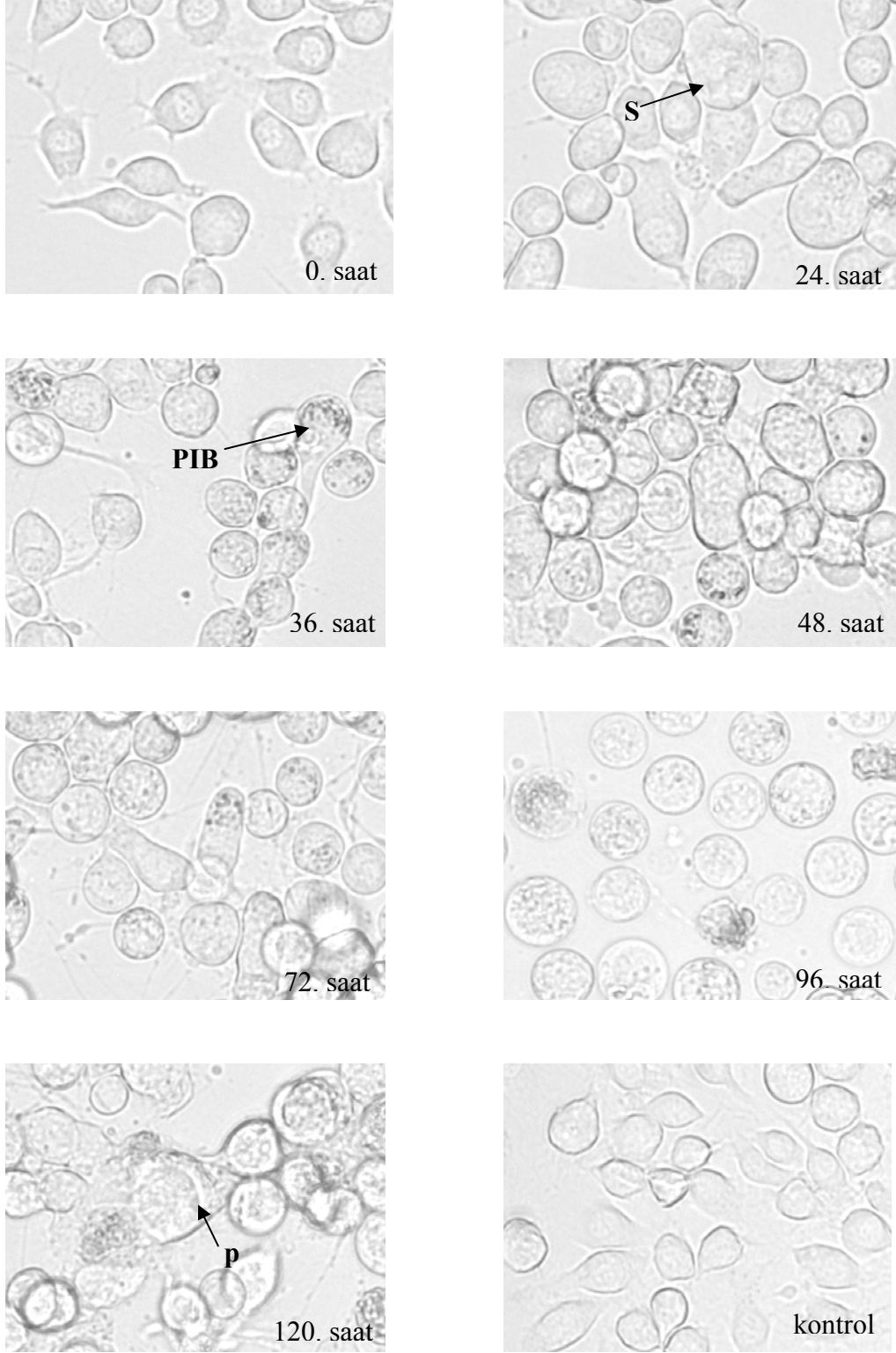
Hücreler enfeksiyondan sonra 12 saat aralıklarla mikroskopta incelendi. Meydana gelen sitopatik etkiler (CPE) kaydedildi ve kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Hücrelerde meydana gelen CPE'lerin en açık şekilde görüldükleri saatlere ait fotoğraflar (enfeksiyondan 0, 24, 36, 48, 72, 96 ve 120 saat sonra) kullanıldı.

Tn5 hücrelerinde, enfeksiyondan 0 saat sonra, doğal olarak herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı. Enfekte hücrelerin kontrol hücreleri ile aynı görüntüde oldukları belirlendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerde enfeksiyonun ilk belirtileri hücrelerin “stresli olmaları, granülleşmeleri ve irileşmeleri” şeklinde ortaya çıktı. Enfeksiyondan sonra geçen süre arttıkça hücrelerin şekillerinde de değişiklikler meydana gelmeye devam etti. Polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu ise ilk olarak enfeksiyondan 36 saat sonra gözlemlendi (Şekil 11). Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin yaklaşık %60-65’inin PIB ihtiva ettiği belirlendi. Enfeksiyondan 72 ve 96 saat sonra ise hücrelerin %90 oranında PIB ihtiva ettikleri, iyice esmerleştikleri, irileştikleri, granülleştikleri ve çoğunun tabandan koptuğu tespit edildi. Enfeksiyondan 120 saat sonra hücrelerin tamamının PIB ihtiva ettiği, hücrelerin parçalanmasıyla PIB’lerin kültür ortamına dağıldıkları ve çoğu hücrenin tabandan koparak kültür ortamında yüzdüğü gözlemlendi.

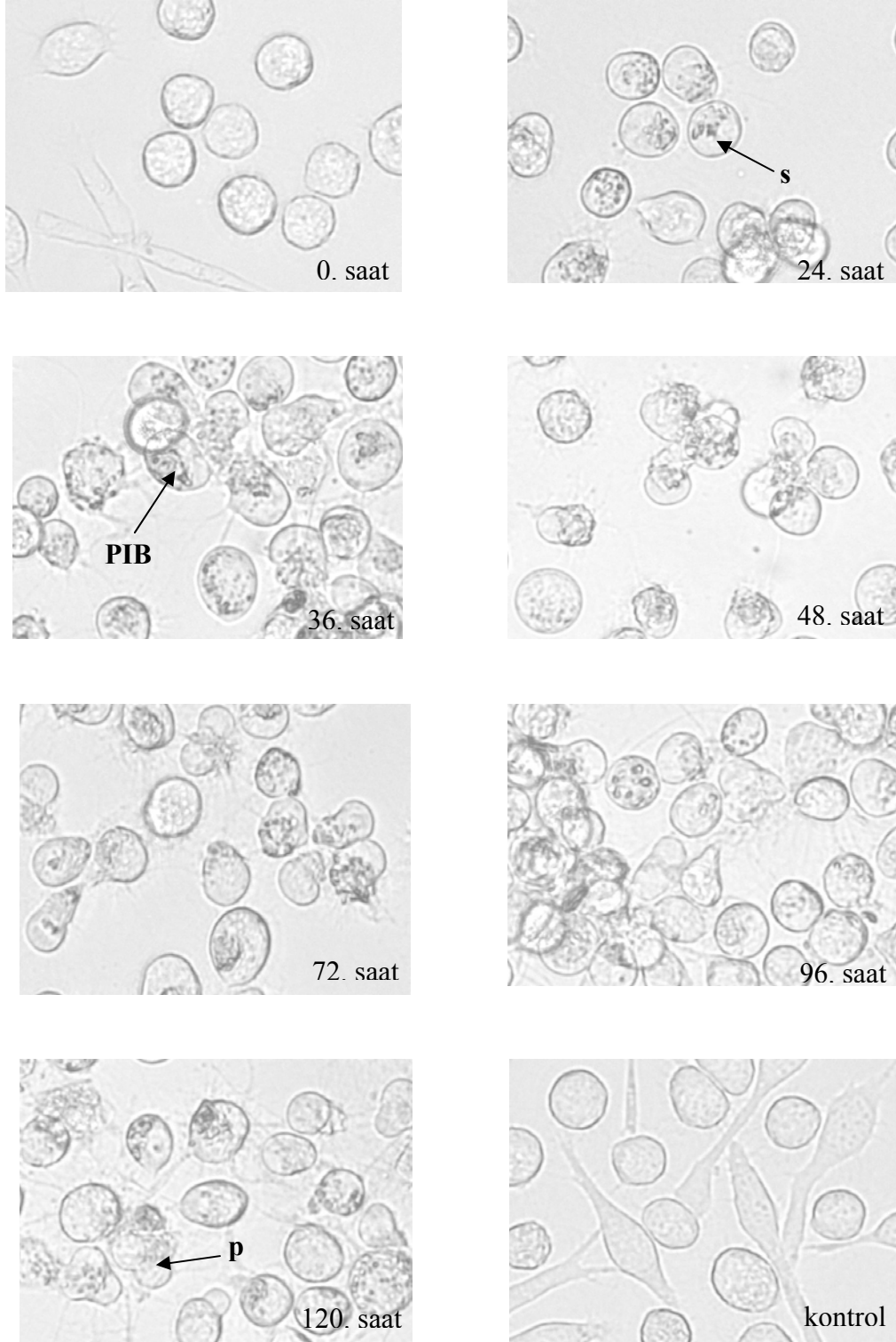
LdElta hücrelerinin ManeNPV ile enfeksiyonunda da enfeksiyondan 0 saat sonra herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı. Enfekte hücrelerin hemen hemen kontrol hücreleriyle aynı görüntüde oldukları tespit edildi. LdElta hücrelerinin enfeksiyondan 24 saat sonra çok yoğun bir şekilde stresli oldukları ve granül içerdikleri gözlemlendi (Şekil 12). İlk PIB oluşumu ise enfeksiyondan 36 saat sonra gözlemlendi ve bunun daha önce üretildiği tahmin edilmektedir. Enfeksiyondan 48 ve 72 saat sonra hücrelerin granülleşmeleri, irileşmeleri ve PIB oluşumu devam etti. Enfeksiyondan 96 ve 120 saat sonra ise hücrelerin tamamen PIB ile dolduğu, hücrelerin tabandan koparak parçalandığı ve PIB’lerin ortama dağıldığı gözlemlendi.

ManeNPV ile enfekte edilen Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücrelerinde virüs enfeksiyonuna ait herhangi bir özel belirtiyeye rastlanmadı. Enfekte olmuş Bm-5, Se-1 ve Cf-124T hücrelerinin kontrol hücreleriyle aynı görüntüde oldukları ve hücrelerin bölünmeye devam ettiği tespit edildi. Sf21 hücrelerinin ise enfeksiyon belirtisine ait herhangi bir CPE ve PIB oluşumu göstermediği ancak, enfeksiyon sonunda kontrol hücreleriyle kıyaslandığında hücrelerin küçük granüller ve veziküller halinde parçalanmış oldukları gözlemlendi (Şekil 13,14,15,16).

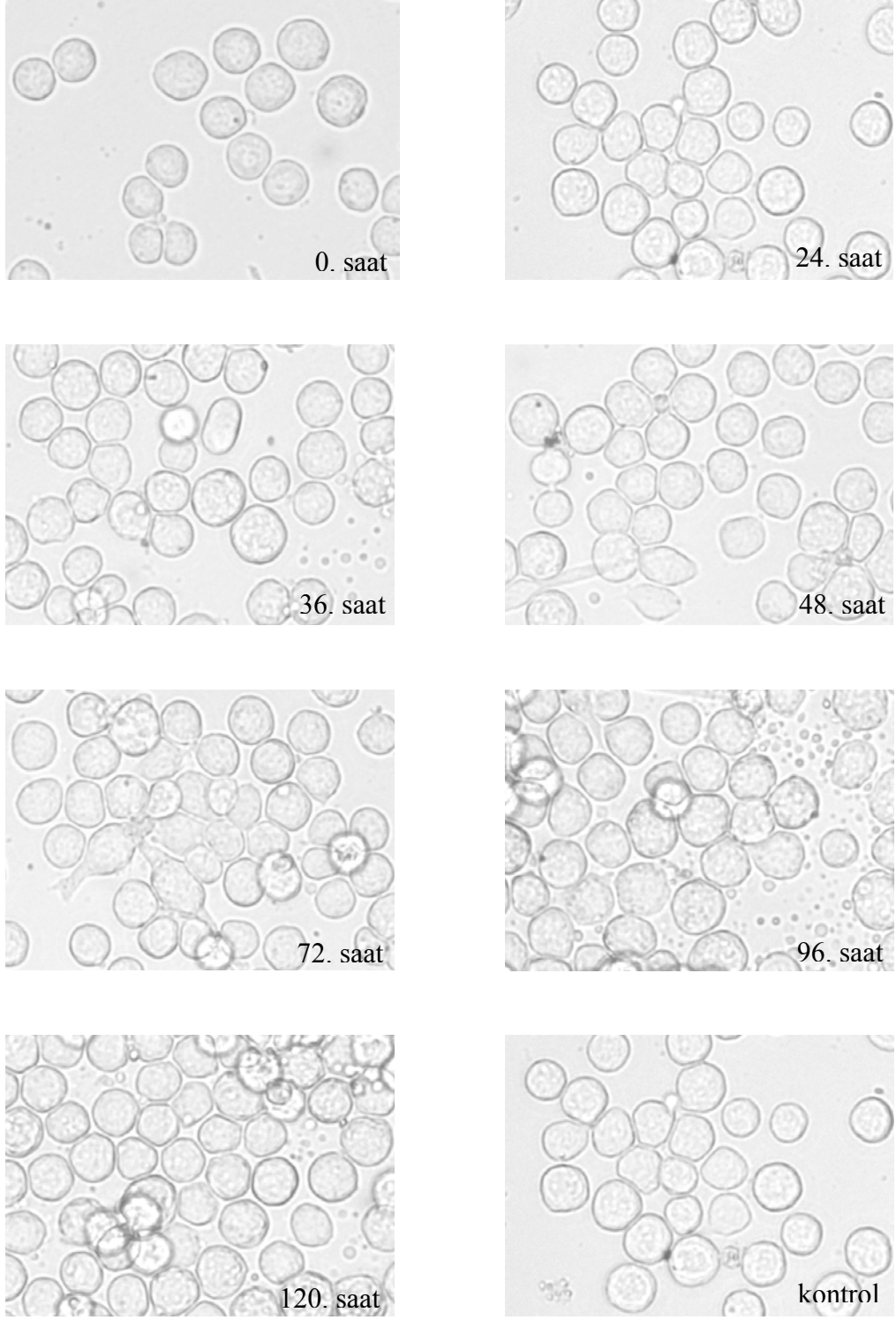
ManeNPV’nin konak spektrumunu belirlemeye yönelik yapılan çalışmada Md203 hücreleri kontrol olarak kullanıldı. Md203 hücrelerinde yapılan enfeksiyonda, bu hücrelerin ManeNPV ile enfekte olduğu tespit edilmişti. Daha önceki çalışmada ortaya çıkan CPE, PIB oluşumu gibi enfeksiyon belirtilerinin aynı şekilde meydana geldiği belirlendi (Şekil 17).



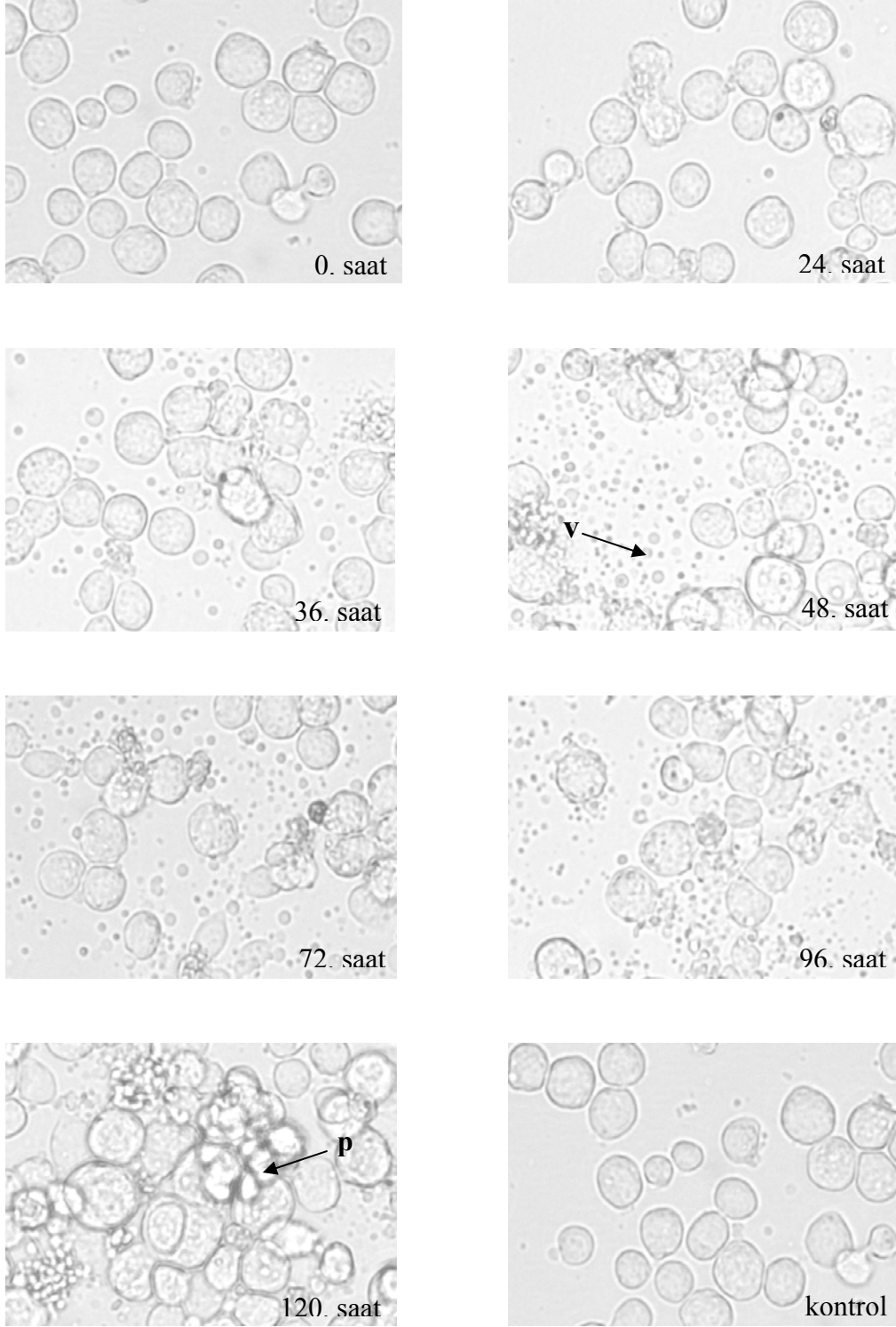
Şekil 11. ManeNPV ile enfekte olan Tn5 hücreleri. s: Stresli ve irileşmiş hücre, u: Uzamış hücre, PIB: Polihedral inklüzyon yapı, p: Parçalanmış hücre



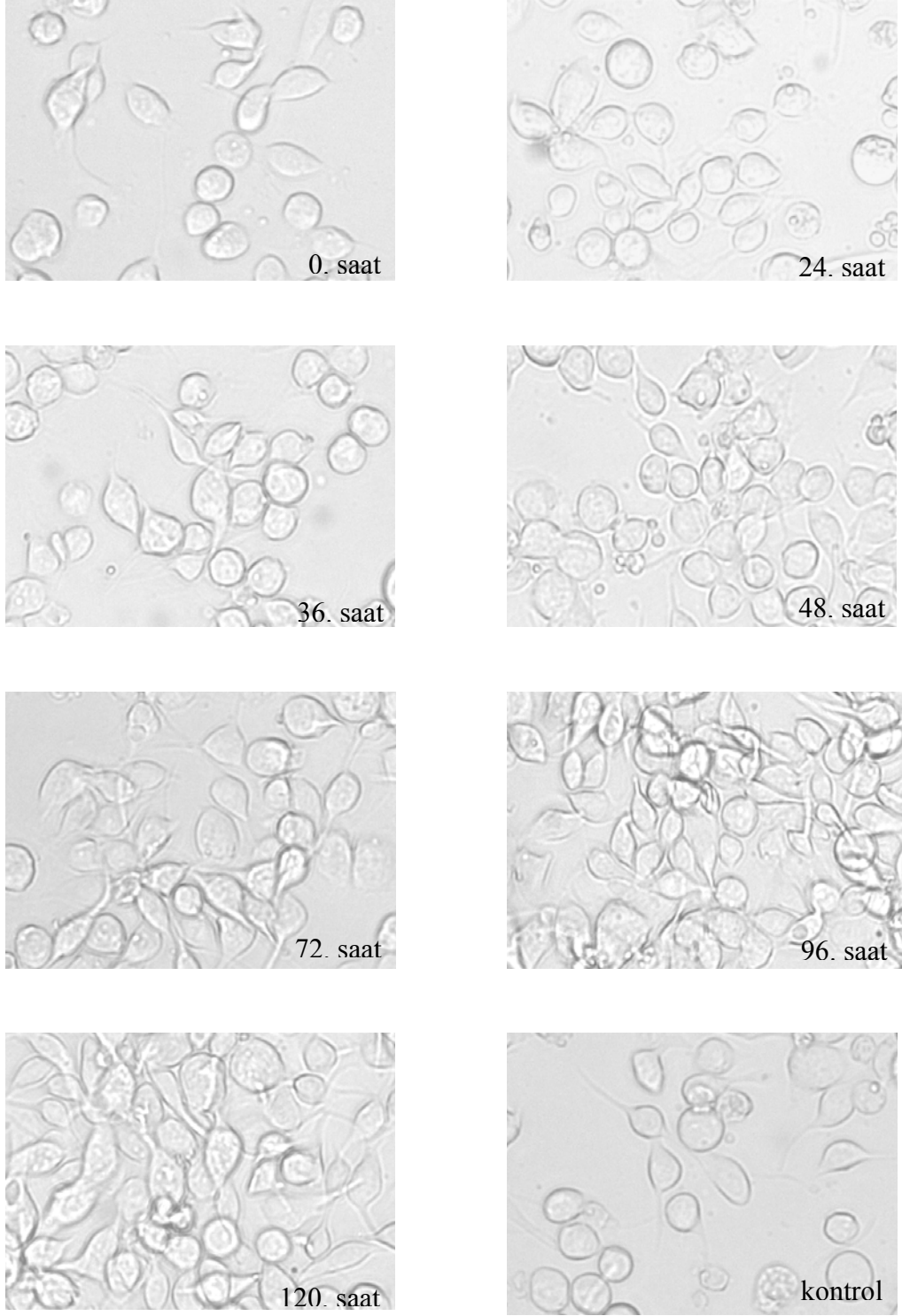
Şekil 12. ManeNPV ile enfekte olan LdElta hücreleri. s: Stresli ve granülleşmiş hücre, PIB: Polihedral inklüzyon yapı, p: Parçalanmış hücre



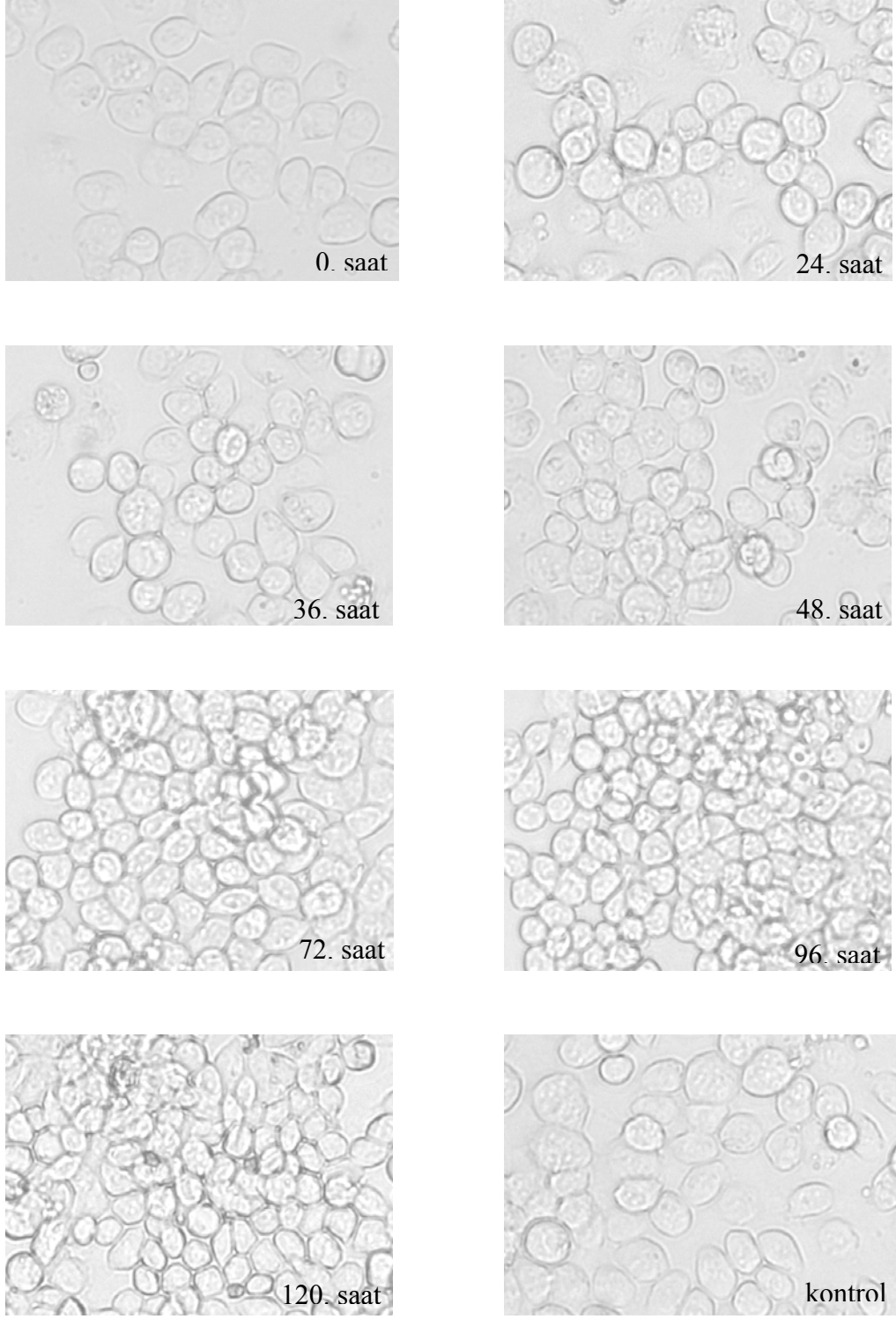
Şekil 13. ManeNPV ile enfekte olan Bm-5 hücreleri



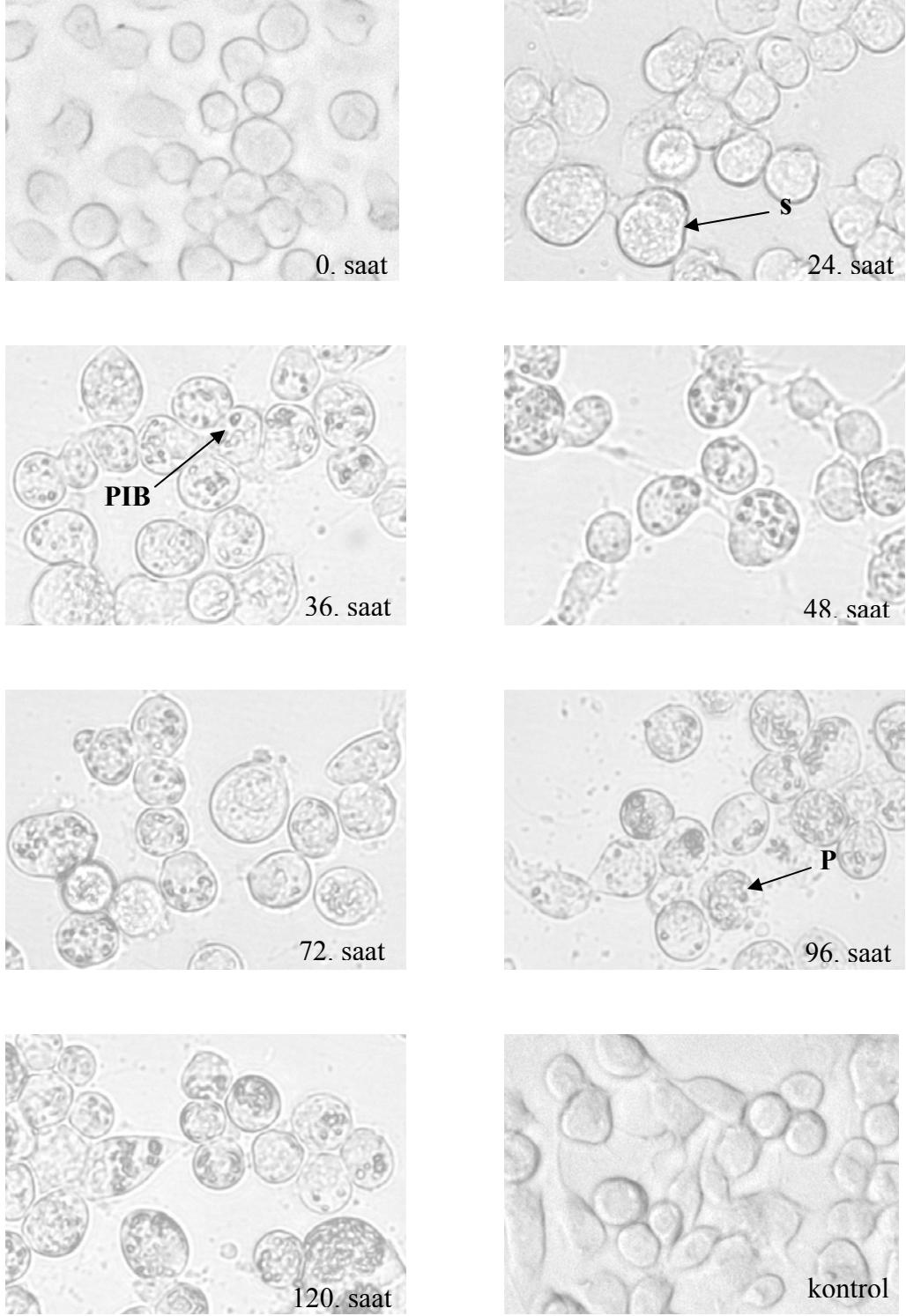
Şekil 14. ManeNPV ile enfekte olan Sf21 hücreleri. v: Granül ve veziküller, p: Parçalanmış hücre



Şekil 15. ManeNPV ile enfekte olan Se-1 hücreleri



Şekil 16. ManeNPV ile enfekte olan Cf-124T hücreleri

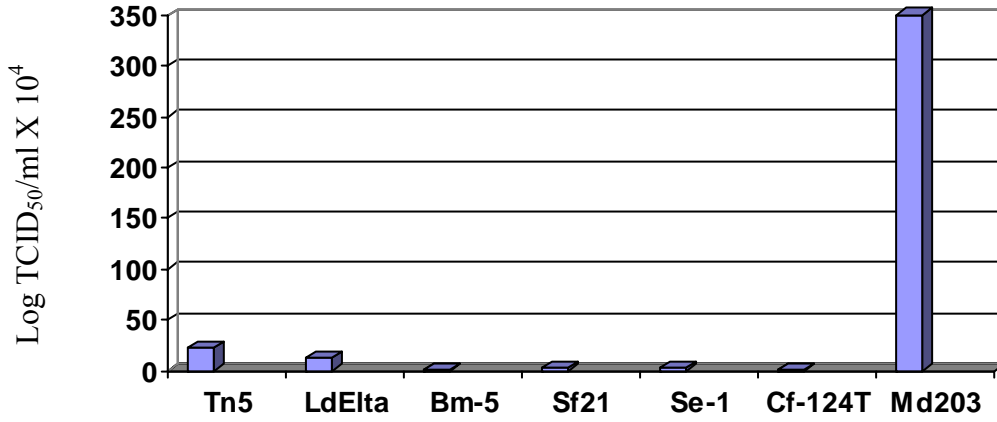


Şekil 17. ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücreleri

3.6.2. ManeNPV ile Enfekte Olan Farklı Hücre Kültürlerinde Üretilen Ekstrasellüler Virüs Üretimi

Enfeksiyondan 120 saat sonra Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 (kontrol) hücrelerinden kültür sıvıları alındı ve ihtiva ettikleri ekstrasellüler virüs konsantrasyonları doku kültürü enfektif doz (TCID₅₀)'ye göre hesaplandı. Bu hesaplama sonunda örnek alınan tüm hücrelerde üretilen BV konsantrasyonlarının sırasıyla, 2.18×10^5 , 1.25×10^5 , 0.5×10^4 , 3.16×10^4 , 3.16×10^4 , 0.316×10^4 ve 3.16×10^7 pfu/ml olduğu hesaplandı. Bu değerlerin 10^4 'ünün bazal titer olduğu belirlendi. Buna göre, Tn5 ve LdElta hücrelerinde temel titerin yaklaşık 10 katı, Md203 hücrelerinde ise 10^3 katı bir artış olduğu ve diğer hücrelerde ise temel titere göre çok fazla bir artış olmadığı belirlendi.

Tüm hücrelerde enfeksiyondan 120 saat sonra üretilen ekstrasellüler virüs logaritması y eksenini, hücreler x ekseninde gösterilerek virüs çoğalma eğrisi çizildi (Şekil 18).



Şekil 18. ManeNPV ile enfekte Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 hücrelerindeki BV üretimi. X eksenini: Örnek alınan hücreleri, Y eksenini: Virüs konsantrasyonu TCID₅₀/ml x 10⁴

3.6.3. Farklı Hücre Kültürlerinde ManeNPV'nin DNA Replikasyonu

Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 (kontrol) hücre kültürlerinden enfeksiyondan 24 saat sonra alınan örneklerde ManeNPV'nin replikasyonu yukarıda belirtildiği gibi slot blot hibridizasyonu ile belirlendi. Tn5 ve LdElta hücrelerinde oluşan bantlar bu hücrelerde DNA replikasyonunun gerçekleştiğini gösterdi (Tn5 hücrelerinde çok koyu olmamakla birlikte). Bu durum bu hücrelerde DNA replikasyonunun 24 saatten daha önce başlamış olduğunu göstermektedir. Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücrelerinde ise herhangi bir bant oluşmaması, bu hücrelerde DNA replikasyonunun meydana gelmediğini gösterdi. Md203 hücrelerinde ise DNA replikasyonunun gerçekleştiğini gösteren koyu bir bant oluşumu gözlemlendi (Şekil 19).



Şekil 19. ManeNPV ile enfekte Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1, Cf-124T ve Md203 hücrelerinde viral DNA replikasyonu enfeksiyondan 24 saat sonra slot blot hibridizasyon yöntemiyle belirlendi. K: Viral DNA ihtiva etmeyen kontrol, V: Viral DNA

4. TARTIŞMA

Malacosoma neustria larvalarından izole edilen *Baculoviridae* familyasına ait *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ün *in vitro* replikasyonel özellikleri ilk kez bu çalışmayla *Malacosoma disstria*'dan geliştirilmiş Md203 hücre suşunda karakterize edildi. Daha sonra *Trichoplusia ni* (Tn5), *Lymantria dispar* (LdElta), *Bombyx mori* (Bm-5), *Spodoptera frugiperda* (Sf21), *Spodoptera exigua* (Se-1), *Choristoneura fumiferana* (Cf-124T) gibi Lepidopterlardan geliştirilmiş hücre kültürlerinde ManeNPV'nin replikasyonel özellikleri ve konak spektrumu belirlendi.

Çalışmada ilk olarak *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ünün bir lepidoptera hücre kültürü olan *Malacosoma disstria* hemositlerinden geliştirilmiş Md203 hücre kültürü sistemine uyarlanması yapıldı. Virüsün hücrelerdeki sitopatik etkileri, ekstrasellüler virüs üretimi, polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu, DNA replikasyonu ve viral proteinlerin ekspresyonları incelendi.

Md203 hücrelerinin ManeNPV ile enfeksiyonunda, enfeksiyondan 0 saat sonra herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı. Enfeksiyondan 24 saat sonra görülmeye başlayan NPV enfeksiyonuna ait sitopatik etkilerin (CPE), enfeksiyondan 36 saat sonra açık bir şekilde ortaya çıktığı tespit edildi. Bu sitopatik etkiler, Lepidoptera hücre kültürlerinde NPV enfeksiyonunun tipik CPE'leri olan "hücrelerin irileşmesi, sitoplazmik uzantılarını kaybetmesi, granülleşmesi, nukleusun şişmesi ve kararması, hücrelerin elips şeklini alması, yuvarlaklaşması, PIB oluşumu ve son olarak PIB'lerin saçılarak hücrelerin parçalanması"dır (Williams ve Faulkner, 1996; Blissard, 1996). Benzer sitopatik etkiler, Demirbağ ve arkadaşları (1997) tarafından *Autographa californica* nükleopolihedrovirüsün *Spodoptera frugiperda* ve *Anticarsia gemmatalis* hücre kültürlerinde karşılaştırmalı replikasyonunda da tespit edilmiştir. Yine benzer etkiler Castro ve arkadaşları (1997) tarafından *Anticarsia gemmatalis* nükleopolihedrovirüsün *Anticarsia gemmatalis* UFL-Ag286, *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21, *Choristoneura fumiferana* IPRI-Cf124T ve *Bombyx mori* Bm-5 hücre kültürlerinde replikasyonunun araştırıldığı bir çalışmada da ortaya konulmuştur. Bu çalışmada ilk PIB oluşumu enfeksiyondan 36 saat sonra ortaya çıktı. Erdlanson ve arkadaşları (2006), plak saflaştırmayla *Malacosoma disstria*'dan izole edilen MadiNPV ile *Malacosoma disstria* hemositlerinden geliştirilmiş 3 farklı hücre kültürünün enfeksiyonunda, PIB'leri enfeksiyondan 72 saat sonra belirlemişlerdir. Riegel

ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan Ld652Y hücrelerinin LdMNPV ile enfeksiyonu çalışmasında tipik sitopatik etkilerin enfeksiyondan 24 saat sonra ortaya çıktığı ve ilk PIB oluşumunun ise enfeksiyondan 48 saat sonra görüldüğü belirtilmiştir. Andrew ve arkadaşları (1995) tarafından MdMNPV-A92 ve AcMNPV'nin UA-Md210, UA-Md203 ve UA-Md221 hücre kültürlerindeki replikasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada da benzer sitopatik etkiler meydana getirdiği rapor edilmiştir. Demirbağ ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüsün *Lymantria dispar* hücre kültüründe yaptığı çalışmada da benzer CPE'lerin ortaya çıktığı belirtilmiştir. Enfeksiyondan 48 ve 60 saat sonra hücrelerde PIB oluşumunun devam ettiği, hücrelerin bölünmediği, irileştiği ve yuvarlaklaştığı ve hücre bölünmesinin durduğu tespit edildi. Enfeksiyondan 72 saat sonra hücrelerin tabandan kopmaya başladıkları, PIB'lerin daha belirgin olduğu ve hücrelerin çoğunun PIB ile dolduğu görüldü. Mitsunashi (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, *Malacosoma neustria testacea* nükleopolihedrovirüsün (Mnt-NPV) *Malacosoma neustria testacea* hücre kültüründe (FRI-Mnt-520A) duyarlı bir enfeksiyon oluşturduğu, enfeksiyondan 3 gün sonra hücrelerin %30'unda PIB üretimi olduğu ve PIB ihtiva eden hücrelerin sayılarının giderek arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, MdNPV'nin FRI-Mnt-520A hücre kültüründe kendi konağı olduğu halde enfeksiyon oluşturmadığı gösterilmiştir. Ancak, bu çalışmada ManeNPV'nin kendi konağı olmadığı halde Md203 hücre suşunda enfeksiyon oluşturduğu görülmektedir. Enfeksiyondan 84 ve 96 saat sonra ise hücrelerin şekillerinin kontrol ile karşılaştırıldıklarında tamamen değiştiği, uzantılarını kaybederek elips şeklini aldıkları ve irileştikleri gözlemlendi. Ayrıca, hücrelerin tamamının PIB'lerle dolduğu, PIB'lerin siyah kümeler halinde oldukları ve bazı hücrelerin parçalanarak PIB yapılarının kültür ortamına dağıldıkları tespit edildi.

Md203 hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs konsantrasyonlarına bakıldığında, enfeksiyondan 0 saat sonra temel virüs titerinin yaklaşık 10^4 pfu/ml olduğu belirlendi ve BV konsantrasyonu 1.44×10^4 pfu/ml olarak hesaplandı. Castro ve arkadaşları (1997) ve Demir ve Demirbağ (2006) tarafından yapılan benzer çalışmalarda da enfeksiyondan 0 saat sonra kültür ortamında 10^4 pfu/ml seviyelerinde bir temel virüs titerini rapor edilmiştir. Enfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra üretilen BV miktarlarının sırasıyla 1.73×10^5 , 5.49×10^5 pfu/ml'ye ulaşmasıyla virüs titerinin yaklaşık 10 kat arttığı tespit edildi. Enfeksiyondan 72 saat sonra BV konsantrasyonunun 4.78×10^6 pfu/ml olması temel titere göre yaklaşık 100 kat artış olduğunu gösterdi. Enfeksiyondan 96 saat sonra ekstrasellüler virüs miktarı

1.19×10^7 pfu/ml'ye ulaştı. Bu da titerin yaklaşık 1000 kat artışı anlamına gelmektedir. Shirata ve arkadaşları (1999), farklı hücre kültürlerindeki BV oranlarındaki artışın 6.6-15.000 kat arasında değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada Sf21 hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonunda, enfeksiyondan 48 saat sonra ekstrasellüler virüs miktarının 200 kat arttığı belirtilmiştir. Demir ve Demirbağ (2006), Sf21 ve LdE1ta hücrelerinin HycuNPV ile enfeksiyonu çalışmasında enfeksiyondan 72 saat sonra üretilen BV konsantrasyonunun 5.6×10^9 pfu/ml olduğunu ve virüs titerinde yaklaşık 10^5 kat bir artış olduğunu göstermişlerdir. Oysa, bu çalışmada enfeksiyondan 96 saat sonra temel titere göre ancak 10^3 kat artış görülmüştür. UFL-Ag-286 hücre kültürünün AgNPV ile enfeksiyonunda da henüz 48 saat sonra virüs titerinin 4.3×10^8 pfu/ml'ye ulaştığı ve hücrelerin %90'ında PIB olduğu belirtilmiştir (Castro vd., 1996). Erlandson ve arkadaşları (2006), *Malacosoma disstria* hemositlerinden geliştirilmiş 3 farklı hücre kültürünün, UA-Md203, 210 ve 221, plak saflaştırma ile elde edilmiş 7 farklı *Malacosoma disstria* NPV izolatına duyarlı olduğunu ve her hücre kültürünün MadiNPV suşlarına farklı derecede duyarlılık gösterdiğini ve maksimum BV üretiminin enfeksiyondan 48 saat sonra olduğunu ve BV üretiminde ilerleyen zamanlarda artış olmadığını rapor etmişlerdir. Oysa, bu çalışmada maksimum BV üretimi enfeksiyondan 96 saat sonra belirlenmiştir.

Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüsün Md203 hücrelerindeki viral DNA replikasyonu slot blot hibridizasyonu ile belirlendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra çok koyu olmamakla birlikte oluşan bant viral DNA sentezinin gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Ortamda DNA olması replikasyonun daha önce başlamış olduğunu (enfeksiyondan 18-20 saat önce gibi) ve enfeksiyondan sonra 48 ve 72. saatlere doğru ilerledikçe bantların daha da koyulaşması DNA replikasyonunun artarak devam ettiğini göstermektedir. NPV'lerde DNA replikasyonu genellikle enfeksiyondan 6-8 saat sonra başlar ve giderek artar. Bu, DIG ile enfeksiyondan 8-12 saat sonra net bir şekilde tespit edilebilir (Shirata vd., 1999). DNA replikasyonunun bazı çalışmalarda 18-20 saat arasında başladığı da bilinmektedir (Riegel vd., 1997). Benzer çalışmalarda, *Spodoptera frugiperda* nükleopolihedrovirüsün (SfMNPV), üretken bir hücre sistemi olan Sf21 hücrelerindeki enfeksiyonunda viral DNA replikasyonunun, enfeksiyondan 8-16 saat sonra başladığı ve 16-20 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir (Liu ve Bilimoria, 1990). Başka bir çalışmada, Castro ve arkadaşları (1997), *Anticarsia gemmatilis* nükleopolihedrovirüs viral DNA replikasyonunun Sf21 hücrelerinde enfeksiyondan 6 saat sonra başladığını ve 48 saat sonra yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmiştir. Bu çalışmada, viral DNA replikasyonunun

yaklaşık 12 saatlik bir gecikmeyle meydana geldiği ve maksimum seviyeye 72 saat sonra ulaştığı görülmektedir. Demir ve Demirbağ (2006), Sf21 ve LdEltA hücrelerinin HycuNPV ile enfekte edildiği çalışmada ise viral DNA replikasyonunun enfeksiyondan 12 saat sonra başladığını ve enfeksiyondan 24 saat sonra ise yüksek seviyeye ulaştığını ve maksimum sentez oranının enfeksiyondan sonra 24-48 saat arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Ag-286 hücrelerinin AgNPV ile enfekte edildiği bir çalışmada ise viral DNA replikasyonunun enfeksiyondan 2 saat sonra başladığı, enfeksiyondan 6 saat sonra yüksek seviyeye ulaştığı ve sentez oranının enfeksiyondan sonra 6-12 saat arasında maksimum seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir (Castro vd., 1996). Rivkin ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan HaSNPV ile Hz-AM1 hücre kültürünün enfeksiyonu çalışmasında viral DNA replikasyonunun enfeksiyondan 24 saat sonra belirlendiği ve enfeksiyondan 24-48 saat sonra önemli miktarda artış gösterdiği belirtilmiştir. Keddie ve arkadaşları (1995), MdmNPV-A92 nükleopolihedrovirüsün kendi konağı olan UA-Md203 hücrelerinde hızlı bir şekilde replike olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da ManeNPV'nin Md203 hücrelerinde verimli bir şekilde replike olduğu gösterildi.

ManeNPV ile enfekte olan Md203 hücrelerinde virüse ait proteinlerin eksprese olup olmadığı, SDS- poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendi. NPV'ler bol miktarda polihedra olarak adlandırılan bir inklüzyon yapı proteini üretir. Polihedra, polihedrin olarak adlandırılan tek bir polipeptitten oluşur. Polihedrinin ekspresyonu çok geç ekspresyon faktör-1 ve *ie-1* ve *lef-2* genlerini içeren bazı geç ekspresyon faktör genlerinin üretilmesine bağlıdır (Lu ve Miller, 1997). Virionların çoğu polihedra içerisine gömülür. Böylece, doğada virionlar çeşitli çevresel etkilerden korunmuş olur. Jarvis ve arkadaşları (1991), bakülovirüs polihedrin proteininin hücre içi lokalizasyonunu ortaya koymuştur. Katsuma ve arkadaşları (2000) da bu proteinin hem sitoplazmada hem de nukleusta bulunduğunu tespit etmiştir. NPV'lere ait en iyi karakterize edilmiş proteinlerden biri olan polihedrin 24-29 kDa büyüklüğündedir. Polihedrin, en geç genlerden olup, DNA replikasyonu için gerekli olmayan bir proteindir (Beljelarskaya, 2002). Enfeksiyondan 12-18 saat sonra sentezlenmeye başlar ve ilerleyen saatlerde miktarı maksimum seviyelere çıkar (Liu ve Bilimoria, 1990; Kovacs vd., 1991).

Md203 hücrelerinin ManeNPV ile enfeksiyonunda enfeksiyondan 36 saat sonra polihedrin proteininin eksprese olduğu SDS-PAGE ile tespit edildi. Genel olarak bu protein SDS-PAGE yöntemiyle enfeksiyondan 36-48 saat sonra tespit edilebilir. Enfeksiyondan 48 ve 72 saat sonra ise hücrelerdeki polihedrin yoğunluğunun giderek

arttığı bantların koyuluğundaki artış ile belirlendi. Rivkin ve arkadaşları (1998), HaSNPV ile enfekte olmuş Hz-AM1 hücre kültüründe viral protein sentezinin enfeksiyondan 48 saat sonra başladığını ve 72 saat sonra polihedrin yoğunluğunun arttığını rapor etmişlerdir. Cha ve arkadaşları (1995), HcNPV'ye ait polihedrin ve p10 (polihedrin gibi bir en geç gen ürünü) proteinlerinin Sf21 hücrelerinde üretildiğini, "western blot" ve SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemleriyle göstermiştir. Bu tez çalışmasında ManeMNPV polihedrin proteinin Md203 hücrelerinde ekspresyonu ile ilgili elde edilen veriler, Cha ve arkadaşlarının (1995) bulduğu sonuçlarla uyum göstermektedir. Shirata ve arkadaşları (1999), Sf21 hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonunda ekstrasellüler virüs üretildiğini ancak, polihedrin proteininin ekspres olmadığını belirtmiştir. McClintock ve arkadaşlarının (1986), *Autographa californica* nükleopolihedrovirüsün Ld652Y hücrelerinde replikasyonunu araştırdıkları bir çalışmada, enfeksiyondan 20 saat sonraya kadar sadece 4 proteinin sentezlendiğini ve enfeksiyondan 20-24 saat sonra hem konak hem de viral protein sentezinin tamamen baskılandığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada ise elde edilen veriler değerlendirildiğinde Md203 hücrelerinin ManeNPV için duyarlı (virüsün hücreye tutunması, hücre içerisine girişi, DNA replikasyonu gerçekleşmesi, makromoleküller sentezlenmesi, moleküllerin birleşmesi ve virüsün hücreden salınımı gibi olaylar) olduğu tespit edildi. Lavina ve arkadaşları (2000) *Spodoptera litura* nükleopolihedrovirüs (SltMNPV)'ün biyolojik karakterizasyonunun yapıldığı benzer bir çalışmada SltMNPV ile enfekte Sf9 hücrelerinde polihedrin üretimin enfeksiyondan 24 saat sonra, CLS-79 ve TUAT-SpLi221 hücrelerinde ise enfeksiyondan 12 saat sonra başladığını belirtmişlerdir. Yine Demir ve Demirbağ (2006), HycuNPV'nin Sf21 ve LdElta hücrelerinde polihedrin proteini sentezinin her iki hücrede de enfeksiyondan 24 saat sonra başladığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise ManeNPV ile enfekte Md203 hücrelerinde polihedrin proteini enfeksiyondan 36 saat sonra görülmektedir.

Yukarıda da belirtildiği gibi ManeNPV'nin Md203 hücrelerinde meydana getirdiği CPE'ler tipik bakülovirüs CPE'lerini sergilemektedir. CPE'lerin ortaya çıkışı ve ilk PIB oluşumu diğer NPV enfeksiyonlarıyla uyum içerisindedir. BV üretimi ise diğer NPV enfeksiyonlarına göre daha düşüktür. DNA replikasyonu yaklaşık 12 saat gibi bir gecikme ile gerçekleşmiştir.

ManeNPV'nin *in vitro* konak spektrumunu belirlemek amacıyla Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücre kültürleri ManeNPV ile enfekte edildi ve bu hücre

kültürlerinde meydana gelen CPE'ler, BV üretimi ve viral DNA replikasyonu özellikleri belirlendi.

Çalışmada Tn5 hücrelerinin ManeNPV'ye olan duyarlılığı araştırıldı. Enfeksiyondan 0 saat sonra hücrelerde herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı. Enfeksiyondan 24 saat sonra tipik NPV sitopatik etkileri görüldü. Hücrelerin irileştiği ve stresli oldukları görüldü. PIB oluşumu ilk olarak enfeksiyondan 36 saat sonra görüldü. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin esmerleşmeye başladığı, şekil bozukluklarının meydana geldiği, PIB oluşumunun devam ettiği tespit edildi. Enfeksiyonun ilerleyen saatlerinde (enfeksiyondan sonra 72 ve 96 saat sonra) hücrelerin tabandan kopmaya başladığı, PIB'lerin siyah kümeler oluşturduğu ve hücrelerin %95'inin PIB ihtiva ettiği görüldü. Enfeksiyondan 120 saat sonra hücrelerin kontrol ile kıyaslandığında şekillerini tamamen kaybettiği, çoğu hücrenin parçalanarak PIB'lerin kültür ortamına dağıldığı tespit edildi.

Tn5 hücrelerinde enfeksiyondan 120 saat sonra BV üretimi 2.18×10^5 pfu/ml olarak hesaplandı. Çalışmada kontrol olarak kullanılan Md203 hücrelerinde enfeksiyondan 120 saat sonra üretilen ekstrasellüler virüs miktarı 3.16×10^7 pfu/ml olarak hesaplandı. 10^4 pfu/ml olarak hesaplanan temel titere göre sadece 10 kat bir artış olduğu görülmektedir. Bu durum Tn5 hücrelerinde Md203 hücrelerine göre daha düşük BV üretimi olduğunu gösterdi. BV üretiminden elde edilen bu sonuçlar, Tn5 hücrelerinde tipik NPV CPE'leri görülmesine rağmen, hücrelerde ekstrasellüler virüs üretiminin oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Tn5 hücrelerinde viral DNA replikasyonu slot blot hibridizasyonla belirlendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra alınan örneklerle yapılan hibridizasyon sonucunda çok koyu olmamakla birlikte bir bant oluştuğu görüldü. Bant oluşumu viral DNA sentezinin gerçekleştiğini göstermiştir. Ancak, hücrelerde meydana gelen sitopatik etkilerle viral DNA sentezi arasında bir uyumsuzluk olduğu görülmektedir.

LdEltA hücre kültüründe yapılan enfeksiyonda, enfeksiyondan 0 saat sonra hücrelerde herhangi bir CPE'ye rastlanmadı. Enfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin uzantılarını kaybettikleri, stresli ve granüllü oldukları ve irileştikleri görüldü. PIB oluşumu ise enfeksiyondan 36 saat sonra gözlemlendi. Benzer şekilde, Ishikawa (2003), LdMNPV ve AcMNPV nükleopolihedrovirüslerinin Ld652Y hücrelerinde verimli bir enfeksiyon oluşturduğunu belirtmiştir. Yine aynı çalışmada, HycuNPV ile enfekte Ld652Y hücrelerinde viral geç gen sentezinin bir önceki adımında virüs replikasyon siklusunun

engellendiğini ve hücrelerin apoptozise uğradığını rapor etmiştir. Demir ve Demirbağ (2006), LdELta hücrelerinin HycuNPV nükleopolihedrovirüse duyarlı olduğunu, hücrelerde meydana gelen CPE'lerin enfeksiyondan 36 saat sonra ortaya çıktığını ve ilk PIB oluşumunun enfeksiyondan 48 saat sonra görüldüğünü rapor etmişlerdir. Enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin çoğunun tabandan koptuğu, şekil bozukluklarının devam ettiği ve esmerleştikleri tespit edildi. Enfeksiyondan sonra 72 ve 96. saatlerde çoğu hücrenin tabandan kopmuş olduğu, hücrelerin %95'nin PIB ihtiva ettiği hücrelerin parçalanmaya başladığı görüldü. Enfeksiyondan 120 saat sonra PIB'lerin siyah kümeler oluşturdukları, hücrelerin çoğunun parçalanarak PIB'lerin kültür ortamına dağıldıkları tespit edildi.

LdELta hücrelerinde ekstrasellüler virüs üretimi enfeksiyondan 120 saat sonra 1.25×10^5 pfu/ml (10 kat) olarak hesaplandı. Hücrelerde meydana gelen sitopatik etkilere bakıldığında hücrelerde BV üretiminin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Benzer bir çalışmada, HycuNPV ile enfekte LdELta hücrelerinde enfeksiyondan 72 saat sonra BV konsantrasyonu 1.77×10^9 pfu/ml olarak hesaplanmıştır (Demir ve Demirbağ, 2006). Bu çalışmada ise enfeksiyondan 120 saat sonra temel titerin yaklaşık 10 katı bir artış görülmektedir.

Enfeksiyondan 24 saat sonra LdELta hücrelerinde viral DNA replikasyonunun gerçekleştiği hibridizasyon sonucunda elde edilen yoğun bir bant oluşumu ile anlaşılmaktadır. Ancak, BV üretiminin çok düşük olması ile viral DNA sentezi arasında bir uyumsuzluk olduğu görülmektedir. AcMNPV'nin Ld652Y hücrelerindeki yarıduyarlı replikasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, DNA replikasyonunun, enfeksiyondan 8-12 saat sonra başladığı, 12-20 saat sonra maksimum düzeye ulaştığı ve 20-36 saat sonra durduğu belirlenmiştir (McClintock vd., 1986). Bu karşılaştırmayı yapmamız, yukarıda da belirtildiği gibi AcMNPV'nin nükleopolihedrovirüsler için tip türü olmasındandır. Bradford ve arkadaşları (1990) *L. dispar* hücrelerinde *Orgyia pseudotsugata* nükleopolihedrovirüsünün enfeksiyon döngüsünün karakterizasyonunu ortaya koydukları çalışmada, viral DNA replikasyonunun enfeksiyondan 12 saat sonra, polihedrin oluşumunun ise 48 saat sonra meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, Riegel ve Slavicek (1997) Ld652Y hücrelerinde LdNPV'nin replikasyonunun enfeksiyondan 18-20 saat sonra başladığını ve enfeksiyondan 24-48 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığını bulmuştur.

Bu çalışma hem Md203 hücrelerinde hem de Tn5 ve LdELta hücrelerinde tespit edilen sitopatik etkilerin, bakülovirüs ile enfekte Lepidoptera hücrelerinde meydana gelen

klasik etkilerle benzerlik gösterdiği, yapılan karşılaştırmalar sonunda ortaya çıkarılmıştır. Enfeksiyondan 72 saat sonra LdElta hücreleri parçalanıp, PIB'ler kültür ortamına dağılırken, Tn5 hücrelerinde böyle bir duruma rastlanmadı. Böylece LdElta hücrelerinin parçalanmaya karşı Tn5 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu ortaya çıktı. Slot blot hibridizasyonu sonucunda oluşan bantlar her iki hücrede de DNA replikasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, viral DNA replikasyonunun iki hücrede de paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yukarıda tartışılan Tn5 ve LdElta hücrelerinde meydana gelen CPE'lerin çalışmada kontrol olarak kullanılan Md203 hücrelerinde ortaya çıkma zamanları ile uyum içerisinde oldukları ancak, ekstrasellüler virüs konsantrasyonlarıyla uyumlu olmadığı ve ekstrasellüler virüs üretiminin Md203 hücrelerine göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Çünkü, enfeksiyondan sonra 120 saat sonra Tn5 ve LdElta hücrelerinde üretilen virüs konsantrasyonu temel titerin yaklaşık 10 katı, Md203 hücrelerinde ise yaklaşık 10^3 katı bir artış göstermiştir.

Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücre kültürlerinde yapılan enfeksiyonu sonunda herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı. Hücrelerde herhangi bir CPE görülmedi, BV üretimine rastlanmadı ve viral DNA sentezi gerçekleşmedi. Bm-5, Se-1 ve Cf-124T hücrelerinin kontrol hücreleriyle aynı görüntüde oldukları tespit edildi. Sf21 hücrelerinin kontrol hücreleriyle kıyaslandığında küçük granüller ve veziküller halinde parçalanmış oldukları gözlemlendi.

Bm-5 hücrelerinin ManeNPV ile enfekte edildiği bu çalışmada hücrelerde enfeksiyon belirtisine ait herhangi bir etki görülmedi ve hücreler kontrol hücreleri ile aynı görüntüye sahip oldukları tespit edildi. Bm-5 hücrelerinin AgNPV ile enfekte edildiği bir çalışmada hücrelerin küçük vakuollerle çevrelendiği ve CPE'ler takip edildiğinde hücrelerde apoptotik yapılar gözlemlenmiştir. Ayrıca, hücrelerde PIB oluşmadığı ve virüs titerinde önemli miktarda artış olmadığı da gözlemlenmiştir (Castro vd.,1996). Aynı çalışmada, Bm-5 hücrelerindeki virüs konsantrasyonu 9.5×10^5 pfu/ml olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, aynı çalışmada da temel virüs titerinde de belirgin bir artış olmamıştır. Başka bir çalışmada ise Bm-4 hücrelerinin BmNPV ile enfekte olduğu ve enfeksiyondan 72 saat sonra polihedrin üretiminin %81.1'e ulaştığı belirtilmiştir (Shirata vd., 1999).

Castro ve arkadaşları (1996) Sf21 hücrelerinin AgNPV ile enfekte edildiği çalışmada, enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin %40-50'sinin PIB ihtiva ettiğini ve viral DNA replikasyonun 12 saat sonra başladığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise ManeNPV ile enfekte olan Sf21 hücrelerinde herhangi bir enfeksiyon belirtisine

rastlanmadı ve hücrelerin küçük granüller ve veziküller halinde parçalanarak hücrelerin apoptozise uğradığı görüldü. Shirata ve arkadaşları (1999) yaptıkları benzer bir çalışmada, Sf21 hücrelerinin BmNPV ve SeNPV ile enfekte olmadığını, ancak HcNPV ile enfeksiyonunda tipik NPV CPE'leri gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, ManeNPV ile enfekte edilen Se-1 hücre suşunun bu virüse duyarlı olmadığı görüldü. Yapılan benzer bir çalışmada da HcNPV ile enfekte Se301 hücrelerinin enfeksiyondan 72 saat sonra ancak %3 oranında PIB ihtiva ettiği belirtildi (Shirata vd., 1999). Ancak, aynı çalışmada SeNPV ile enfekte edilen Se-301 hücrelerinde enfeksiyondan 72 saat sonra %87.2 oranında polihedrin üretiminin olduğu rapor edilmiştir.

ManeNPV ile enfekte Cf-124T hücrelerinde virüsün bu hücre suşunda replike olmadığı yapılan bu çalışmada gösterildi. Başka bir çalışmada da Cf-124T hücrelerinin AgNPV'ye karşı duyarlı olmadığı, enfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin ancak %5'inin PIB ihtiva ettiği belirtilmiştir (Castro vd., 1996).

Bu çalışma ile hastalıklı larvalardan izole edilen *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ün *in vitro* koşullara adaptasyonu sağlanmış ve virüsün hücre kültürü koşullarında da üretimi yapılmıştır. *Malacosoma disstria* hemositinden geliştirilmiş Md203 hücrelerinin ManeNPV için duyarlı hücre suşu olduğu ispat edilmiştir. Virüse ait CPE'ler, ekstrasellüler virüs üretimi, DNA replikasyonu ve protein üretimi gibi özellikler kültür ortamında belirlenmiştir. Bu özelliklerin kendi aralarında uyumlu oldukları görülmektedir. Ayrıca, bunlar genel olarak bakülovirüslerin replikasyonel özelliklerini yansıtmaktadır. Virüsün *in vitro* temel çalışmalarının bu hücre suşunda yapılabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, konak spektrumunu belirlemek için çeşitli lepidopteralardan geliştirilmiş Tn5, LdElta, Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücre suşlarında ManeNPV'nin replikasyonel özellikleri belirlenerek, karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu hücre suşlarından sadece Tn5 ve LdElta hücrelerinin ManeNPV'ye duyarlı oldukları görüldü. Ekstrasellüler virüs üretimlerinin çok düşük olması, Tn5 ve LdElta hücrelerinin bu virüs ile enfeksiyonlarının çok verimli olmadığını gösterdi. Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücre kültürlerinde virüs enfeksiyonuna ait herhangi bir bulguya rastlanmadı.

Araştırma sonunda elde edilen veriler Tablo 1'de özetlenmiştir. ManeNPV'nin *in vitro* replikasyonel özellikleri ve konak spektrumunu gösteren bu sonuçlar, Md203, Tn5 ve LdElta hücre suşlarının ManeNPV için duyarlı hücre kültürleri olduğunu gösterdi. ManeNPV'nin Md203 hücrelerinde *in vitro* replikasyonel özellikleri ilk olarak bu çalışma

ile tespit edilmiş oldu. Böylece, *in vitro* çalışmalarda kullanılacak özellikleri bilinen bir materyal sağlanmış oldu.

Tablo 1. Çeşitli Hücre Suşlarının ManeNPV ile Enfeksiyonu

	Tn5	LdElta	Bm-5	Sf21	Se-1	Cf-124T	Md203
CPE	24-36 saat	24-36 saat	–	–	–	–	24-36 saat
PIB oluşumu	36. saat	36. saat	–	–	–	–	36. saat
DNA replikasyonu	24. saat	24. saat	–	–	–	–	24. saat
BV üretimi	10 kat	10 kat	–	–	–	–	10 ³ kat

5. SONUÇLAR

Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs (ManeNPV)'ün *Malacosoma disstria* (Md203) hücre kültüründe replikasyonu ışık mikroskopisi, moleküler teknikler ve hibridizasyon yöntemleriyle ilk kez belirlenerek *in vitro* replikasyonel özellikleri araştırıldığı ve çeşitli lepidoptera hücre kültürlerindeki enfektivite özelliklerinin tespit edildiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

Enfeksiyondan sonra hücrelerin irileşmesi, granülleşmesi, sitoplazmik uzantılarını kaybetmesi, hücre şekillerinin bozularak elips şeklini alması, nukleusun irileşmesi ve kararması, hücrelerde PIB oluşumu gibi sitopatik etkilere (CPE) bakıldığında Md203 hücrelerinin ManeNPV için üretken bir sistem olduğu anlaşılmaktadır.

CPE'lerin meydana gelmesi, PIB'lerin ortaya çıkması ve ekstrasellüler virüs üretimi, DNA replikasyonu ve polihedrin ekspresyonu diğer NPV enfeksiyonlarına göre daha geç meydana gelmiştir.

Üretken bir sistem olmasına rağmen, Md203 hücrelerinde CPE'lerin ortaya çıkmasındaki ve ekstrasellüler virüs üretimindeki gecikmelerin, konak faktörlerinin yetersizliği veya uyumsuzluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

ManeNPV'nin Tn5 ve LdElta hücrelerinde de genel NPV CPE'lerini gösterdiği ve bu iki hücre kültüründe virüs için üretken sistemler oldukları tespit edildi. Replikasyon üretken olmasına rağmen, BV üretiminin çok düşük ve DNA replikasyonunda çok geç gerçekleştiği gözlemlendi.

Bm-5, Sf21, Se-1 ve Cf-124T hücrelerinde ise herhangi bir replikasyon belirtisi görülmediği için bu hücrelerin virüs için üretken olmadığı tespit edildi. Sf21 hücrelerinin enfeksiyonun ilerleyen saatlerinde parçalanması apoptozise girmiş olabileceklerini göstermektedir.

Makromoleküllerin hücrelerde sentezlenmelerine rağmen, virüs partiküllerinin oluşumundaki gecikme ve konsantrasyon düşüklüğünün virüs asamblesi sırasındaki olayların uyumsuzluğundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

6. ÖNERİLER

ManeNPV'nin Md203 hücrelerinde DNA replikasyonunun ve PIB oluşumundaki gecikmenin, ekstrasellüler virüs üretiminin düşük olmasının nedenleri ve hangi konak faktörlerinin bu rolü oynadığı daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak anlaşılabilir.

Genel itibariyle ManeNPV'nin ve özellikle Md203 hücrelerinde üretilmiş PIB'lerin konak spektrumlarını belirlemek için farklı tarım zararlıları üzerindeki insektisidal etkileri araştırılabilir.

ManeNPV'nin, hücre kültürleri kullanılan böceklerde *in vivo* özelliklerinin neler olduğu araştırılabilir.

ManeNPV DNA'sı ekspresyon vektörü haline dönüştürülerek, yabancı genlerin ekspresyonlarının yapılacağı yeni bir vektör geliştirilebilir.

Tn5 ve LdElta hücre kültürlerinde verimin düşük olmasına neden olan viral faktörler araştırılabilir.

Bm-5, Se-1 ve Cf-124T hücrelerinde enfeksiyon olmamasına neden olan konak faktörlerin neler olduğu ve diğer hücre kültürleri apoptozise girmezken Sf21 hücrelerinin neden apoptozise girdiği araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Adams, J.R. ve McClintock, J.T., 1991. Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses, prt 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects, 89-180. In JR Adams, JR Bonami (eds), Atlas of Invertebrate Viruses, Florida, CRC Press, 694.
- Ahrens, C.H., Russell, R.L.Q., Funk, C.J., Evans, J.T., Harwood, S.H. ve Rohrmann, G.F., 1997. The Sequence of the *Orgyia pseudotsugata* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus Genome, Virology, 229, 381-399.
- Al Fazairy, A.A. ve Hassan, F.A., 1988. Infection of Termites by *Spodoptera littoralis* Nuclear Polyhedrosis Virus, Insect Sci. Appl., 9, 37.
- Arif, M.B., 1986. The Structure of the Viral Genome. The Molecular Biology of Baculoviruses, Curr. Top. Microbio. Immuno., 131, 21-29.
- Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. ve Possee, R.D., 1994. The Complete Sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, Virology, 202, 586-605.
- Beljelarskaya, S.N., 2002. A Baculovirus Expression System for Insect Cells, Mol. Biol., 36, 281-292.
- Bilimoria, S.L., 1986. Taxonomy and Identification of Baculovirus. In: Granados, R.D. and Federici, B.A. eds, The Biology of Baculoviruses, 37. CRC Pres, Boca Raton, FL.
- Bilimoria, S.L., 1991. The Biology of Nuclear Polyhedrosis Viruses. In: Edouard, K., ed., Viruses of Invertebrates. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Bilimoria, S.L., Demirbağ, Z. ve Ng, H., 1993. Host-specific Transcription of Baculovirus Genes, SASS Bull. Biochem. Biotech., 6, 1-7.
- Bischoff, D.S. ve Slavicek, J.M., 1997. Molecular Analysis of an *enhancin* Gene in the *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Virol., 71, 8133-8140.
- Blissard, G.W., 1996. Baculovirus-insect Cell Interactions. In: Vlak, J.M., De Gooijer, C.D., Tramper, J. and Miltenburger, H.G., eds., Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects, 73-93. Kluwer Academic Publishers, P.O. Box 17,3300, AA Dordrecht, The Netherlands.
- Blissard, G.W. ve Rohrmann, G.F., 1990. Baculovirus Diversity and Molecular Biology, Ann. Rev. Entomol., 35, 155-172.
- Boyce, F. ve Bucher, N., 1996. Baculovirus-mediated Gene Transfer into Mammalian Cells, Proc. Natnl. Acad. Sci. USA, 93, 2348-2352.

- Bradford, M.B., Blissard, G.W. ve Rohrmann, G.F., 1990. Characterization of the Infection Cycle of the *Orgyia pseudotsugata* Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus in *Lymantria dispar* cells, J. Gen. Virol., 71, 2841-2846.
- Brown, M. ve Faulkner, P., 1975. Factors Affecting the Yield Virus in a Cloned Cell Line of *Trichoplusia ni* Infected with a Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Invertebr. Pathol., 26, 251-257.
- Brusca, J., Summers, M., Couch, J. ve Courtney, L., 1986. *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Efficiently Enters But Does Not Replicate in Poikilothermic Vertebrate Cells, Intervirology, 26, 207.
- Bud, H.M. ve Kelly, D.C., 1984. The DNA Contained by Nuclear Polyhedrosis Viruses Isolated from *Spodoptera spp.*, (Lepidoptera, Noctuidae): Genome Size and Configuration Assessed by Eletron microscopy, J. Gen. Virol., 37, 135-143.
- Castro, M.E.B., Souza, M.L., Arauja, S. ve Bilimoria, S.L., 1997. Replication of *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrosis Virus Four Lepidopteran Cell Lines, J. Invertebr. Pathol., 69, 40-45.
- Cha, S.C., Park, S.A., Chang, J.H., Park, K.J., Kim, S.H. ve Lee, H.H., 1995. Cloning of p10 Gene of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus and its Expression in *Escherichia coli*, J. Korean Soc. Virol., 25, 9-22.
- Charlton, C.A. ve Volkman, L.E., 1991. Sequential Rearrangement and Nuclear Polymerization of Actin in Baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* Cells, J. Virol., 65, 1219-1227.
- Charlton, C.A. ve Volkman, L.E., 1993. Penetration of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Nucleocapsids into IPLB Sf21 Cells Induces Actin Cable Formation, Virology, 197, 245-254.
- Choe, Y.K., Byun, S.M., Lee, H.H., Chung, T.W., Park, H.Y. ve Kang S.K., 1986. A Nuclear Polyhedrosis Virus of *Hyphantria cunea* Replicates *In Vitro*, Biotechnol Lett., 8, 853-858.
- Demir, İ., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., Kılıç, A.O. ve Beldüz, A.O., 2000. Expression of *cryIVA* and *cryIVD* Genes of *Bacillus thuringiensis* in Baculovirus Expression System, Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC wprs Bull., 23, 267-274.
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kültürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması, Doktora tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
- Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2006. A Productive Replication of *Hyphantria cunea* Nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* Cell Line, J. Microbial. Biotechnol., 16, 10, 1485-1490.

- Demirbağ, Z., 1993. Comparative Replication of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus in Abortive and Productive Infections of Insect Cell Lines, PhD Thesis, Texas Tech University, Texas, USA.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A.O., 1997. Baculovirus'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, KÜKEM Dergisi, 20, 49-58.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A.O., Ertürk, Ö. ve Demir, İ., 1997. *Autographa californica* Nuklear Polihedrozis Virüsün Böcek Hücre Kültüründe Karşılaştırmalı Replikasyonu, Turk J. of Biology, 21, 63-70.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A.O. ve Demir, İ., 1998. Baculovirus'ün Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması, Turk. J. Biol., 22, 249-262.
- De Moreas, R.R. ve Maruniak, J.E., 1997. Detection and Identification of Multiple Baculovirus Using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Endonuclease Analysis, J. Virol. Methods, 63, 209-217.
- Doyle, J.D., Hirst, M.L., Cory, J.S. ve Entwistle, P.F., 1990. Risk Assessment Studies: Detailed Host Range Testing of Wild-type Cabbage Moth *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) Nuclear Polyhedrosis Virus, Appl. Environ. Entomol., 56, 2704.
- Erlandson, M.A. ve Carstens, E.B., 1983. Mapping Early Transcription Products of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, Virology, 126, 398-402.
- Erlandson, M.A., Baldwin D., Haveron M. ve Keddie B.A., 2006. Isolation and Characterization of Plaque-Purified Strains of *Malacosoma disstria* Nucleopolyhedrovirus, Can. J. Microbial, 52, 266-271.
- Federici, B.A. ve Hice, R.H., 1997. Organization and Molecular Characterization of Genes on the Polyhedrin Region of the *Anagrapha falcifera* Multinucleocapsid NVP, Arch. Virol., 142, 333-348.
- Fraser, M.J., 1986. Ultrastructural Observations of Virion Maturation in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infected *Spodoptera frugiperda* Cell Cultures, J. Ultra. Mol. Struc. Res., 95, 189-195.
- Friesen, P.D. ve Miller, L.K., 1986. The Regulation of Baculovirus Gene Expression. In: Doerfler, W. and Böhm, P., eds., Current Topics in Microbiology and Immunology, 131, 31-49. Springer-Verlag, Berlin.
- Fuchs, L.Y., Woods, M.S. ve Weaver, R.F., 1983. Viral Transcription During *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infection: A Novel RNA Polymerase Induced in Infected *Spodoptera frugiperda* Cells, J. Virol., 48, 641-646.
- Ghosh, S., Parvez, M.K., Banerjee, K., Sarin, S.K. ve Hasnain, S.E., 2002. Baculovirus as Mammalian Cell Expression Vector for Gene Therapy: An Emerging Strategy, Molec. Ther., 6, 5-11.

- Glocker, B., Hoopes, R.R., Hodges, L. ve Rohrmann, G.F., 1993. *In Vitro* Transcription from Baculoviruses Late Gene Promoters: Accurate mRNA Initiation by Nuclear Extracts Prepared from *Spodoptera frugiperda* Cells, J. Virol., 67, 3771-3776.
- Gombart, A.F., Pearson, M.N., Rohrmann, G.F. ve Beaudreau, G.S., 1989. A Baculovirus Polyhedral Envelope-associated Protein: Genetic Location, Nucleotide Sequence, and Immunocytochemical Characterization, Virology, 169, 182-193.
- Gomi, S., Majima, K. ve Maeda, S., 1999. Sequence Analysis of the *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol., 80, 1323-1337.
- Granados, R.R., 1978. Early Events in the Infection of *Heliothis zea* Midgut Cells by A Baculovirus, Virology, 90, 170-174.
- Granados, R.R. ve Hashimoto, Y., 1989. Infectivity of Baculoviruses to Cultured Cells. In: Mitsuhashi, J., ed., Invertebrate Cell System Applications II, 3-13. CRC Pres, Inc., Baco Raton, FL.
- Granados, R.R. ve Williams, K.A., 1986. *In Vivo* Infection and Replication of Baculoviruses. In: Granados, R.R. and Federici, B.A., eds., The Biology of Baculoviruses, 89-108. CRC Pres, Inc., Baco Raton, FL.
- Gröner, A., 1986. Specificity and Safety of Baculovirus. In: Granados, R.R. and Federici, B.A., eds., The Biology of Baculoviruses, 177. CRC Pres, Inc., Boca Raton, FL.
- Gröner, A., Granados, R.R. ve Burand, J.P., 1984. Interaction of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus with 2 Nonpermissive Cell Lines, Intervirology, 21, 203.
- Gruha, M.A., Buller, P.L. ve Weaver, R.F., 1981. Alpha-Amanitin Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells, J. Virol., 38, 916-921.
- Guarino, L.A. ve Summers, M.D., 1986. Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polihedrosis Virus Enhancer Delayed-early Gene Expression, J. Virol., 60, 215-223.
- Harrap, K.A., 1972. The Structure of Nuclear Polyhedrosis Viruses. III. Virus Assembly, Virology, 50, 133-139.
- Hayakawa, T., Rohrmann, G.F. ve Hashimoto, Y., 2000. Patterns of Genome Organization and Content in Lepidopteran Baculovirus, Virology, 278, 1-12.
- Herniou, E.A., Luque, T., Chen, X., Vlak, J.M., Winstanley, D., Cory, J.S. ve O'Reilly, D.R., 2001. Use of Whole Genome Sequence Data to Infer Baculovirus Phylogeny, J. Virol., 75, 8117-8126.

- Himeno, H., Sakai, F., Onodera, K., Nakni, H., Fukada, T. ve Kawade, Y., 1967. Formation of Nuclear Polyhedral Bodies and Nuclear Polyhedrosis Virus of Silk Worm in Mammalian Cells Infected with Viral DNA, Virology, 33, 507.
- Hink, W.F., 1970. Established Insect Cell Line from the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*, Nature, 226, 466-467.
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. ve Strauss, M., 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors, Proc. Natnl. Acad. Sci. USA, 92, 10099-10103.
- Hooft van Iddekinge, B., Smith, G.E. ve Summers, M.D., 1983. Nucleotide Sequence of the Polyhedrin Gene of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, Virology, 131, 561-565.
- Hostetter, D.L. ve Puttler, 1991. A New Broad Host Spectrum Nuclear Polyhedrosis Virus Isolated from a Celery Looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby) (Lepidoptera: Noctuidae), Environ. Entomol., 20, 1481-1488.
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H. ve Crook, N.E., 1998. Insect Viruses and Pest Management, John Wiley and Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England.
- Hyink, O., Graves, S., Fairbairn, F.M. ve Ward, V.K., 1998. Mapping and Polyhedrin Gene Analysis of the *Epiphyas postvittana* Nucleopolyhedrovirus Genome, J. Gen. Virol., 79, 2853-2862.
- Inceoglu, A.B., Kamita, S.G., Hinton, A.C., Huang, Q., Severson, T.F., Kang, K. ve Hammock, B.D., 2001. Recombinant Baculoviruses for Insect Control, Pest. Manag. Sci., 57, 981-987.
- Invitrogen, 1996. MaxBac 2.0 Transfection and Expression Manual. A Manual of Methods for Baculovirus Expression, 35-36, Invitrogen Corporation 3985 B Sorrento Valley Blvd, San Diego, USA.
- Ishikawa, H., Ikeda, M., Yanagimoto, C.A., Alves, F., Katau, Y., Lavina, B.A. ve Kobayashi, M., 2003. Induction of Apoptosis in an Insect Cell Line, IPLB-Ld652Y, Infected with Nucleopolyhedroviruses, J. Gen. Virol., 84, 3, 705.
- Jankevras, J., Cudera, Z. ve Oers, V., 1998. New Isolate of Malacosoma neustria Nuclearpolyhedrosis virus In Latvia, J. Invertebr. Pathol., 71, 283-285.
- Jaques, R.P., 1985. Stability of Insect Viruses in the Environment. In: Maramorosch, K. and Sherman, K.E., eds., *Viral Insecticides for Biological Control*, 285-360, Academic Pres, Inc., New York.
- Jarvis, D.L., Bohlmeier, D.A. ve Garcia, J.A., 1991. Requirements for Nuclear Localization and Supramolecular Assembly of a Baculovirus Polyhedrin Protein, Virology, 185, 795-810.

- Katsuma, S., Deng, D.X.T., Zhou, C.L.E., Iwanaga, M., Noguchi, Y., Kobayashi, M. ve Maeda, S., 2000. Identification of Novel Residues Involved in Nuclear Localization of a Baculovirus Polyhedrin Protein, Virus Genes, 21, 233-240.
- Keddie, B.A., Apointe, G.W. ve Volkman, L.E., 1989. The Pathway of Infection of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus in an Insect Host, Sciences, 242, 1728-1730.
- Keddie, B.A., Erlandson, M.A. ve Hilchie, G.J., 1995. Establishment and Characterization of Three *Malacosoma disstria* Cell Lines, J. Invertebr. Pathol., 66, 136-132.
- Kelly, D.C., 1982. Baculovirus Replication, J. Gen. Virol., 63, 1-13.
- Kikhno, I.M. ve Stokovskaya, L.I., 1997. Physical Mapping of *Malacosoma neustria* Nucleopolyhedrosis Genome, Biopolimery Kletka, 13, 3, 218-221.
- King, L.A. ve Possee, R.D., 1992. The Baculovirus Expression System, A Laboratory Guide, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK.
- Knudson, D.L. ve Harrap, K.A., 1976. Replication of a Nuclear Polyhedrosis Virus in a Continuous Cell Culture of *Spodoptera frugiperda*: Microscopy Study of the Sequence of Events of the Virus Infection, J. Virol., 17, 254-268.
- Kool, M., Voeten, J.T.M., Goldbach R.W., Trampers, J. ve Vlak, J.M., 1993. J. Gen. Virol., 74, 12, 2661-2668.
- Kool, M., Voeten, J.T.M., Goldbach, R.W. ve Vlak, J.M., 1994a. Functional Mapping of Regions of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome Required for DNA Replication. Virology, 198, 680-689.
- Kool, M., Ahrens, C.H., Goldbach, R.W., Rohrmann, G.F. ve Vlak, J.M., 1994b. Identification of Genes Involved in DNA Replication of the *Autographa californica* Baculovirus, Proce. Nati. Acade. Sci., USA, 91, 11212-11216.
- Kost, T.A. ve Condreay, J.P., 2002. Recombinant Baculoviruses as Mammalian Cell Gene-delivery Vectors, Trends Biotechnol., 20, 173-180.
- Kovacs, G.R., Guarino, L.A. ve Summers, M.D., 1991. Novel Regulatory Properties of the IE-1 and IE-0 *trans* Activators Encoded by the Baculovirus Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Virol., 65, 5281-5288.
- Krappa, R. ve Knebel-Morsdorf, D., 1991. Identification of the Very Early Transcribed Baculovirus Gene PE-38, J. Virol., 65, 805-812.
- Kuzio, J., Pearson, M.N., Harwood, S.H., Funk, C.J., Evans, J.T., Slavicek, J.M. ve Rohrmann, G.F., 1999. Sequence and Analysis of the Genome of a Baculovirus Pathogenic for *Lymantria dispar*, Virology, 253, 17-34.

- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. ve Vail, P., 2001. Insects Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control, 21, 230-248.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lavina, B.A., Padua, P.E., Wu, F.C., Shirata, N., Ikeda, M. ve Kobayashi, M., 2000. Biological Characterization of A Nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) Isolated from the Philippines, Biol. Control, 20, 39-47.
- Lee, H.H., 1987. Replication and Cloning of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus in *Spodoptera frugiperda* Cell Line, HG. J. Gen. Eng., 2, 3-7.
- Lee, K.K. ve Lee, H.H., 1991. The Genome and Viral Protein Analyses of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis VirusHL-2, Mol.Cells, 1, 241-244.
- Liu, H.S. ve Bilimoria, S.L., 1990. Infected Cell Specific Protein and Viral DNA Synthesis in Productive and Abortive Infections of *Spodoptera frugiperda* Nuclear Polyhedrosis Virus, Arch. Virol., 115, 101-113.
- Long, G., 2007. Structure-Function Relationship of the Baculovirus Envelope Fusion Protein F. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.
- Lu, A. ve Carstens, E.B., 1992. Transcription Analysis of the EcoRI-D Region of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Identifies an Early 4-kilobase RNA Encoding the Essential *p143* Gene, J. Virol., 66, 655-663.
- Lu, A. ve Miller, 1995. Differential Requirements for Baculovirus Late Expression Genes in Two Cell Lines, J. Virol., 69, 6265-6272.
- Lu, A. ve Miller, L.K., 1997. Regulation of Baculovirus Late and Very Late Gene Expression. *The Baculoviruses*, Plenum Press, New York, 193-216.
- Luckow, V.A., 1991. Cloning and Expression of Heterolous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors. In: Prokop, A., Bajpai, R.K. and Ho, C.S., eds., *Recombinant DNA Technology and Applications*, 97-152, McGraw-Hill, Inc., New York.
- Luckow, V.A. ve Summers, M.D., 1988. Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors, Bio.Tech., 6, 47-55.
- Lynn, D.E., 1999. Comparison of Cell Line Maintenance Procedures on Insect Cells Used for Producing Baculoviruses, In Vitro Cell. Dev. Biol., 35, 248-251.
- Lynn, D.E., 2003a. Comparative Susceptibilities of Twelve Cell Lines to Infection by Three Baculoviruses, J. Invertebr. Pathol., 82, 129-131.

- Lynn, D.E., 2003b. Comparative Susceptibilities of Insect Cell Lines to Infection by the Occlusion-body Derived Phenotype of Baculoviruses, J. Invertebr. Pathol., 83, 215-222.
- Lynn, D.E., Dougherty, E.M., McClintock, J.T. ve Loeb, M., 1988. Development of Cell Lines from Various Tissues of Lepidoptera. In: Kuroda, Y., Kurstack, E. and Maramorosch, K., eds., Invertebrate and Fish Tissues Culture, pp 239. Japan Scientific Society Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.
- Maeda, S., 1989. Increased Insecticidal Effect by a Recombinant Baculovirus Carrying a Synthetic Diuretic Hormone Gene, Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 1177-1183.
- Maruniak, J.E. ve Summers, M.D., 1981. *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Phosphoproteins and Synthesis of Intracellular Proteins After Virus Infection, Virology, 109, 25-34.
- McClintock, J.T., Dougherty, E.M. ve Wiener, R.M., 1986. Semipermissive Replication of a Nuclear Polyhedrosis Virus of *Autographa californica* in a Gypsy Moth Cell Line, J. Virol., 57, 197-204.
- McCutchen, B.F., Choudary, P.V., Crenshaw, R., Maddox, D., Kamita, N., Palekar, N., Volrath, S., Fowler, E., Hammock, B.D. ve Maeda, S., 1991. Development of Recombinant Baculovirus Expressing an Insect-Selective Neurotoxin: Potential for Pest Control, Bio.Technol., 9, 848-852.
- McIntosh, A.H., Barcenas, N.M. ve Cate, J.R., 1992. Replication of *Autographa californica* Baculovirus (AcMNPV) in a Coleopteran Cell Line, In Vitro Cell. Dev. Biol., 28, 557-559.
- McIntosh, A.H., Christion, P.D. ve Grasela, J.J., 1999. The Establishment of *Heliothine* Cell Lines and Their Susceptibility to Two Baculoviruses, In Vitro Cell. Dev. Biol., 35, 94-97.
- McIntosh, A.H. ve Grasela, J.J., 1994. Specificity of Baculoviruses. In: Insect Cell Biotechnology. Maramorosch, K. ve McIntosh, A.H., eds, 57-69, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- McIntosh, A.H., Ignoffo, C.M. ve Andrews, P.L., 1985. *In Vitro* Host Range of Five Baculoviruses in Lepidopteran Cell Line, Intervirology, 23, 150-156.
- McIntosh, A.H. ve Shamy, R., 1980. Biological Studies of a Baculovirus in a Mammalian Cell Line, Intervirology, 13, 331.
- McLachlin, J.R. ve Miller, L.K., 1994. Identification and Characterization of *vlf-1*, a Baculovirus Gene Involved in Very Late Gene Expression, J. Virol., 68, 7746-7756.
- Mikhailov, V.S., 2003. Replication of the Baculoviruses Genome, Mol. Biol., 37, 250-259.

- Miller, L.K., 1988. Baculoviruses as Gene Expression Vectors, Ann. Rev. Microbiol., 42, 177-199.
- Miller, L.K., 1989. Insect Baculoviruses-powerful Gene Expression Vectors, Bioassays, 11, 91-95.
- Miller, L.K., Adang, M.J. ve Browne, D., 1983. Protein Kinase Activity Associated with the Extracellular and Occluded Forms of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Virol., 46, 275-278.
- Mitsuhashi, J., 1996. A Continuously Growing Cell Line from Larval Hemocytes of *Malacosoma neustria testacea*, Jpn. J. Ent., 64, 3, 692-699.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the Application of Baculoviruses for Control of Lepidoptera, Annu. Rev. Entomol., 44, 257-289.
- Nalçacıoğlu, R., Demir, İ., Demirbağ, Z. ve Kılıç, A.O., 2001. Expression of the *fusolin* Gene of *Choristoneura fumiferana* Entomopoxvirus in the Baculovirus Insect Cell System, Biologia, Bratislava, 56, 637-642.
- Ooi, B.G., Rankin, C. ve Miller, L.K., 1989. Downstream Sequences Augment Transcription from the Essential Initiation Site of a Baculovirus Polyhedrin Gene, J. Mol. Biol., 210, 721-736.
- O'Reilly, D.R. ve Miller, L.K., 1991. Improvement of a Baculovirus Pesticide by Deletion of the *egt* Gene, Bio.Technol., 9, 1086-1089.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. ve Luckow, V.A., 1992. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. New York, Freeman, W.H. and Company, 12.
- Orlovskaya, E.V., 1998. The Theoretical Basis for Using Baculoviruses to Control Forest Pests. In: McManus, M.L. and Liebhold, A.M., eds., Proceeding: Population Dynamics, Impacts and Integrated Management of Forest Defoliating Insects, 206-212. USDA Forest Service General Technical Report NE-247.
- Park, J.O., Chang, K.H., Lee, H.H. ve Chung, I.S., 1999. Biochemical Analysis of *Hyphantria cunea* NPV Attachment to *Spodoptera frugiperda* 21 Cells, Cytotechnology, 31, 157-161.
- Pullen, S.S. ve Friesen, P.D., 1995. Early Transcription of the *ie-1* Transregulator Gene of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus is Regulated by DNA Sequences Within its 5' Noncoding Leader Region, J. Virol., 69, 156-165.
- Rankin, C., Ooi, B.G. ve Miller, L.K., 1988. Eight Base Pairs Encompassing the Transcriptional Start Point Are the Major Determinant for Baculovirus Gene Expression, Gene, 70, 39-49.

- Rapp, J.T., Miltenberger, R.G., Long, E.S., Elliott, A.J. ve Lumley, V.A., 1998. Simplified Habit Reversal Treatment for Chronic Hair Pulling in Three Adolescents, J. Appl. Behav. Anal., 31, 2, 299-302.
- Reed, L. ve Muench, H., 1938. A Simple Method for Estimating Fifty Percent End Points, Am. J. Hyg., 27, 493-497.
- Rice, W.C. ve Miller, L.K., 1986. Baculovirus Transcription in the Presence of Inhibitors and in Nonpermissive *Drosophila* cells, Virus Res., 6, 155.
- Riegel, C.I. ve Slavicek, J.M., 1997. Characterization of the Replication Cycle of the *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis Virus, Virus Res., 51, 9-17.
- Riegel, C.I. ve Slavicek, J.M., 1997. Characterization of the Replication Cycle of the *Lymantria dispar* Nuclearpolyhedrosis Virus, Virus Res., 51, 9-17.
- Rivkin, H., Mor, M. ve Chejanosky N., 1998. Isolation, Replication and Polyhedrin Gene Sequence of An Israeli *Helicoverpa armigera* Single Nucleopolyhedrovirus, Kluwer Academic Publishers, virus Genes, 17, 1, 11-19.
- Rohrmann, G.F., 1986. The Polyhedrin Structure, J. Gen. Virol., 73, 749-761.
- Rohrmann, G.F., 1992. Baculovirus Structural Proteins, J. Gen. Virol., 73, 749-761.
- Sadler, T.J., Glare, T.R., Ward, V.K. ve Kalmakoff, J., 2000. Physical and Genetic Map of the *Wiseana* Nucleopolyhedrovirus Genome, J. Gen. Virol., 81, 1127-1133.
- Shirata, N., Ikeda, M., Kamiya, K., Kawamura, S., Kunimi, Y. ve Kobayashi, M., 1999. Replication of Nucleopolyhedrosisviruses of *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae), *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Four Lepidopteran Cell Lines, Appl. Entomol. Zool., 34, 4, 507-516.
- Slack, J.M., Kuzio, J. ve Faulkner, P., 1995. Characterization of v-cath, a Cathepsin L-like Proteinase Expressed by the Baculovirus AcNPV, J. Gen. Virol., 76, 1091-1098.
- Slack, J. ve Basil, M.A., 2007. The Baculovirus Occlusion Derived Virus, Virion Structure and Function, Adv. Virus Res., 69, 99-165.
- Stewart, L.M.D., Hirst, M., Ferber, M.L., Merryweather, A.T., Cayley, P.J. ve Possee, R.D., 1991. Construction of an Improved Baculovirus Insecticide Containing an Insect-Specific Toxin Gene, Nature, 352, 85-88.
- Summers, D.M., 1971. Electron Microscopic Observations of Granulosis Virus Entry, Uncoating and Replication Processes During Infection of the Midgut Cells of *Trichoplusia ni*, J. Ultrastr. Research., 35, 606-625.

- Summers, D.M. ve Smith, G.E., 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Tex. Agri. Exp. Sta. Bull. no. 1555.
- Summers, D.M., 2006. Milestones Leading to The Genetic Engineering of Baculoviruses as Expression Vector System and Pesticides, Adv. Virus. Res., 68, 3-73.
- Szewczyk, B., Carvajal, L.H., Paluszek, M., Skrzecz, I. ve Souza, M.L., 2006. Baculoviruses Re-emerging Biopesticides, Bio. Adv., 24, 143-160.
- Theilman, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J.A., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S. ve Vlak, J.M., 2005. Baculoviridae, Academi Press, San Diago, 177-185.
- Tjia, S.T., Meyer zu Altenhildesche, G. ve Doerfler, W., 1983. *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) DNA Does Not Persist in Mass Cultures of Mammalian Cells, Virology, 125, 107.
- Todd, J.W., Passarelli, A.L. ve Miller, L.K., 1995. Eighteen Baculoviruses Genes, Including *lef-11*, *p35*, *39K* and *p47*, Support Late Gene Expression, J. Virol., 69, 986-974.
- Tomalski, M.D ve Miller, K.M., 1991. Insect Paralysis by Baculovirus Mediated Expression of a Mite Neurotoxin Gene, Nature, 352, 85-88.
- Tomalski, M.D., Wu, J. ve Miller, L.K., 1988. The Location, Sequence, Transcription and Regulation of a Baculovirus DNA Polymerase Gene, Virology, 167, 591-600.
- Trudeau, D., Washburn, J.O. ve Volkman, L.E., 2001. Central Role of Hemocytes in *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zae*, J. Virol., 75, 996-1003.
- URL-1. <http://www.nerc-oxford.ac.uk/chexford/groups/baculovirus/genomes.htm>, Baculovirus Genome Sequences, 11.04.2003.
- URL-2. <http://www.iisc.ernet.in/currsci/nov251998/articles18.htm>, Baculoviruses as Biopesticides, 25.11.1998.
- Van Oers, M.M., Flipsen, J.T.M, Reusken, C.B.E.M., Sliwinsky, E.L., Goldbach, R.W. ve Vlak, J.M., 1993. Functional Domains of the p10 Protein of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Gen. Virol., 74, 563-574.
- Van Oers, M.M., Flipsen, J.T.M., Reusken, C.B.E. ve Vlak, J.M., 1994. Specificity of Baculovirus p10 Functions, Virology, 200, 513-523.
- Van Oers, M.M. ve Vlak, J.M., 2007. Baculovirus Genomics, Current Drug Targets, 8, 1051-1068.

- Vaughn, J.L. ve Dougherty, E.M., 1985. The Replication of Baculoviruses. In: Maramorosch, K. and Sherman, K.E., eds., *Viral Insecticides for Biological Control*, pp. 569-633, Academic Pres, New York.
- Vaughn, J.L., Goodman, R.M., Tomkins, G.T. ve McCawley, P., 1977. The Establishment of Two Cell Lines from the Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctiudae), *In Vitro*, 13, 213-217.
- Vlak, J.M. ve Keus, F.J.A., 1990. Baculovirus Expression Vector System for Production of Viral Vaccines. In: Mizrahi, A., ed., *Viral Vaccines, Advances in Biotechnological Processes*, 91-128. New York, Wiley-Liss, 14.
- Volkman, L.E., 1995. Baculovirus Bounty, *Science*, 269, 1834.
- Volkman, L.E., 1997. Nucleopolyhedrovirus Interactions with their Insect Hosts, *Adv. Virus Res.*, 48, 313-348.
- Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friesen, P., Keddie, B.A., Possee, R. ve Theilmann, D.A., 1995. Baculoviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D., eds., *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 104-111. Springer-Verlag, New York.
- Volkman, L.E. ve Keddie, B.A., 1990. Nuclear Polyhedrosis Virus Pathogenesis. *Seminers in Virology*, UC Berkeley, 1, 249-256.
- Volkman, L.E. ve Knudson, D.L., 1986. *In Vitro* Replication of Baculoviruses. In: Granados, R.R. and Federici, B.A., eds., *The Biology of Baculoviruses*, pp 109-127. CRC Pres, Inc, Boca Raton.
- Wang, X. ve Kelly, D.C., 1983. Baculovirus Replication: Purification and Identification of the *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus-induced DNA Polymerase, *J. Gen. Virol.*, 64, 2229-2336.
- Whitt, M.A. ve Manning, J.S., 1988. A Phosphorylated 34-kDa Protein and a Subpopulation of Polyhedrin Are Thiol Linked to the Carbohydrate Layer Surrounding a Baculovirus Occlusion Body, *Virology*, 163, 33-42.
- Williams, G.V. ve Faulkner, P., 1996. Replication Patterns and Cytopathology of Cells Infected with Baculoviruses. In: Vlak, J.M., De Gooijer, C.D., Tramper, J. and Miltenburger, H.G., eds., *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects*, 95-110, Kluwer Academic Publishers, P.O. Box 17,3300, AA Dordrecht, The Netherlands.
- Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J. ve Faulkner, P., 1989. A Cytopathological Investigation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus *p10* Gene Function Using Insertion-deletion Mutants, *J. Gen. Virol.*, 70, 187-202.

- Woo, S.D., 2001. Rapid Detection of Multiple Nucleopolyhedroviruses Using Polymerase Chain Reaction, Mol. Cells, 11, 334-340.
- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R., Beldüz, A.O. ve Demirbağ, Z., 2003. A Nuclear Polyhedrosis Virus of The Lackey Moth, *Malacosoma neustria* (Lepidoptera: Lasiocampidae) in Turkey, IOBC wprs Bulletin, 26, 1, 233-236.
- Yin, J., Li, G., Ren, X. ve Herrler, G., 2007. Select What You Need: A Comparative Evaluation of The Advantages and Limitations of Frequently Used Expression System for Foreign Genes, J. Biotech., 127, 335-347.
- Young, J.C., Mackinnon, E.A. ve Faulkner, P., 1993. The Architecture of the Virogenic Stroma in Isolated Nuclei of *Spodoptera frugiperda* Cells *In Vitro* Infected by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Struc. Biol., 110, 141-153.
- Zanotto, P.M., Kessing, B.D. ve Maruniak, J.E., 1993. Phylogenetic Interrelationships Among Baculoviruses: Evolutionary Rates and Host Associations, J. Invertebr. Pathol., 62, 147-164.
- Zuidema, D., Van Oers, M.M., Van Strien, E.A., Caballero, P.C., Klok, E.J., Goldbach, R.W. ve Vlak, J.M., 1993. Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis of the *p10* Gene of *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis, J. Gen. Virol., 74, 1017-1024.

ÖZGEÇMİŞ

15.09.1982 tarihinde Giresun'da doğdu. İlköğrenimini Giresun Merkez 23 Nisan İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra, ortaokulu Giresun Kız Meslek Lisesi ve liseyi de Giresun Atatürk Sağlık Meslek Lisesi'nde birincilikle (Anestezi teknisyeni) tamamladı. 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2004 yılında aynı bölümden mezun oldu ve biyolog unvanı aldı. 2004 yılında (mezun olduğu yıl) Anestezi Teknisyeni olarak Trabzon Vakıfkebir Devlet Hastanesi'ne atandı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine de başladı. Halen “Anestezi Teknisyeni” olarak aynı hastanede görev yapmaya devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.