

155867

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HYPHANTRIA CUNEA NÜKLEOPOLİHEDROVİRÜS'ÜNÜN

SPODOPTERA FRUGIPERDA VE *LYMANTRIA DISPAR*

HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE REPLİKASYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

İsmail DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
"Doktor"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26.04.2004
Tezin Savunma Tarihi : 14.05.2004

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2004

ÖNSÖZ

“*Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs’ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kültürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konunun seçiminde gerekse çalışmaların planlanıp yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin geliştirilip, planlanmasında yardımcı olan tez izleme jüri üyelerim Sayın Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA’ya ve tez süresince bana her konuda destek olan aileme minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmalarımın yürütülmesi esnasında desteklerini esirgemeyen başta Mikrobiyoloji Laboratuvarı Araştırma Görevlileri olmak üzere, Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Ayrıca, tez çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan (2002.111.4.6) Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonuna da teşekkür ediyorum.

İsmail DEMİR
TRABZON 2004

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Baculovirus'ler	2
1.2.1. Baculovirus'lerin Yapı ve Sistematiği	2
1.2.2. Baculovirus'lerin Virionları	5
1.2.3. Baculovirus DNA'sı	6
1.2.4. Baculovirus Replikasyonuna Genel Bakış	6
1.2.4.1. Virüsün Konağa Girişi	8
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. Baculovirus'lerin Konak Seçiciliği	13
1.2.6. Baculovirus Gen Ekspresyonunun Önemi	15
1.2.7. Baculovirus'lerin Biyoteknolojideki Önemi ..	16
1.2.8. Tezin Amacı	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Hücreler, Besiyeriler ve Virüs	19
2.2. Stok Virüs Üretimi	19
2.3. Stok Virüs Konsantrasyonunun Hesaplanması	20

2.4.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs'ünün LdElta Hücrelerindeki Verimliliği.....	20
2.5.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Hücrelerde Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi	21
2.6.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Hücrelerde Üretilen Ekstrasellüler Virüslerin Büyüme Eğrisi	21
2.7.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyonu ile Belirlenmesi	22
2.7.1.	Prob Geliştirme	22
2.7.1.1	<i>Autographa californica</i> Nükleopolihedrovirüs DNA'sının İzolasyonu	22
2.7.1.2.	<i>Autographa californica</i> Nükleopolihedrovirüs DNA'sının PCR ile Çoğaltılması	22
2.7.1.3.	PCR Ürününün Elde Edilmesi ve Probenin İşaretlenmesi	23
2.7.2.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Nitroselüloz Membrana Geçirilmesi	23
2.7.3.	Hibridizasyon	24
2.8.	HcNPV-Protein Sentezinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi	25
2.9.	HcNPV- <i>polh</i> Gen Transkripsiyonunun RT-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi	26
2.9.1.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu	26
2.9.2.	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	26
2.10.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs'ünün İnsektisidal Etkisi	27
3.	BULGULAR	28
3.1.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs'ünün LdElta Hücrelerindeki Verimliliği.....	28
3.2.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Sf21 ve LdElta Hücrelerinde Meydana Gelen Sitopatik Etkiler	28
3.3.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Sf21 ve LdElta Hücrelerinde Üretilen Ekstrasellüler Virüs Miktarı ve Çoğalma Eğrisi	32
3.4.	Sf21 ve LdElta Hücrelerinde <i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonu	34
3.5.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Sf21 ve LdElta Hücrelerindeki Protein Profilleri	35
3.6.	HcNPV- <i>polh</i> Geninin Sf21 ve LdElta Hücrelerinde Transkripsiyonu	36
3.7.	<i>Hyphantria cunea</i> Nükleopolihedrovirüs'ünün İnsektisidal Etkisi	37
4.	İRDELEME	39

5.	SONUÇLAR	49
6.	ÖNERİLER	50
7.	KAYNAKLAR	51
	ÖZGEÇMİŞ	64



ÖZET

Bu çalışmada, *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs (HcNPV)'ün *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf21) ve *Lymantria dispar* (IPLB-LdElta) hücre kültürlerinde replikasyon özellikleri araştırıldı. Enfeksiyon, oluşan sitopatik etkiler (CPE), ekstrasellüler virüs üretimi ve virüs çoğalma eğrisi, polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu, viral DNA replikasyonu, viral yapısal proteinlerin sentezi ve *polh* gen transkripsiyonuyla belirlendi.

Işık mikroskopuyla tespit edilen CPE'lerin Sf21 hücrelerinde LdElta hücrelerine göre yaklaşık 12 saat önce meydana geldiği görüldü. Polihedral inklüzyon yapılar Sf21 hücrelerinde enfeksiyondan 36 saat sonra meydana gelirken, LdElta hücrelerinde ilk olarak enfeksiyondan 48 saat sonra tespit edildi. Doku kültürü enfektif doz %50 (TCID₅₀)'ye göre belirlenen ekstrasellüler virüs üretiminin Sf21 hücrelerine göre LdElta hücrelerinde yaklaşık 12 saat geç meydana geldiği belirlendi. Enfeksiyondan 72 saat sonra Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarı sırasıyla $5,6 \times 10^9$ pfu/ml ve $1,77 \times 10^9$ pfu/ml olarak hesaplandı. Viral DNA replikasyonunun her iki hücrede de enfeksiyondan 12 saat sonra başladığı Slot Blot hibridizasyonu ile tespit edildi. Viral proteinlerin sentezi poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlendi ve polihedrin proteininin her iki hücrede de enfeksiyondan 24 saat sonra ortaya çıktığı gösterildi. HcNPV-*polh* geninin hem Sf21 hem de LdElta hücrelerinde enfeksiyondan 10 saat sonra transkrip olduğu revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterildi. Hücrelerde üretilen PIB'lerin *H. cunea* ve *L. dispar* larvaları üzerinde sırasıyla %51,9 ve %65,38 insektisidal etkiye sahip olduğu biyoassay testleriyle hesaplandı.

HcNPV'nin makromoleküllerinin sentezinin Sf21 hücrelerindeki göre LdElta hücrelerinde yaklaşık 12 saat daha geç ve toplam virüs partikülleri üretiminin ise yaklaşık 3 kat az olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Baculovirus, HcNPV, Sf21, LdElta, Virüs Replikasyonu

SUMMARY

Comparative Replication of *Hyphantria cunea* Nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera frugiperda* and *Lymantria dispar* Insect Cell Lines

In this study, replicational properties of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HcNPV) were investigated in *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf21) and *Lymantria dispar* (IPLB-Elta) cell lines. Infection was determined by formation of cytopathic effects (CPE), replication of viral DNA, transcription of *polh* gene, synthesis of viral structural proteins, production of extracellular virus, and formation of polyhedral inclusion body (PIB).

It was observed that the CPEs determined by light microscopy in Sf21 cells appeared about 12 hours earlier as compared to those of LdElta cells. While polyhedral inclusion bodies formed at 36 h postinfection (p.i) in Sf21 cells, it was at 48 h p.i. in LdElta cells. Extracellular virus production determined according to cell culture infective dose 50% methods (TCID₅₀) in LdElta cells formed about 12 h later when compared with Sf21 cells. Extracellular virus amounts produced in Sf21 and LdElta cells were calculated as 5.6×10^9 pfu/ml and 1.77×10^9 pfu/ml respectively, at 72 h p.i. It was determined that viral DNA replication defined by slot blot hybridization began at 12 h p.i. in both cells. Viral protein synthesis was determined by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) and polyhedrine synthesis was observed at 12 h p.i. in both cells. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) results indicate that HcNPV-*polh* gene was transcribed at 10 h p.i. in both Sf21 and LdElta cells. Insecticidal effects of PIBs produced in cells were calculated as 51.9% and 65.38% on *H. cunea* and *L. dispar* larvae, respectively, by bioassay.

Results indicate that the synthesis of macromolecules is 12 h late and production of extracellular virus is almost 3-fold low in LdElta cells compare to Sf21 cells.

Key Words: Baculovirus, HcNPV, Sf21, LdElta, Virus Replication

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Baculovirus'lerin genel yapı ve sistematigi	3
Şekil 2. Baculovirus partiküllerinin ultrayapısal görüntüsü	4
Şekil 3. Baculovirus virion fenotiplerinin karşılaştırılması	5
Şekil 4. Baculovirus enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi	7
Şekil 5. Baculovirus replikasyonu ve gen ekspresyonu safhaları.....	16
Şekil 6. <i>H. cunea</i> NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde 0 ve 24. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler	29
Şekil 7. <i>H. cunea</i> NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde 36 ve 48. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler	31
Şekil 8. <i>H. cunea</i> NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde 72. saatte meydana gelen sitopatik etkiler	32
Şekil 9. <i>H. cunea</i> NPV'nin Sf21 ve LdElta hücrelerinde çoğalma kinetiği	34
Şekil 10. <i>H. cunea</i> NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde viral DNA replikasyonu	35
Şekil 11. <i>H. cunea</i> NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde protein sentezi	36
Şekil 12. <i>H. cunea</i> NPV- <i>polh</i> gen transkripsiyonunun Sf21 ve LdElta hücrelerinde RT-PCR reaksiyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntüleri	37
Şekil 13. Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen PIB'lerin <i>H. cunea</i> ve <i>L. dispar</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri	38
Şekil 14. Sf21 ve LdElta hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonu sonunda hücrelerde meydana gelen olaylar	48

SEMBOLLER DİZİNİ

CPE	: Sitopatik etki
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FBS	: Fetal bovin serum
GV	: Granulozis virüs
HcNPV	: <i>Hyphantria cunea</i> nükleopolihedrovirüs
IPLB-LdElta	: <i>Lymantria dispar</i> hücre kültürü
IPLB-Sf21	: <i>Spodoptera frugiperda</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	: İnküzyondan elde edilen virüs
OV	: Gömülü virüs
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PIB	: Polihedral inklüzyon yapı
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNPV	: Tek nükleokapsid nükleopolihedrovirüs
vDNA	: Viral deoksiribonükleik asit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs (HcNPV), *Baculoviridae* familyasına ait bir böcek virüsüdür. Baculovirus'ler, ziraat ve ormancılıkta büyük zararlar oluşturan böceklere karşı kullanılan alternatif ve güvenilir mücadele ajanlarıdır. Ayrıca, baculovirus'ler önemli gen ürünlerinin üretilmesinde ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılırlar. Aynı zamanda, insanlarda hastalık oluşturan DNA virüsleri için iyi bir model oluştururlar.

Baculovirus'ler, geniş bir virüs grubu olup, özellikle böceklerde bulunur (Gröner, 1986; Volkman vd., 1995). Konakları sadece omurgasızlarla sınırlı olduğundan, tek başına veya pestisidler ve diğer kimyasal ajanların kullanıldığı ekolojik zararlı mücadele programlarında, önemli böcek zararlılarının kontrolü için potansiyel olarak kullanılan faydalı ajanlardır (Moscardi, 1999; Inceoglu vd., 2001). Bu virüslerin biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmalılarının 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 baculovirus'ler, farklı ökaryotik genleri araştırmak ve biyoteknolojik uygulamalarını arttırmak için böcek hücrelerinde üretilir (Miller, 1989; Luckow, 1991; O'Reilly vd., 1992). Baculovirus'ler, 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; Ghosh vd., 2002; Kost ve Condreay, 2002). Baculovirus 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 ekspres 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, baculovirus'ler gen yapı 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. Baculovirus'ler

1.2.1. Baculovirus'lerin Yapı ve Sistematiği

Baculovirus'lerin genel yapısı incelendiğinde, öz kısmında yuvarlak, kapalı 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.

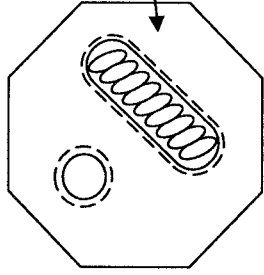
Baculovirus'ler gömülü ve gömülü olmayan virüsler olmak üzere morfolojik olarak iki grupta incelenir (Şekil 1). Gömülü virüsler, polihedrin proteininden meydana gelen bir matriks içerisine gömülüdür. Bunlar, sekizgen ve oval şeklindeki inklüzyon yapılarına göre nükleopolihedrovirüs (NPV, Altains A) ve granulozis virüs (GV, Altains B) 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. Gömülü olmayan virüsler ise herhangi bir yapının içerisine gömülmemiştir ve bunlar da Altains C'yi oluşturur (Bilimoria, 1986).

Gömülü Olmayan Virüs (NOV)

Gömülü Virüs (OV)

Nükleopolihedrovirüs (NPV)

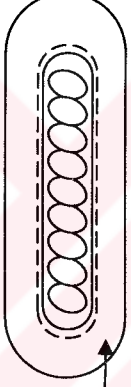
Altçins A



Tek Nükleokapsid (SNPV)

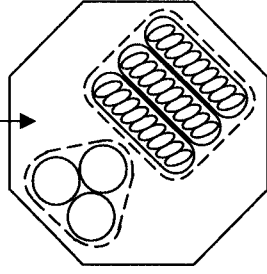
Granulozis virüs (GV)

Altçins B

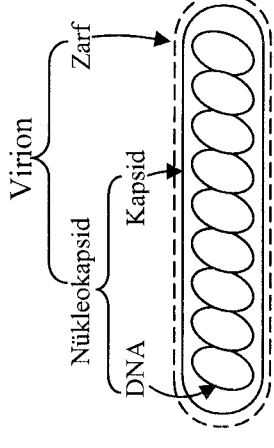


Gömülme Matrisi

Çok Nükleokapsid (MNPV)

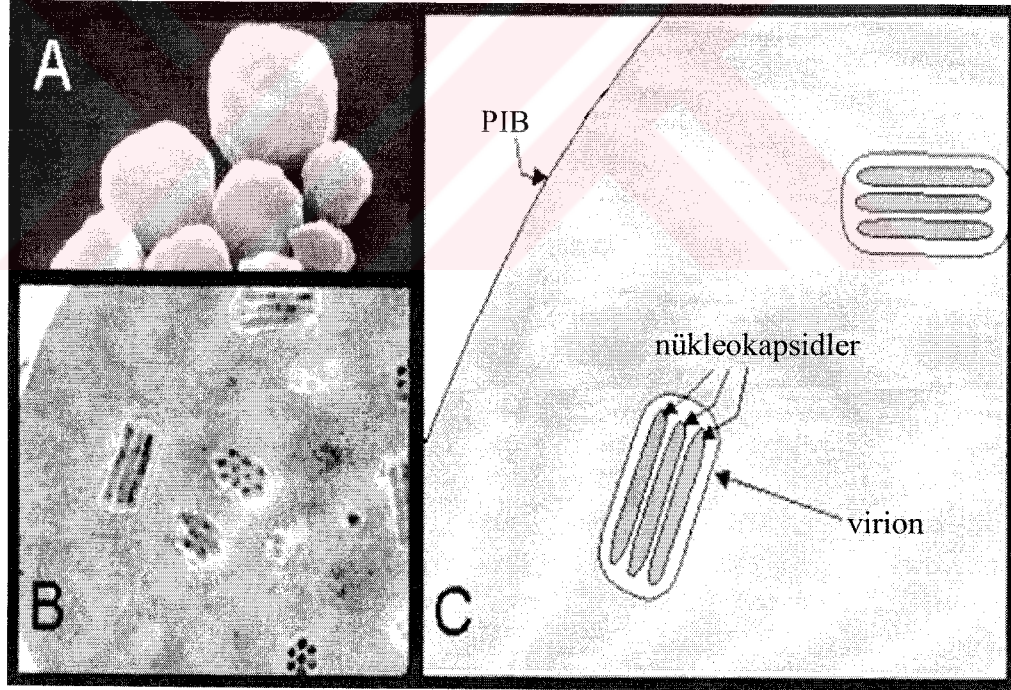


Altçins C



Şekil 1. Baculovirus'lerin genel yapı ve sistematığı. Protein matrikse gömülü olan (OV) ve gömülü olmayan (NOV) virüsler. Altçins A: polihedrin proteinine gömülü virionlar (nükleopolihedrovirüs, NPV), Altçins B: granulin proteinine gömülü virion (granulozis virüs, GV), Altçins C: gömülü olmayan virion ve aynı zamanda bir virionun kısımları

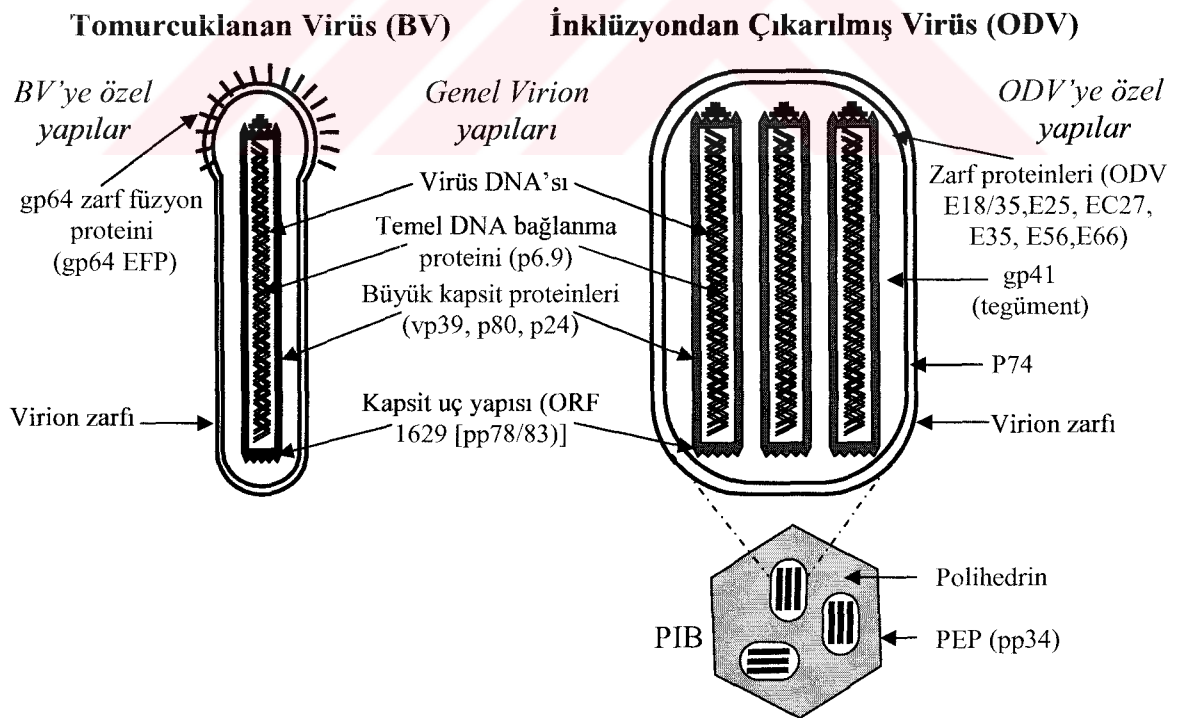
MNPV'ler, 1-18 nükleokapsidin bir zarf içerisine gömülmesinden oluşur (Şekil 1 ve 2). Sonra bu zarfa sahip virüsler (virionlar), polihedrin (28 kDa) olarak bilinen tek bir proteinden oluşmuş kristal benzeri yapılar içerisine gömülür. Hücre kültürü çalışmalarında bu virüslerden en başarılı olarak kullanılanı, çok nükleokapsidli nükleopolihedrovirüs (MNPV)'tür. 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 hücre savunma mekanizmalarına karşı direnç kazanmasını sağlar. PIB'ler aynı zamanda doğada virüs enfeksiyonlarını böcekten böceğe transfer eden, enfeksiyon özelliğine sahip yapılardır. PIB'lerin böcek hücre kültürü için enfeksiyon yapma özelliği yoktur. Baculovirus'lere ait PIB'lerin büyüklükleri 1-15 μm arasındadır. Hücre kültüründe enfeksiyon yapan virüsler ise hücrelerden zarf kazanarak salınan tomurcuklanan virüslerdir (BV).



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

1.2.2. Baculovirus'lerin Virionları

Baculoviridae familyasında, enfeksiyonun yayılmasında özel fonksiyonlara sahip olduğu bilinen iki virion fenotipi tespit edilmiştir (Şekil 3). Bunlar, hücredeki 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 matriks proteini (NPV'lerde polihedrin, GV'lerde granulin) içine gömülür. Hem BV hem de OV'lerin nükleokapsidleri nükleus içinde olduğu 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.



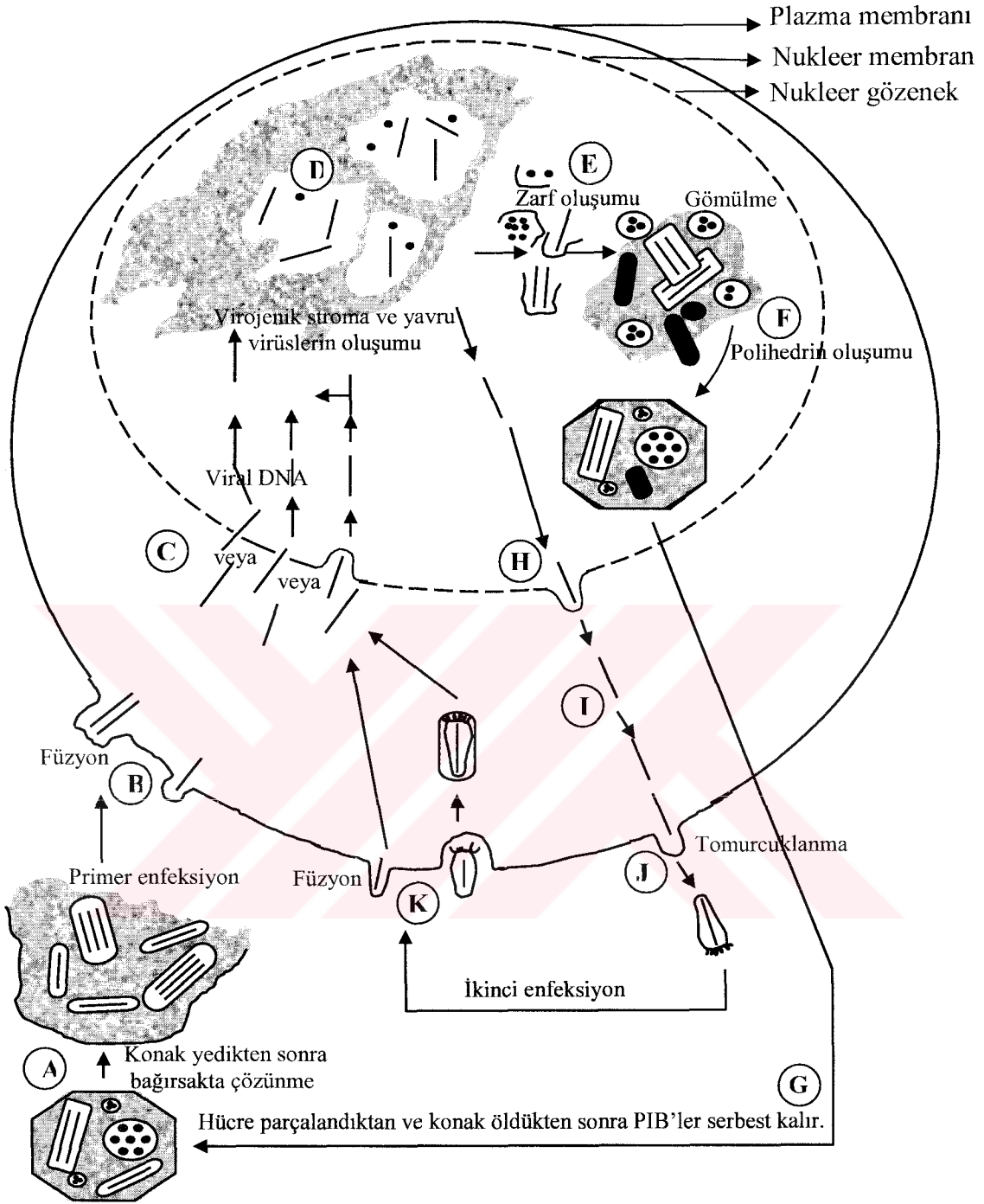
Şekil 3. Baculovirus virion fenotiplerinin karşılaştırılması. Bu şekildeki ODV, çok nükleokapsidli NPV'ye aittir. Ortada gösterilen proteinler hem BV hem de ODV için ortak olan proteinlerdir. Soldaki proteinler BV için, sağdaki proteinler ise ODV için özel proteinlerdir

1.2.3. Baculovirus DNA'sı

Baculovirus'ler, 25x250 nm büyüklükte ve 90-200 kbp kapalı, yuvarlak ve çift zincir, süpersarmal DNA ihtiva ederler (Arif, 1986; Hayakawa vd., 2000; Herniou vd., 2001). 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). 11 Kasım 2003 tarihi itibariyle, 19 baculovirus'e ait genom dizin analizleri tamamlanmıştır (URL-1). Bu dizin analizleri karşılaştırıldığında birçok baculovirus izolatının bir diğerinden küçük oranlarda farklı olduğu ve bu farkların da delesyon ve inversiyon mutantlarıyla meydana geldiği görülür. Temelde baculovirus gemonları benzer gen içeriklerine sahiptir.

1.2.4. Baculovirus 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). Bu replikasyon işlemi iki safhada meydana gelir. Birinci safhada, nukleus içerisinde, nükleokapsidler oluşur. Oluşan bu nükleokapsidler, nukleus kanallarından geçerek sitoplazmaya ulaşır. Sonra hücre zarından, reseptör aracılığıyla meydana gelen endositozis olarak bilinen, tomurcuklanma yöntemiyle zarf kazanarak hücreden ayrılır. Oluşan zarflı virüsler (Budded virüs, BV) hücre kültüründe, hücreler arasında enfeksiyon yapma özelliğine sahip, çomak şeklinde virüs formlarıdır. Silindir şeklindeki nükleokapsidler, kapsid adı verilen tüp benzeri yapı içerisinde DNA içerir ve tüpler iki ucunda *taban* ve *kapak* denilen yapıları ihtiva ederler. İkinci safhada ise nukleus içerisinde oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı *de novo* yöntemiyle zarf kazandıktan sonra, küp şeklindeki protein yapılar içerisinde gömülerek polihedral inklüzyon yapı (PIB)'ları oluştururlar (Şekil 4). Polihedrinden oluşan protein matriks ve zarf, PIB'nin genel parçalarını oluşturur.



Şekil 4. Baculovirus enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi. A: *In vivo* sistemde polihedra konak tarafından yenildikten sonra orta bağırsakta açılır ve virionlar saçılır. B: Virionlar zarfları böcek hücrelerinin plazma membranı ile füzyon yapar. C: Sitoplazmaya girdikten sonra, virionlar nukleusa geçer, kabuk atılır ve viral DNA serbest kalır. D: Yeni viral nükleokapsidler virojenik stromada sentezlenir. E: Nukleusta zarf oluşumu gerçekleşir. F: Nukleusta polihedral inklüzyon yapıları oluşur. G: Inklüzyon yapıları, enfekte hücrelerin parçalanmasıyla etrafa salınır. H, I, J: Virojenik stromada yeni oluşan nükleokapsidler tomurcuklanır. K: Yeni oluşan tomurcuklanan virüsler endositozis ile komşu hücreleri enfekte eder

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 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 ajandır. 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 invaginasyonu, 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.

1.2.4.2. Nükleokapsid Taşınması ve Kabuğun Atılması

Baculovirus 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. Baculovirus DNA'sının kabuk atılması nukleus dışında veya nukleusta oluşur. Elektron mikroskobu çalışmaları, iki baculovirus 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 tespit edilmiştir (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, özel olarak ökaryotik RNA polimeraz II'yi inhibe eden bir fungal toksin olan alfa (α) amanitin tarafından inhibe edilen, konak RNA polimeraz tarafından gerçekleştiğine inanılmaktadır (Fuchs vd., 1983). Bazı baculovirus erken genlerinin transkripsiyonları ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Pullen ve Friesen, 1995). Elde edilen sonuçlar baculovirus erken genlerinin promotor sıralarının böcek RNA polimeraz II promotorlarına benzer olduğunu göstermiştir.

1.2.4.4. Viral DNA Replikasyonu

Baculovirus 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). 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 sitoskeletonundaki 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 nükleusuna göç ettiğine inanılmaktadır. ODV ile enfeksiyonda böcek orta bağırsak hücrelerine nükleokapsid girişten sonra, sitoskeletal elementler arasından nükleusa 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 nükleusunda enfeksiyondan sonra 2-4 saat içerisinde görülebilir (Granados, 1978). Bu durum, hücre kültür sisteminde hücre nükleusunda enfeksiyondan 1-3 saat sonra görülenlere benzerdir (Knudson ve Harrap, 1976). İnokülasyondan 1-4 saat sonra, genel olarak baculovirus'lerin penetrasyonu ve kabuk atılması için gerekli zaman olduğu düşünülmektedir.

Enfekte olmuş hücrelerde ilk göze çarpan önemli değişiklik nükleusun büyümesiyle birlikte hücrelerin yuvarlaklaşmasıdır. Nükleer heterokromatin kaybolur ve virojenik stroma olarak bilinen bir intranükleer 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 gama (geç) faz gen ekspresyonunun başlamasının aynı zamanda meydana geldiğini göstermektedir.

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

İçerisinde projeni virionların birleştiği virojenik stromanın, baculovirus 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, nükleoplazmaya baştan başa yayılmış veya gevşek olarak görülür. Fakat, enfeksiyondan 16-18 saat sonra genellikle nükleusun

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 (Grula vd., 1981). Baculovirus 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 baculovirus 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 ekspres 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-ihiva etmekte olan) bir dizin olduğunu göstermiştir (Rankin vd., 1988; Ooi vd., 1989). Transkripsiyonlarının aşırı derecede olmasından dolayı, *polh* ve *p10* genleri “aşırı derecede ekspreslenen” 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, gömülme 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. Baculovirus 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 iplikli yapılar

olarak yoğunlaşır (Williams vd., 1989). Polihedrinin yoğunlaşması esnasında ODV matriks içerisine gömülmüş olarak meydana gelir. Sonunda polihidrozis 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. Ölümden ve konak böcek doku ve kütikulasının 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 dağılıma ve kusurlu hücre parçalanması (Van Oers vd., 1994; Williams vd., 1989) gibi bazı önemli etkilere neden olabilir. Böylece, fonksiyonel bir p10'dan yoksun baculovirus'lerde, polihedra normal hücre parçalanmasıyla enfekte hücrelerden salınmaz. Bu virüslerden üretilmiş polihedralar kolay kırılır ve fiziksel streslerle parçalanmaya duyarlıdır.

1.2.5. Baculovirus'lerin 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 laboratuarlarda 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.

Baculovirus 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 baculovirus'lerin diğer takım üyelerini enfekte etmediği önceleri kesin kabul edilen bir durum idi. Ancak, sonraki çalışmalar, Orthoptera ve Isoptera üyelerinin, Lepidoptera baculovirus'leri 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, baculovirus'lerin Arthropoda'dan farklı takım üyelerini de enfekte ettiğini ortaya koymaktadır (McIntosh ve Grasela, 1994).

Çoğunluğu böceklerden olmak üzere 600'dan fazla baculovirus Arthropodlardan izole edilmiştir (Martignoni ve Iwai, 1986). Bunların bazıları birçok Lepidoptera, Hymenoptera ve Coleoptera zararlılarının kontrolü için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (McIntosh ve Grasela, 1994). En çok çalışılan baculoviruslerden *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). Her iki baculovirus 30'dan fazla Lepidoptera türünü enfekte eder. Başka bir baculovirus 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 baculovirus'lerin farklı böcek (Orlovskaya, 1998) ve hücre kültürlerinde (Lynn, 1999; McIntosh vd., 1999) konak spektrumuyla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu ve benzeri çalışmalar, farklı hücre suşlarının baculovirus replikasyonlarında çeşitli seviyelerde farklılıklar gösterdiklerini ve hücrelerin farklı duyarlılık derecelerine sahip olduklarını göstermiştir (Lynn, 2003a; Lynn, 2003b)

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs (HcNPV) ilk olarak hastalanmış *Hyphantria cunea* larvalarından Lee ve Miller (1978) ve daha sonra Choe ve arkadaşları (1986) tarafından ölü larvalardan izole edilmiştir. Sonra Lee (1987) ve Lee ve Lee (1988)

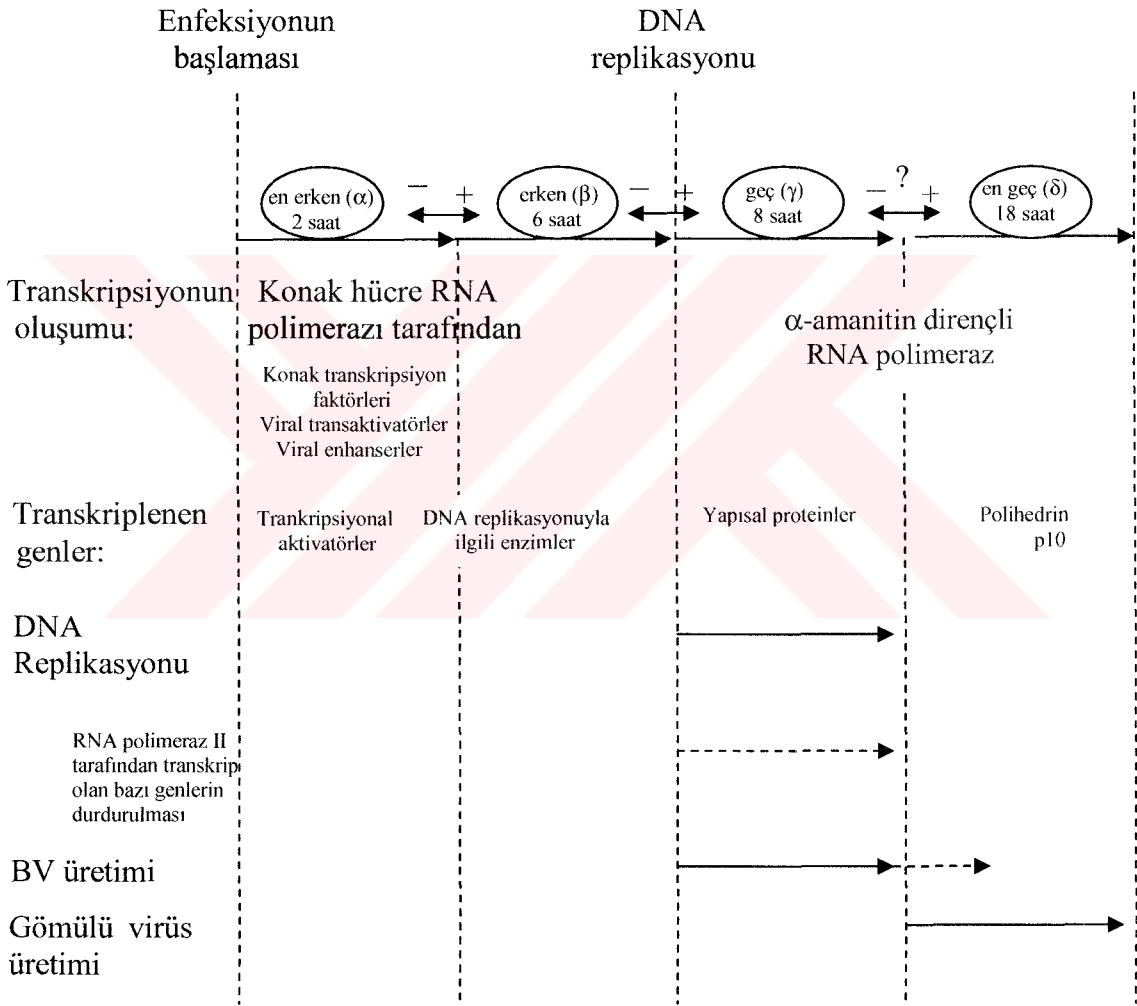
tarafından Sf21 hücrelerinde replikasyonu gösterilmiştir. Yine Lee ve Lee (1991) tarafından DNA analizleri ve Alves ve arkadaşları (2002) tarafından da HcNPV homolog tekrar bölgelerinin tespiti ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu virüsün konak spektrumuyla ilgili ise Shirata ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada, HcNPV'nin *Spilosoma imparilis* ve *Spodoptera exigua* hücrelerinde tam bir replikasyona sahip olduğunu göstermiştir. Bunların yanısıra, virüsün birçok hücre kültüründeki replikasyon durumu hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

1.2.6. Baculovirus Gen Ekspresyonunun Önemi

Baculovirus'ler ile enfekte olmuş hücrelerde virüse ait proteinler poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle yeterince tanımlanmıştır. Bu proteinlerin enfeksiyondan sonra 2-60 saatler arasında sentezlendikleri tespit edilmiştir. Enfekte edilen hücrelerden ardı ardına alınan örneklerin SDS-PAGE'de incelenmeleri neticesinde, baculovirus 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

oluşturulmaları 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, baculovirus gen regülasyonu karmaşık bir yapıya sahiptir. Yapılan çalışmalar neticesinde çeşitli baculovirus'lere ait gen regülasyonlarının transkripsiyonel seviyede kontrol edildikleri tespit edilmiştir (Krappa ve Knebel-Morsdorf, 1991; Demirbağ, 1993).



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

1.2.7. Baculovirus'lerin 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. Baculovirus'ler, moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir model olmaları (Charlton ve Volkman, 1991; O'Reilly vd., 1992), zirai mücadelede zararlı böceklerle 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 20 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 baculovirus-böcek hücre sisteminin ortaya çıkması, baculovirus'lerin moleküler biyolojileri üzerinde yoğun ve gayretli çalışmalardan ve yüksek miktarda protein üretimini destekleyen yeni böcek hücre kültür sistemlerinin kurulmasından kaynaklanmaktadır. Baculovirus 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 baculovirus'lerin 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 baculovirus'lerin daha etkili bir ekspresyon vektörü haline getirilmesi ve virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması çalışmaları, bunları gelecekte de biyoteknolojinin önemli materyallerinden biri yapacaktır.

Baculovirus'ler tek başlarına düşük ve yavaş öldürme gücüne ve yüksek seçiciliğe sahip olmakla birlikte dar konak spektrumuna sahiptir. Baculovirus bulaşmış besinler böcek tarafında yenildikten sonra virüse duyarlı böceklerin ölümü 4-8 gün almaktadır. Baculovirus'lerin bu özelliklerini geliştirerek, ziraat ve ormancılıkta genişletilmiş hedef seçiciliğini ve artırılmış virülansa sahip viral pestisidleri elde etmek, baculovirus 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.

Baculovirus ekspresyon vektör sistemi sayesinde çeşitli yeni aşular, ilaçlar, hormonlar ve büyüme faktörleri üretiminin yanında, insan karaciğer hastalığını tedavi etmek için baculovirus 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).

Baculovirus'lerle ilgili önemli bir husus da baculovirus sayesinde sağlanan katkı ve faydaların, henüz başlangıç aşamasında olması ve bu yüzden bu teknolojinin gelecekte büyük istikbal vadedmesidir.

1.2.8. Tezin Amacı

Hyphantria cunea ve *Lymantria dispar*, yaz ayları boyunca uzun bir süre ziraat ve ormancılıkta birçok bitkide ve ülkemizin önemli ihraç ürünlerinden biri olan fındık üzerinde önemli zararlar yapan Lepidoptera ordosuna ait böceklerdir. Ülkemizde bu iki zararlı ve hatta diğer fındık zararlılarına karşı kullanılmak üzere bir mikrobiyal mücadele ajanı olarak, baculovirus'lerin araştırılması henüz başlangıç aşamasındadır. *Hyphantria cunea*'dan izole edilmiş, *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs (HcNPV), baculovirus cinsine ait bir virüstür. Bu virüsün genom özellikleri ve replikasyonu ile ilgili bazı çalışmalar yapılmış ve virüsün *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21 hücrelerinde replike olduğu gösterilmiştir. Ancak, aralarında özellikle *Lymantria dispar* IPLB-LdElta hücre kültürü de olmak üzere birçok hücre kültüründe konak spektrumuyla ilgili bilgiler bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu doktora tezinde, *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ünün *Lymantria dispar* IPLB-LdElta hücre kültüründeki sitopatolojisi, replikasyon ve transkripsiyon özellikleri ve konak spektrumuyla ilgili özelliklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Hücreler, Besiyeriler ve Virüs

Bu çalışmada, *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21 (Vaughn vd., 1977) ve *Lymantria dispar* IPLB-LdElta (Lynn vd., 1988) hücre kültürleri kullanıldı. Sf21 hücreleri ısı ile inaktif edilmiş, %10 fetal bovine serum (FBS, Sigma) katkılı TNMFH (Grace's Insect Medium, Sigma, *Trichoplusia ni* medium, Hink, 1970) besiyerinde, 28°C'de 6'şar gün arayla büyütülüp, 1:5 oranında yeniden kültür edildi (Demirbağ vd., 1997). LdElta hücreleri ise katkısız ExCell 400 (JRH Biosciences) besiyerinde, yine 28°C'de 5'er gün arayla büyütülüp, 1:6 oranında yeniden kültür edildi (Lynn, kişisel bilgi).

Bu hücrelerin enfeksiyonlarında *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs (HcNPV) kullanıldı. Lee ve Miller (1978) tarafından doğal olarak hastalanmış *Hyphantria cunea* larvalarından izole edilmiş HcNPV, H. H. Lee (Kon Kuk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Seoul, 133-701, Korea)'den temin edildi.

2.2. Stok Virüs Üretimi

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs (HcNPV) stokları *in vitro* olarak duyarlı Sf21 hücrelerinde (Lee, 1987) üretildi. Hücreler, $1,8 \times 10^7$ hücre/150 cm² olacak şekilde kültür kabına (Grainer) ekildi. Kültür kabı, hücrelerin tabana tutunması için oda sıcaklığında bir saat bekletildi. Tutunma süresinden sonra besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler, MOI (hücre başına düşen enfeksiyon yapan virüs sayısı) 1 ve inokülüm 4 ml olacak şekilde katkısız TNMFH besiyeri ile enfekte edildi. Virüsün hücrelere tutunması için kültür kabı oda sıcaklığında, düşük hızda bir saat sallanarak bekletildi. İnokülüm uzaklaştırıldı, 20 ml katkılı TNMFH besiyeri ilave edildi 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 3-4 gün sonra) inkübasyona devam edildi. Üretilen esktrasellüler virüslerin, 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).

2.3. 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 × 10⁵ hücre/ml olacak şekilde duyarlı Sf21 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.

2.4. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs’ünün LdElta Hücrelerindeki Verimliliği

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs (HcNPV)’ü LdElta hücrelerinde çalışmaya başlamadan önce, bu hücrelerin HcNPV için üretkenliği tespit edildi. LdElta hücreleri, 3 x 10⁶ hücre/T25 cm² yoğunlukta kültür kabına (Grainer) bırakıldı ve MOI 1 olacak şekilde HcNPV ile enfekte edildi (Summer ve Smith, 1987). Kültür kabı 28°C’de 5 gün inkübe edildikten sonra, ekstrasellüler virüsleri ihtiva eden kültür sıvısı alındı ve 2.000×g’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi ve ekstrasellüler virüs

miktarı duyarlı Sf21 hücrelerinde belirlendi (Brown ve Faulkner, 1975) ve Reed ve Muench (1938)'e göre hesaplandı.

2.5. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Hücrelerde Sitopatik Etkilerin Gözlenmesi

Sitopatik etkileri tespit etmek için Sf21 ve LdElta hücreleri HcNPV ile enfekte edildi. Bunun için hücreler 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kaba (Grainer) bırakıldı. Bir gece 28°C'de bekletildikten sonra MOI 20 olacak şekilde Sf21 hücreleri için katkısız TNMFH ve LdElta hücreleri için katkısız ExCell 400 besiyerileri kullanılarak HcNPV ile enfekte edildi. Virüsün hücrelere tutunması için 2 saat boyunca oda sıcaklığında düşük hız sallayıcı (Red Rocker, Hofer) üzerinde sallanır durumda bekletildikten sonra, inokülüm uzaklaştırıldı ve 3 ml taze besiyeri (Sf21 için katkılı TNMFH, LdElta için katkısız ExCell 400 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 ve 72 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. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Hücrelerde Üretilen Ekstrasellüler Virüslerin Çoğalma Eğrisi

Sf21 ve LdElta hücreleri, yukarıda bahsedildiği gibi hücreler 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kaba (Grainer) bırakıldı ve MOI 20 olacak şekilde HcNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 0, 24, 48 ve 72 saat sonra, kültür sıvısı alındı. Ekstrasellüler virüsleri hücre kalıntıları ve PIB'lerden ayırmak için $2.000 \times g$ '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 zamani, y eksenini de log TCID₅₀'yi gösterecek şekilde virüs büyüme eğrisi çizildi.

2.7. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonunun Slot Blot Hibridizasyonu ile Belirlenmesi

2.7.1. Prob Geliştirme

2.7.1.1. *Autographa californica* Nükleopolihedrovirüs DNA'sının İzolasyonu

Sf21 hücreleri 5×10^5 hücre/petri olacak şekilde 35 mm'lik petri kaplarına (Costar) bırakıldı. Bir gece 28°C'de bekletildikten sonra MOI 20 olacak şekilde *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (AcMNPV) ile enfekte edildi ve 28°C'de inkübasyona devam edildi. Enfeksiyonu takiben 3 gün sonra (polihedral inklüzyon yapıların oluştuğu) AcMNPV 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 10 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 4°C'de muhafaza edildi.

2.7.1.2. *Autographa californica* Nükleopolihedrovirüs DNA'sının PCR ile Çoğaltılması

Prob geliştirmek üzere yukarıdaki gibi izole edilmiş AcMNPV DNA'sı polihedrin geni için düzenlenmiş (De Moreas ve Maruniak, 1997) F: 5' TAC GTG TAC GAC AAC AAG T-3' ve R: 5' TTG TAG AAG TTC TCC CAG AT-3' primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) termal cycler aletinde (Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler) çoğaltıldı (Woo, 2001). Reaksiyon karışımı, 4 µl viral DNA (AcMNPV), 5 µl (10X) PCR tamponu, 1 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 94°C'de 2 dakika bekletildikten sonra, 55°C'de 2 dakika, 72°C'de 3 dakika ve 94°C'de 1

dakikaya ayarlanarak 30 döngü şeklinde yapıldı ve son olarak da 72°C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. PCR reaksiyonu sonunda oluşan ürün %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.7.1.3. PCR Ürününün Elde Edilmesi ve Probenin 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. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Nitroselüloz Membrana Geçirilmesi

Sf21 ve LdElta hücreleri 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kabına (Costar) bırakıldı. Hücrelerin tabana tutunması için gece boyu bekletildikten sonra, MOI 20 olacak şekilde HcNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 0, 6, 12, 24 ve 48 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. NaOH'in nitroselüloz membranı parçalayabileceği düşünüldüğü için 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 (Hoefer 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 solusyonu 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 AcMNPV 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. HcNPV-Protein Sentezinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi

Sf21 ve LdElta hücreleri 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kabına bırakıldı ve MOI 20 olacak şekilde HcNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 0, 24, 48 ve 72 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) vorteksenerek çözüldü. Buz üzerine yerleştirilerek her 10 dakikada bir vorteksenerek 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. HcNPV-*polh* Gen Transkripsiyonunun RT-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi

2.9.1. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Hücrelerden Toplam RNA İzolasyonu

Sf21 ve LdElta hücreleri 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde 6 gözlü kültür kabına bırakıldı ve MOI 20 olacak şekilde hücreler HcNPV ile enfekte edildi. Toplam RNA Trizol (Gibco, BRL) kullanılarak firma tarafından tavsiye edildiği gibi enfeksiyondan 10, 12, 16 saat sonra hücrelerden izole edildi. İzolasyon için gözlerdeki besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ve her göze 1 ml TRI REAGENT ilave edildi. Pipetlenerek, hücrelerin tamamen tabandan kopması ve parçalanması sağlandı. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,2 ml kloroform ilave edilerek, 15 saniye yavaşça alt üst edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Karışım $12.000 \times g$ 'de $4^\circ C$ 'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe transfer edilip, buna 0,5 ml izopropanol ilave edildi ve yine 15 saniye yavaşça alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra $12.000 \times g$ 'de $4^\circ C$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve çökeltiliye 1 ml %70'lik etanol ilave edilerek yıkandı. Karışım, $7.500 \times g$ 'de $4^\circ C$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. RNA çökeltilisi hava ile 10-15 dakika hızlı bir şekilde kurutulduktan sonra, RNaz ihtiva etmeyen 30 μl ddH₂O'da çözüldü ve $-20^\circ C$ 'de muhafaza edildi. İzole edilen RNA uzun süreli saklama için $-80^\circ C$ 'de bekletildi.

RNA'nın konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Bu dalga boyundaki her bir ünite absorbans değeri 40 $\mu g/ml$ RNA'ya karşılık gelmektedir.

2.9.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

HcNPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinden enfeksiyondan 10, 12 ve 16 saat sonra daha önce belirtildiği gibi izole edilen RNA'lar, *polh* (polihedrin geni) için özel olan F: 5' TAT GTT TAT GAT AAT AAA-3' ve R: 5' TTG TAA (G) AAG TTC(T) TCC CAG-3' primerler kullanılarak reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi gerçekleştirildi (De Moreas ve Maruniak, 1997). Reaksiyon karışımı, 1 μl RNA (2 μg), 0,5 μl dNTP (10 mM), 0,5'er μl forward ve reverse primeri (10 mM), 5 μl 5X cDNA sentaz tamponu, 1 μl MgSO₄ (25 mM), 0,5 μl AMV reverse transkriptaz (0,5

ünite), 0,5 µl Tfl DNA polimeraz (0.5 ünite) ve 16 µl steril ddH₂O ilave edilerek 25 µl olarak hazırlandı. Reaksiyon 94°C’de 2 dakikalık denaturasyonun ardından, 94°C’de 30 saniye, 60°C’de 1 dakika ve 68°C’de 2 dakika bekletilerek 40 döngü yapıldı ve 68°C’de 7 dakika bekletilerek sonlandırıldı. PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde elektroforez edildi ve tarayıcıda taranarak bilgisayara aktarıldı.

2.10. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs’ünün İnsektisidal Etkisi

Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen PIB’lerin insektisidal etkileri *Lymantria dispar* ve *Hyphantria cunea* larvalarında belirlendi. Bunun için ilk olarak, 1×10^6 hücre/göz olacak şekilde hücreler 6 gözlü kültür kabına bırakıldı ve MOI 20 olacak şekilde hücreler HcNPV ile enfekte edildi. Üretilen PIB’ler enfeksiyondan 5 gün sonra izole edildi (Federici ve Hice, 1997) ve 1×10^7 PIB/ml konsantrasyonda karışımlar hazırlandı (Bischoff ve Slavicek, 1997). Bu karışımlardan, larvaların doğal olarak beslendikleri aynı büyüklükteki fındık yapraklarına bulaştırıldı. Sağlıklı 3. instar *L. dispar* ve *H. cunea* larvaları 10’arlı gruplar halinde kutulara yerleştirildi ve 4 saat aç bırakıldı (Hwang vd., 1998). Böylece hazırlanmış larvalar PIB bulaştırılmış besinlerle beslendi. Besinler bittikten sonra larvalar taze fındık yapraklarıyla beslenmeye devam edildi. Testler, $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de ve %60 nem oranında 12:12 ışık periyodunda gerçekleştirildi (Mitchell ve Smith, 1985). Her gün kontrol edilen kutulardaki ölü larvalar alındı. Her iki hücrede de üretilen PIB’ler için 120’şer larva kullanılarak testler üç tekrarlı yapıldı ve uygulama süreleri *L. dispar* için 15 gün, *H. cunea* için ise 10 gün olarak devam ettirildi. Toplam ölü larva sayıları belirlendikten sonra insektisidal etki Abbott formülüyle $\{100 \times (\% \text{ test grubu ölüm} - \% \text{ kontrol grubu ölüm}) / (\% 100 - \% \text{ kontrol grubu ölüm})\}$ hesaplandı (Abbott, 1925).

3. BULGULAR

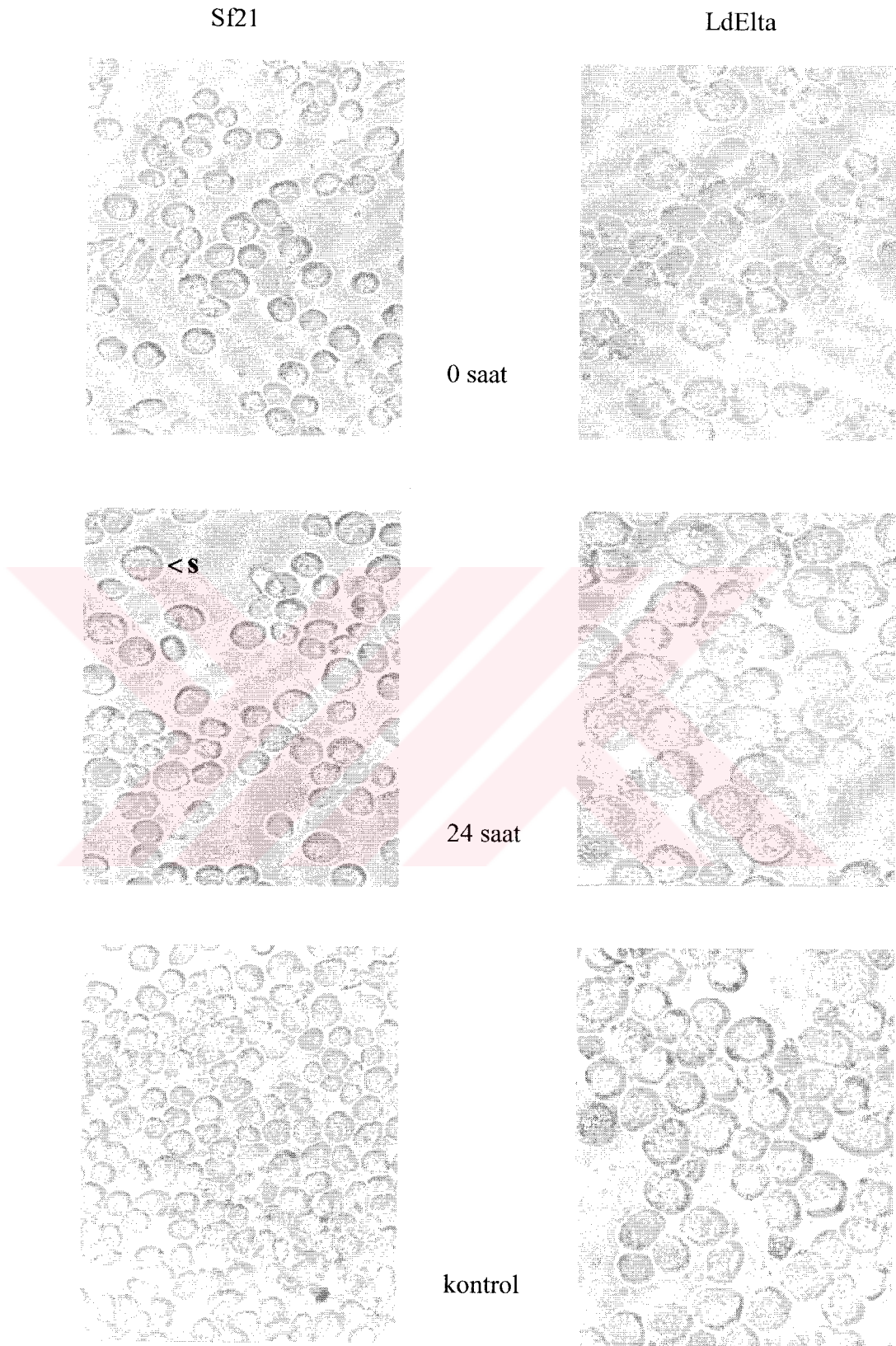
3.1. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs'ünün LdElta Hücrelerindeki Verimliliği

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs (HcNPV)'ünün LdElta hücrelerinde üretim verimliliğini test etmek için, LdElta hücreleri HcNPV ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 5 gün sonra kültür sıvısı alınıp, Sf21 hücrelerinde ekstrasellüler virüs konsantrasyonu “doku kültürü enfektif doz-50 (TCID₅₀)”ye göre hesaplandı. Buna göre virüs konsantrasyonu $1,7 \times 10^7$ pfu/ml olarak bulundu. Bu değer, HcNPV'nin LdElta hücrelerindeki sitopatolojisi, replikasyonu, transkripsiyonu ve konak spektrumuyla ilgili özelliklerinin ortaya çıkarılması açısından yeterli olduğu düşünüldü.

3.2. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olan Sf21 ve LdElta Hücrelerinde Meydana Gelen Sitopatik Etkiler

Sf21 hücrelerinin kontrol olarak kullanıldığı çalışmada, LdElta hücrelerinin *H. cunea* nükleopolihedrovirüs'e karşı olan duyarlılığı test edildi. Hücreler 12 saat aralıklarla mikroskopta incelendi. Hücrelerde meydana gelen sitopatik etki (CPE)'ler kaydedildi ve kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. Hücrelerde meydana gelen değişikliklerin 12 saat aralıklarla fotoğrafları çekilmesine rağmen, CPE'lerin en açık şekilde görüldükleri saatlere ait fotoğraflar (enfeksiyondan 0, 24, 36, 48 ve 72 saat sonra) kullanıldı.

Hücrelerde, enfeksiyondan 0 saat sonra, virüs enfeksiyonuna ait özel bir belirtiyeye rastlanmadı ve enfekte hücrelerin kontrol hücreleri ile aynı görüntüde oldukları belirlendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra Sf21 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 artmamasından anlaşıldı. Aynı sürede, LdElta



Şekil 6. *H. cunea* NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde 0 ve 24. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler. İverted ışık mikroskopunda 10X20'lik büyütme. Rakamlar: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, s: Enfekte olmuş stresli ve irileşmiş hücre

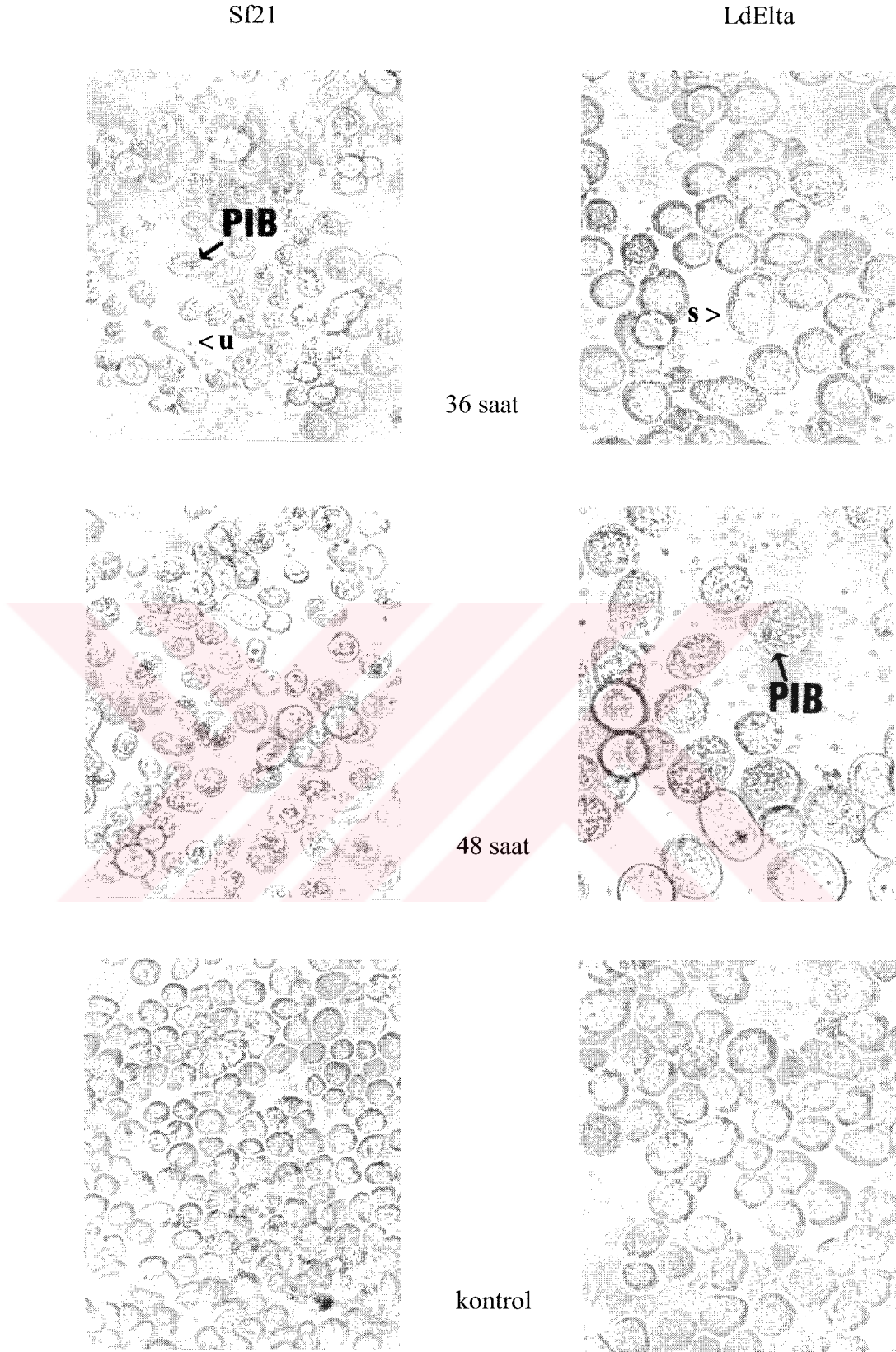
hücrelerinde herhangi bir enfeksiyon belirtisine rastlanmadı ve kontrol hücreleriyle aynı görüntüye sahip oldukları tespit edildi.

Enfeksiyondan sonra geçen süre arttıkça (36 saat) bazı Sf21 hücrelerinin şekillerinde “elips şeklini alma veya uzama” gibi değişikliklerin meydana geldiği tespit edildi. Ayrıca, Sf21 hücrelerinde polihedral inklüzyon yapı (PIB)’ların oluşumu, ilk olarak enfeksiyondan 36 saat sonra gözlemlendi (Şekil 7). Bu arada hücrelerdeki “esmerleşme, irileşme ve elips şeklini alma” gibi sitopatik etkilerin arttığı da tespit edildi. Bu saat itibarıyla Sf21 hücrelerinin yaklaşık olarak %60-65’inin PIB ihtiva ettiği ve kontrol ile karşılaştırıldığında canlı görünümünden çok uzak oldukları belirlendi. LdElta hücrelerinde enfeksiyona bağlı olarak meydana gelen ilk değişiklik, enfeksiyondan 36 saat sonra tespit edilen, hücrelerin “stresli olmaları ve irileşmeleri” idi (Sf21 hücrelerinde enfeksiyondan 24 saat sonra olduğu gibi).

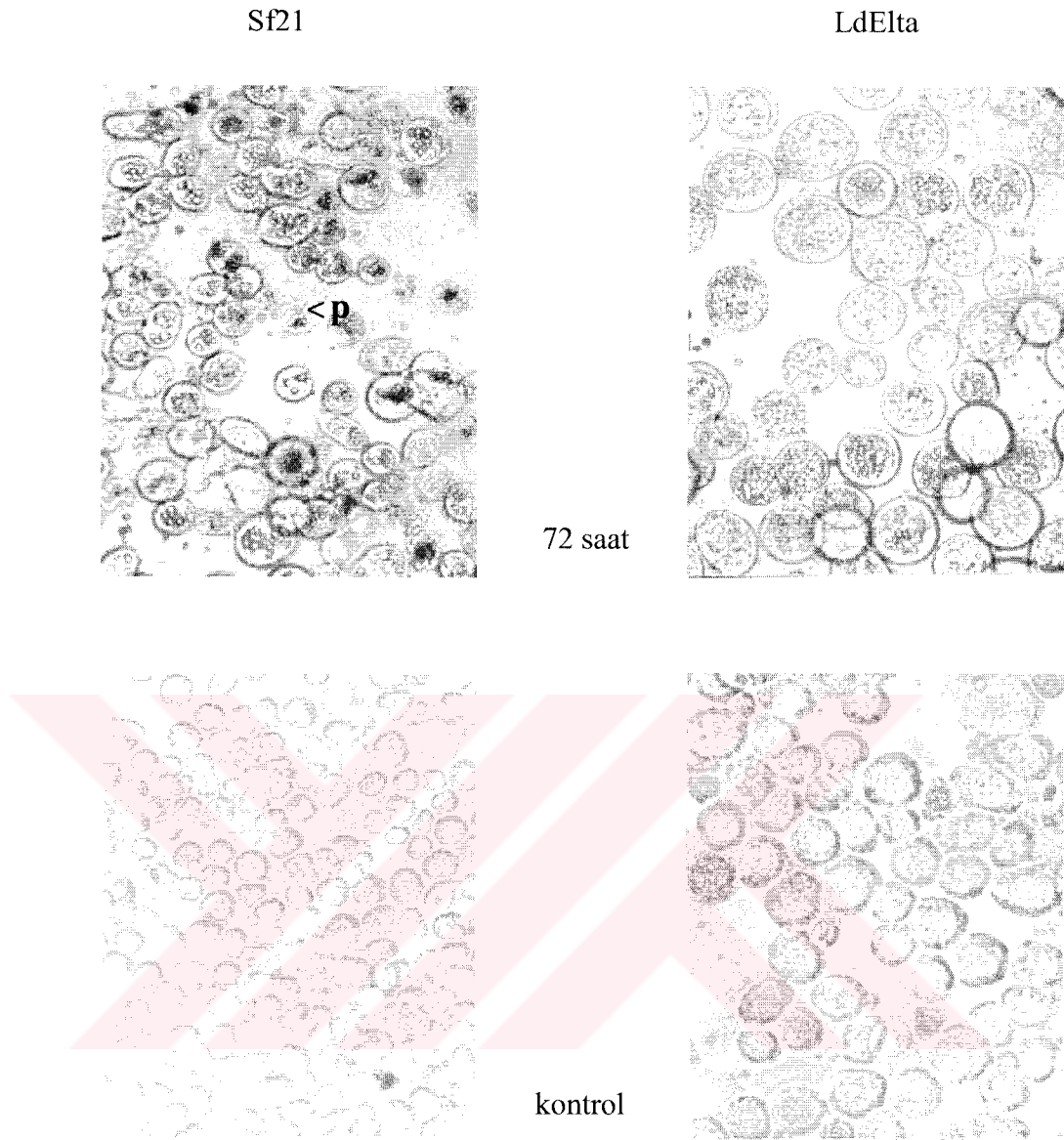
Enfeksiyondan 48 saat sonra Sf21 hücrelerinin %95 oranında PIB ihtiva ettikleri, hücrelerin “iyice esmerleştikleri, şekil bozukluklarının arttığı ve çoğu hücrenin tabandan koptuğu” tespit edildi. Enfekte olmuş hücrelerin kontrolden çok farklı bir görüntü içerisinde oldukları, kontrol hücrelerinin ise bölünmeye devam ettikleri belirlendi. PIB, LdElta hücrelerinde ilk olarak enfeksiyondan 48 saat sonra tespit edildi (Şekil 7). Hücrelerin yaklaşık %40’ında PIB tespit edilmesine rağmen, çok büyük bir kısmının enfekte olduğu “stresli olmaları ve granülleşmelerinden” anlaşıldı. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre bölünmesinin çok açık bir şekilde durduğu görüldü.

Enfeksiyondan 60 saat sonra Sf21 hücrelerinde PIB ihtiva etme oranı %100’e ulaşırken, LdElta hücrelerinde ise hücrelerin “irileşme ve granülleşme”sinin devam ettiği ve daha çok hücrenin bu görüntüye sahip olduğu belirlendi.

Enfeksiyondan 72 saat sonra Sf21 hücrelerinin PIB ile dolduğu, bunların bazı hücrelerde yoğun bir halde birleşerek “siyah kümeler” oluşturduğu, bazı hücrelerde ise parlak kristal şeklinde oldukları tespit edildi. Ayrıca, hücrelerin parçalanmasıyla PIB’lerin kültür ortamına dağıldıkları ve hücrelerin çok büyük bir kısmının tabandan koparak kültür ortamında yüzdüğü gözlemlendi (Şekil 8). Enfeksiyondan 72 saat sonra LdElta hücrelerinin %90’nın PIB ihtiva ettiği belirlendi. Bu hücrelerin Sf21 hücrelerine göre daha yoğun PIB ihtiva ettiği ve bu PIB’lerin daha küçük olduğu tespit edildi. LdElta hücrelerinin Sf21 hücrelerine göre daha az tahrip olduğu gözlemlendi ve hatta 72 saat sonunda LdElta hücre kültüründe parçalanmış hücreye rastlanmadı. Hücrelerin yuvarlak oldukları ve az sayıda hücrenin tabandan kopmuş olduğu tespit edildi.



Şekil 7. *H. cunea* NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde 36 ve 48. saatlerde meydana gelen sitopatik etkiler. İverted ışık mikroskobun 10X20'lik büyütme. Rakamlar: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, s: Enfekte olmuş stresli ve irileşmiş hücre, u: uzamış hücre, PIB: Polihedral inklüzyon yapı



Şekil 8. *H. cunea* NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde 72. saatte meydana gelen sitopatik etkiler. İverted ışık mikroskobunda 10X20'lik büyütme. Rakam: Enfeksiyondan sonra geçen zaman, p: Parçalanmış hücre

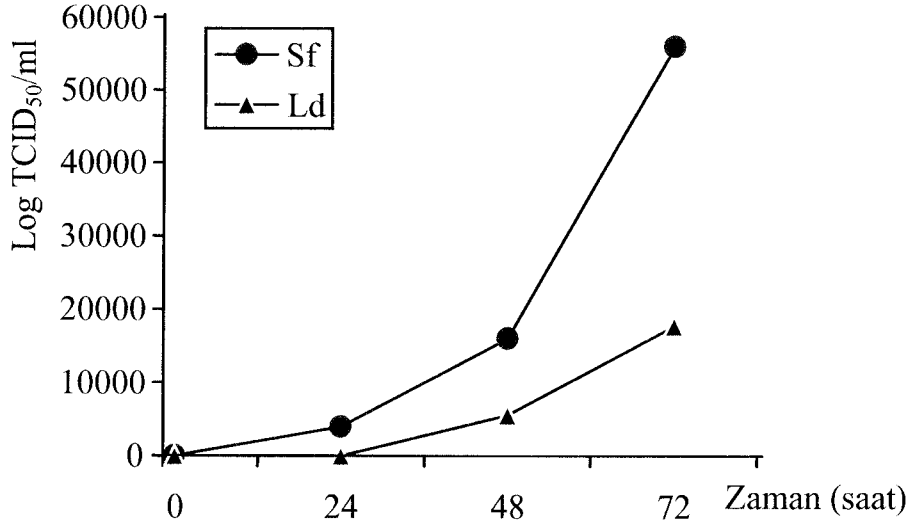
3.3. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Sf21 ve LdElta Hücrelerinde Üretilen Ekstrasellüler Virüs Miktarı ve Çoğalma Eğrisi

Enfeksiyondan 0, 24, 48 ve 72 saat sonra kültür besiyeri alındı ve ihtiva ettiği ekstrasellüler virüs konsantrasyonu doku kültürü enfektif doz-50 (TCID₅₀)'ye göre hesaplandı. Bu hesaplama sonunda her iki hücrede de ekstrasellüler virüs üretildiği

tespit edildi. Enfeksiyondan sonra örnek alınan tüm saatlerde Sf21 hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarının LdElta hücrelerde üretilenlerden daha fazla olduğu belirlendi.

Enfeksiyondan 0 saat sonra her iki hücrede de 10^4 seviyelerinde bir temel titer belirlendi. Enfeksiyondan 24 saat sonra Sf21 hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarı $3,87 \times 10^8$ pfu/ml (temel titerin yaklaşık 10^4 katı) olarak hesaplanırken, LdElta hücrelerindeki ekstrasellüler virüs miktarının $5,6 \times 10^4$ pfu/ml (temel titerin yaklaşık 4 katı) olduğu bulundu. Enfeksiyondan 48 saat sonra, Sf21 hücrelerinde ekstrasellüler virüs üretim miktarı artmakla birlikte ($1,6 \times 10^9$ pfu/ml) hızında bir azalma (enfeksiyondan 24 saat sonra üretilen virüs miktarının yaklaşık 10 katı) gözlenirken, LdElta hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarındaki en büyük artışın $5,6 \times 10^8$ pfu/ml (enfeksiyondan 24 saat sonra üretilen virüs miktarının yaklaşık 10^4 katı) olarak meydana geldiği hesaplandı. Enfeksiyondan 72 saat sonra ise Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarının sırasıyla $5,6 \times 10^9$ pfu/ml ve $1,77 \times 10^9$ pfu/ml olduğu tespit edildi. Sf21 hücrelerinde LdElta hücrelerine göre yaklaşık 3 kat fazla olmakla birlikte her iki hücrede de 10^9 seviyelerinde ekstrasellüler virüs üretildiği ve böylece, daha önceki saatlerde oluşmuş çok büyük farkın da kapanmış olduğu belirlendi.

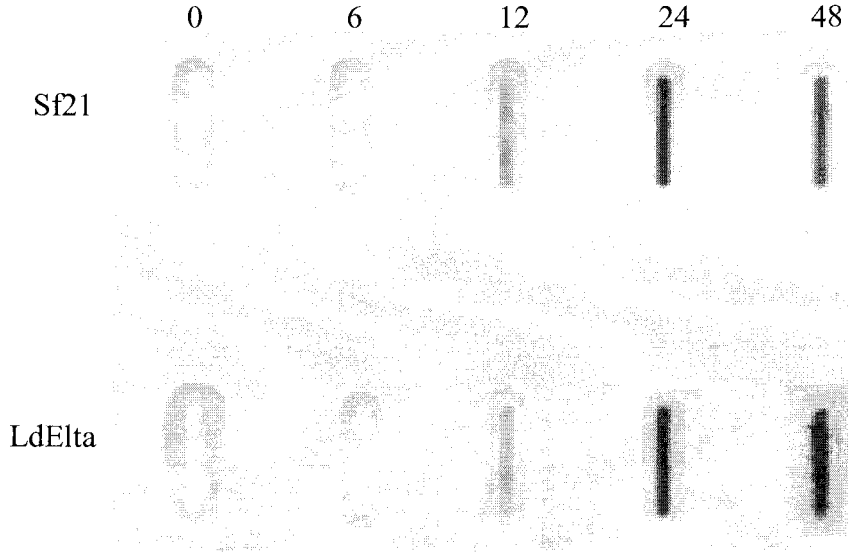
Her iki hücrede üretilen ekstrasellüler virüs miktarı logaritması y eksenini, zaman ise x ekseninde gösterilerek virüs çoğalma eğrisi Şekil 9'daki gibi çizildi.



Şekil 9. *H. cunea* NPV'nin Sf21 ve LdElta hücrelerinde çoğalma kinetiği. X eksen: Zaman; 0, 24, 48 ve 72 enfeksiyondan sonra örnek alınan saatler, Y eksen: Virüs konsantrasyonu; Log TCID₅₀ / ml X 10⁵

3.4. Sf21 ve LdElta Hücrelerinde *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs DNA Replikasyonu

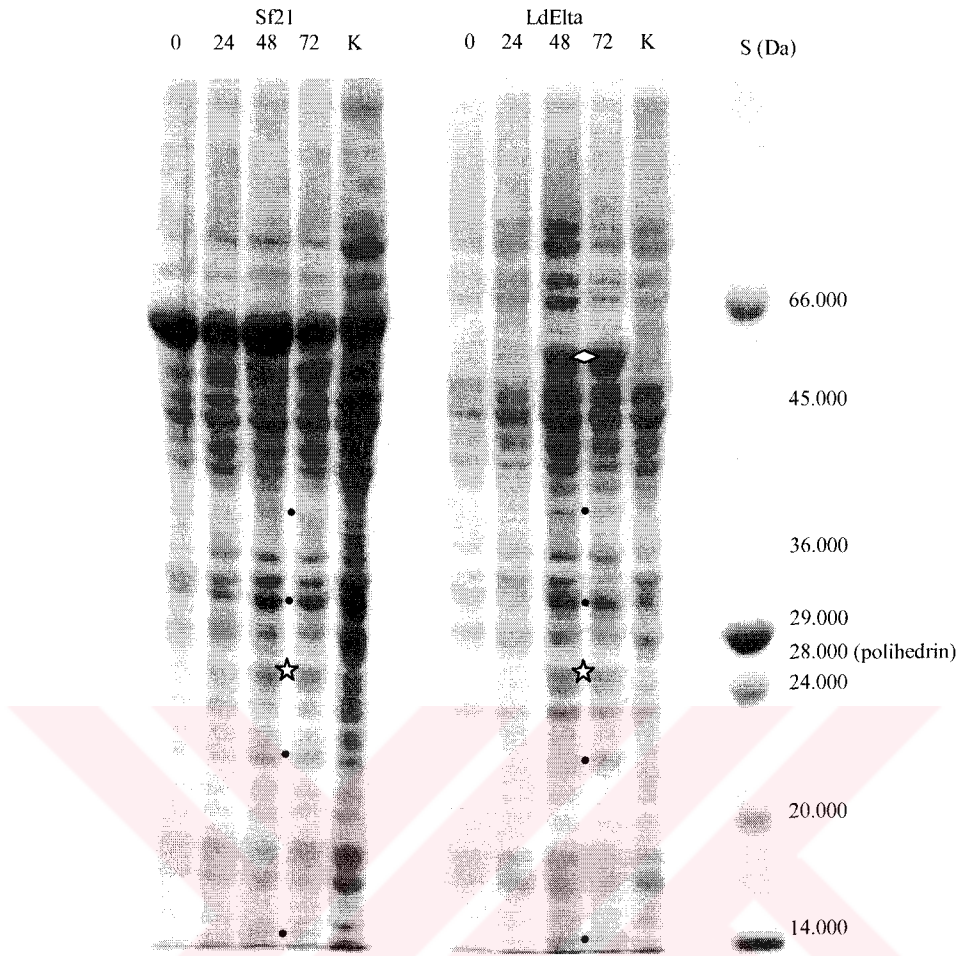
Sf21 ve LdElta hücre kültürlerinde HcNPV DNA replikasyonu yukarıda da belirtildiği gibi slot blot hibridizasyonu ile DIG High Prime DNA Labeling ve Detection Starter Kiti (Roch Diagnostics, GmbH, Kat. No: 1 745 832) kullanılarak belirlendi. Enfeksiyondan 0 ve 6 saat sonra herhangi bir bant oluşmaması prob ile hibritleşecek DNA'nın ortamda olmadığını, yani DNA replikasyonunun meydana gelmediğini göstermektedir. Ancak, enfeksiyondan 12 saat sonra çok koyu olmamakla birlikte, her iki hücrede de oluşan bantlar DNA replikasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 10). Ortaya çıkan bu sonuç hem Sf21 hem de LdElta hücrelerinde *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ün replike olduğunu ve bu replikasyonun enfeksiyondan 12 saat sonra başladığını göstermektedir. Enfeksiyondan sonra 24 ve 48 saate doğru zaman ilerlediğinde, hibridizasyon sonunda oluşan bantların daha da koyulaştığı Şekil 10'dan rahatlıkla anlaşılmaktadır.



Şekil 10. *H. cunea* NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde viral DNA replikasyonu. DNA replikasyonu slot blot hibridizasyon yöntemiyle belirlendi. Rakamlar; enfeksiyondan sonra geçen zaman, bantlar; AcMNPV probu ile hibridizasyona girmiş enfekte hücrelerdeki HcNPV DNA'sı

3.5. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs ile Enfekte Olmuş Sf21 ve LdElta Hücrelerindeki Protein Profilleri

HcNPV'ye ait proteinlerin bazılarının Sf21 ve LdElta 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 her iki hücrede de (LdElta hücrelerinde çok ince bir bant halinde de olsa) enfeksiyondan 24 saat sonra yaklaşık 28.000 Da ağırlığında bir bant olarak ortaya çıktığı tespit edildi. Aynı protein LdElta hücrelerinde enfeksiyondan 48 saat sonra çok daha net ve açık bir şekilde görüldü (Şekil 11). Baculovirus replikasyonunda bu proteinin görülmesi, replikasyonun tamamlanması açısından oldukça önemlidir. Polihedrinden başka yaklaşık 37.000, 30.000, 23.000 ve 14.000 Da ağırlıklarında HcNPV'ye ait virüs proteinleri de yine aynı enfeksiyonda her iki hücrede de tespit edildi. Ayrıca, sadece LdElta hücrelerinde enfeksiyondan 48 saat sonra yaklaşık 55.000 Da ağırlığında bir proteinin de ortaya çıktığı görüldü ve bunun enfeksiyondan 72 saat sonra da bol miktarda üretildiği belirlendi.

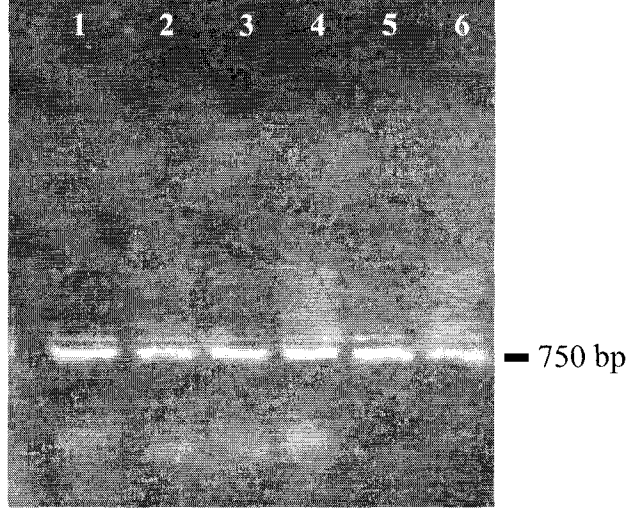


Şekil 11. *H. cunea* NPV ile enfekte olmuş Sf21 ve LdElta hücrelerinde protein sentezi. Protein sentezi %10'luk SDS-PAGE yöntemiyle belirlendi. Rakamlar: Enfeksiyondan sonra geçen zaman (saat), K: Enfekte olmamış, kontrol, S: Ağırlıkları bilinen standart proteinler, ☆: Polihedrin proteini, *: Her iki hücrede de ekspres olan viral proteinler, ◇: LdElta hücrelerinde ekspres olan protein

3.6. HcNPV-*polh* Geninin Sf21 ve LdElta Hücrelerinde Transkripsiyonu

HcNPV ile enfekte Sf21 ve LdElta hücrelerinden enfeksiyondan 10, 12 ve 16 saat sonra toplam virüs RNA'sı izole edildi. Bu RNA, revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu için kalıp olarak kullanılarak *polh* gen transkripsiyonu RT-PCR yöntemiyle tespit edildi. RT-PCR sonunda, HcNPV-*polh* geni transkripsiyonunun her

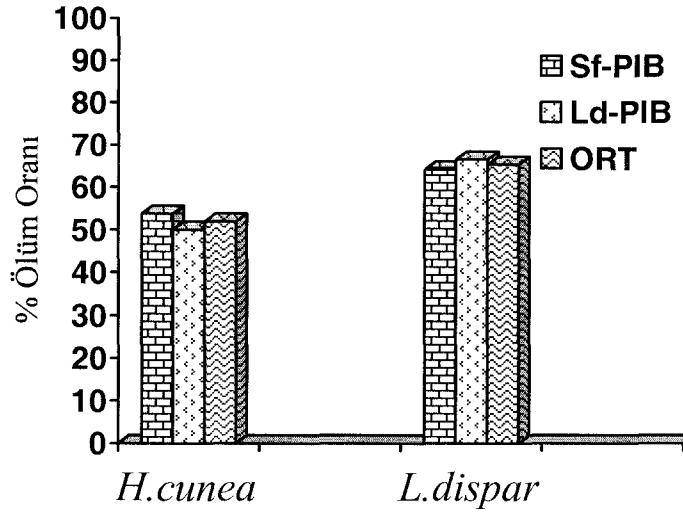
iki hücrede de enfeksiyondan 10 saat sonra transkrip (750 bp) olduğu agaroz jelde yürütülerek gösterildi (Şekil 12).



Şekil 12. *H. cunea* NPV-*polh* gen transkripsiyonunun Sf21 ve LdElta hücrelerinde RT-PCR reaksiyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntüleri. 1, 3 ve 5 numaralar: Sf21 hücrelerinde ve sırasıyla enfeksiyondan 10, 12 ve 16 saat sonra. 2, 4 ve 6 numaralar: LdElta hücrelerinde ve sırasıyla enfeksiyondan 10, 12 ve 16 saat sonra

3.7. *Hyphantria cunea* Nükleopolihedrovirüs'ünün İnsektisidal Etkisi

Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen *Hyphantria cunea* NPV'ye ait PIB'lerin 3. instar *Hyphantria cunea* ve *Lymantria dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi biyoassay testleriyle belirlendi. Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen PIB'ler larvalara ayrı ayrı uygulandı. Testler sonunda, Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen PIB'lerin *H. cunea* larvaları üzerinde sırasıyla %53,8 ve %50'lik bir insektisidal etkiye sahip olduğu belirlendi. Aynı hücrelerde üretilen PIB'lerin *Lymantria dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi ise (yine sırasıyla) %64,16 ve %66,6 olarak hesaplandı. Her iki hücrede de üretilen PIB'lerin larvalar üzerindeki ortalama insektisidal etkilerine bakıldığı zaman, *H. cunea* larvaları üzerinde %51,9 ve *L. dispar* larvaları üzerinde %65,38'lik bir insektisidal etkiye sahip oldukları görüldü (Şekil 13).



Şekil 13. Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen PIB'lerin *H. cunea* ve *L. dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri. Sf-PIB: *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde üretilen, Ld-PIB: *Lymantria dispar* hücrelerinde üretilen, ORT: Her iki hücrede üretilen PIB'lerin larvalar üzerindeki ortalama insektisidal etkisi

4. İRDELEME

Hyphantria cunea larvalarından izole edilen ve *Baculoviridae* familyasına ait olan *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ün çeşitli Lepidoptera hücrelerindeki replikasyon özellikleri bugüne kadar yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında ise aynı virüsün, daha önce çalışılmış olan *Spodoptera frugiperda* Sf21 hücrelerindeki replikasyon bilgilerine bazı ilave sonuçlar elde edilmiş ve daha önce çalışılmamış olan *Lymantria dispar* IPLB-LdElta hücrelerinde de konak spektrumuyla ilgili özellikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışma boyunca hücre kültürlerini enfekte etmek için kullanılan HcNPV stok virüs konsantrasyonu (IPLB-Sf21 hücre kültüründe üretilmiş ve aynı hücrelerde konsantrasyonu belirlenmiş) $0,69 \times 10^8$ pfu/ml idi. Araştırmalara başlamadan önce, *Lymantria dispar*'a ait IPLB-LdElta hücre kültürünün *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs (HcNPV) için üretim verimliliği test edildi. Test sonunda, 5 günlük uygulama süresince hücrelerde $1,7 \times 10^7$ pfu/ml konsantrasyonunda ekstrasellüler virüs üretildiği tespit edildi. HcNPV'nin Sf21 hücre kültüründeki replikasyonunun gösterildiği bir çalışmada, 5 gün sonunda 3×10^8 pfu/ml virüs üretildiği Lee (1987) tarafından bulunmuştur. Bu sonuç, Sf21 hücrelerinin LdElta hücrelerinden daha verimli olduğunu gösterdi. Ancak, McIntosh ve arkadaşları (1985), Lepidoptera takımına ait *Trichoplusia ni* Tn-CL1, *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21, *Heliothis virescens* BCIRL-Hv-AM1, *Heliothis zea* BCIRL-Hz-AM3 ve *Heliothis armigera* BCIRL-Ha-AM1 hücre kültürlerinde 5 baculovirus'ün (*Autographa californica* MNPV, *Spodoptera frugiperda* MNPV, *Trichoplusia ni* MNPV, *Galleria mellonella* MNPV ve *Heliothis zea* SNPV) replikasyonunu çalışmışlar ve 10^7 pfu/ml'den daha düşük değerler elde etmiştir. Bunlara ilave olarak, *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs'ün *Lymantria dispar* hücre kültüründe ekstrasellüler virüs üretmediği de McClintock ve arkadaşları (1986) tarafından göstermiştir. Bu bilgiler ışığında $1,7 \times 10^7$ pfu/ml konsantrasyonun *Lymantria dispar* IPLB-LdElta hücrelerinde *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ün replikasyonunu çalışmak için yeterli olduğu kabul edildi.

Çalışmada, Lepidoptera hücre suşlarından *Spodoptera frugiperda*'ya ait IPLB-Sf21 ve *Lymantria dispar*'a ait IPLB-LdElta hücre kültürlerinin *Hyphantria cunea*'dan izole

edilen nükleopolihedrovirüse karşı (HcNPV) olan duyarlılıkları araştırıldı. Bunun için virüsün bu hücrelerdeki sitopatik etkileri, ekstrasellüler virüs üretimi, polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu, protein sentezi, DNA replikasyonu ve polihedrin gen transkripsiyonu incelendi.

Sf21 hücrelerinin HcNPV'ye karşı olan duyarlılıkları daha önceki çalışmalarla belirlenmiştir (Lee, 1987; Lee ve Lee, 1988) Bu çalışmalar, HcNPV'nin Sf21 hücrelerindeki replikasyon özelliklerini PIB oluşumuna kadar ortaya koymuştur. Buna ilave olarak, HcNPV'nin *Spodoptera frugiperda* hücrelerine tutunmasının biyokimyasal analizleri de yapılmıştır (Park vd., 1999). Bu veriler doğrultusunda Sf21 hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonu bu çalışma için genel itibariyle kontrol olarak kullanılmış ve bazı ilave bilgiler de sağlanmıştır.

Sf21 hücrelerinde, enfeksiyondan 12 saat sonra görülmeye başlayan NPV enfeksiyonuna ait sitopatik etkilerin (CPE), enfeksiyondan 24 saat sonra açık bir şekilde ortaya çıktığı tespit edildi. Lepidoptera hücre kültürlerinde NPV enfeksiyonunun tipik CPE'leri "hücrelerin irileşmesi, sitoplazmik uzantılarını kaybetmesi, granülleşmesi, nukleusun kararması, hücrelerin elips şeklini alması, PIB oluşumu ve son olarak PIB'lerin saçılarak hücrelerin parçalanması"dır (Williams ve Faulkner, 1996; Blissard, 1996). Lee (1987) tarafından yapılan çalışmada, HcNPV'nin Sf21 hücrelerinde benzer CPE'ler meydana getirdiği rapor edilmiştir. Benzer sitopatik etkiler, Demirbağ ve arkadaşları (1997) tarafından *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs'ün *Spodoptera frugiperda* ve *Anticarsia gemmatalis* hücre kültürlerinde karşılaştırmalı replikasyonunda da tespit edilmiştir. Yine benzer etkiler Castro ve arkadaşları (1997) tarafından *Anticarsia gemmatalis* nükleopolihedrovirüs'ün *Anticarsia gemmatalis* UFL-Ag286, *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21, *Choristoneura fumiferana* IPRI-Cf124T ve *Bombyx mori* BM5 hücre kültürlerinde replikasyonunun araştırıldığı bir çalışmada da ortaya konulmuştur. Sf21 hücrelerinde polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu enfeksiyondan 36 saat sonra çok açık bir şekilde inverted ışık mikroskopuyla tespit edildi.

Yukarıda belirtilen sitopatik etkiler ve PIB'nin ilk görülmesi, LdElta hücrelerinde enfeksiyondan 48 saat sonra (Sf21 hücrelerine göre yaklaşık 12 saat geç) meydana geldiği tespit edildi. Enfeksiyondan 72 saat sonra Sf21 hücreleri parçalanıp, PIB'ler kültür ortamına dağılırken, LdElta hücrelerinde böyle bir duruma rastlanmadı. Böylece, LdElta hücrelerinin parçalanmaya karşı Sf21 hücrelerine göre daha dirençli olduğu ortaya çıktı. McClintock ve arkadaşları (1986), Ld652Y hücrelerinde *Autographa californica*

nükleopolihedrovirüs'ün yarı duyarlı replikasyonunu gösterdikleri çalışmada, AcMNPV ile enfekte olan Ld652Y hücrelerinde klasik sitopatik etkilerin meydana geldiğini fakat, enfeksiyon yapma kapasitesine sahip olan yavru virüs üretiminin gerçekleşmediğini rapor etmiştir. *L. dispar* hücre kültürünün AcMNPV için yarı duyarlı olmasına rağmen, HcNPV için üretken bir sistem olması oldukça önemlidir. Çünkü, AcMNPV nükleopolihedrovirüsler için tip türü olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, *L. dispar* nükleopolihedrovirüs'ün Ld652Y hücrelerinde replikasyon döngüsünün karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada Riegel ve Slavicek (1997), enfeksiyondan 24 saat sonra esas itibariyle tüm hücrelerde tipik bir CPE tespit ederken, ilk PIB oluşumunun enfeksiyondan yaklaşık 48 saat sonra meydana geldiğini rapor etmiştir.

Bu çalışma hem Sf21 hem de LdElta hücrelerinde tespit edilen sitopatik etkilerin, baculovirus ile enfekte olan Lepidoptera hücrelerinde meydana gelen klasik etkilerle benzerlik gösterdiği, yapılan karşılaştırmalar sonunda ortaya çıkarılmıştır. Buradaki önemli bir husus ise LdElta hücrelerinde meydana gelen CPE'lerin yaklaşık 12 saat geç olmasıdır. Bu da LdNPV'nin kendi konağındaki replikasyonunda CPE'lerin ortaya çıkma zamanı ile uyum içindedir.

Yukarıda tartışılan CPE'lerin hücrelerde ortaya çıkma zamanlarının, hücre kültürlerinde üretilen ekstrasellüler virüslerin meydana gelme zamanları ile paralellik gösterdiği ve uyum içerisinde olduğu sonuçların irdelenmesiyle belirlendi. Enfeksiyondan 0 saat sonra her iki hücre kültüründe de temel virüs titerinin yaklaşık 10^4 pfu/ml olduğu belirlendi. Castro ve arkadaşları (1997) yaptığı benzer bir çalışmada yine enfeksiyondan 0 saat sonra kültür ortamında 10^4 pfu/ml seviyelerinde bir temel virüs titerini rapor etmiştir.

Enfeksiyondan 24 saat sonra Sf21 hücrelerinde üretilen ekstrasellüler virüs miktarının $3,97 \times 10^8$ pfu/ml'ye ulaşmasıyla temel titerin yaklaşık 10^4 kat arttığı tespit edildi. Bu değer, Lee (1987)'nin 5 gün sonunda elde ettiği değere çok yakındır. Shirata ve arkadaşları (1999), Sf21 hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonunda, enfeksiyondan 48 saat sonra ekstrasellüler virüs miktarının 200 kat arttığını rapor etmiştir. Oysa bu tez çalışmasında enfeksiyondan henüz 24 saat sonra ekstrasellüler virüs miktarında 10.000 katlık bir artış tespit edildi. Uygulamanın sonunda (enfeksiyondan 72 saat sonra) hesaplanan ekstrasellüler virüs miktarının ($5,6 \times 10^9$ pfu/ml) da Lee (1987) ve Shirata ve arkadaşları (1999) tarafından rapor edilen değerlerden fazla olması dikkat çeken önemli bir durumdur. Ayrıca bu değer, benzer çalışmalarda (McIntosh vd., 1985; Liu ve Carstens, 1993; Demirbağ vd., 1997) Sf21 hücrelerinin NPV ile enfeksiyonunda elde edilen

değerlerden daha yüksek bir virüs konsantrasyonudur. Burada üzerinde durulması gereken bir başka husus ise Shirata ve arkadaşlarının (1999) bulduğu virüs konsantrasyonudur. Bu değer, Lee (1987) tarafından yapılan benzer bir araştırmada ve bu tez çalışmasında bulunan değerlere göre çok düşüktür.

LdElta hücrelerine bakıldığında, sitopatik etkilerdeki gecikmenin ekstrasellüler virüs üretiminde de ortaya çıktığı tespit edildi. LdElta hücrelerinde enfeksiyondan 48 saat sonra ekstrasellüler virüs üretiminde temel titerin 10^4 katı bir artış olduğu görülür. Bu değer Sf21 hücrelerinde enfeksiyondan 24 saat sonra ortaya çıkan değere çok yakındır. Bu da ekstrasellüler virüs üretiminde LdElta hücrelerinde Sf21 hücrelerine göre 24 saatlik gecikme olduğunu göstermektedir.

Enfeksiyondan 72 saat sonra Sf21 hücrelerinde LdElta hücrelerine göre yaklaşık 3 kat daha fazla ve her iki hücrede de 10^9 seviyelerinde ekstrasellüler virüs üretildiği tespit edildi. Bu veriler Ld652Y hücrelerinin AcMNPV ile yarı duyarlı enfeksiyonu (McClintock vd., 1986) ile karşılaştırıldığında, Ld hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonunun daha üretken bir sistem olduğunu ve hatta duyarlı bir sistem olduğunu ortaya koymaktadır. Bu da HcNPV'nin konak dağılımı açısından önemlidir. Enfeksiyondan 72 saat sonra Sf21 hücrelerinin hepsinin LdElta hücrelerinin ise %90'ının PIB ihtiva ettiği tespit edildi. Ayrıca, hücrelerinin parçalanması ve PIB'lerin kültür ortamına dağılması Sf21 hücrelerinde rastlanılan ancak, LdElta hücre kültüründe karşılaşılmayan bir durumdur.

Sitopatik etkilere ve ekstrasellüler virüs üretimine bakıldığında Sf21 ve LdElta hücrelerinin *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'e karşı duyarlı oldukları görülür. Sf21 hücrelerinin HcNPV'ye karşı duyarlılığı daha önceden bilinmesine rağmen, bu çalışma ile virüs üretim miktarıyla ilgili yeni veriler elde edildi. Özellikle, Shirata ve arkadaşlarının (1999) raporlarındaki gibi olmayıp, çok daha fazla miktarda ekstrasellüler virüs üretildiği tespit edildi. Shirata ve arkadaşları (1999), ekstrasellüler virüs üretiminde 72 saat sonra sadece 200-katlık bir artış belirlerken, bu tezde aynı uygulama süresinde 100.000-katlık bir artış olduğu ortaya çıkarıldı. Daha önce HcNPV'ye karşı olan duyarlılığı hakkında bir çalışma yapılmamış olan LdElta hücrelerinin de bu virüse karşı duyarlı olduğu ilk olarak ortaya konuldu. Ancak, virüs üretimi bakımından Sf21 ve LdElta hücrelerinin mukayesesinde, virüs üretiminin LdElta hücrelerinde Sf21 hücrelerine göre daha geç başladığı ve daha az üretildiği belirlendi.

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs'ün Sf21 ve LdElta hücrelerindeki viral DNA replikasyonu slot blot hibridizasyonu ile belirlendi. Hibridizasyon sonuçları,

enfeksiyondan 12 saat sonra her iki hücrede de viral DNA sentezinin başladığını ortaya koydu. *Spodoptera frugiperda* nükleopolihedrovirüs'ün (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). Liu ve Carstens (1993), Sf21 hücrelerinde başka bir NPV olan *Choristoneura fumiferana* nükleopolihedrovirüs'ün (CfMNPV) enfeksiyonunu inceledikleri bir araştırmada, Sf21 hücrelerinin CfMNPV için duyarsız olduğunu rapor etmiştir. Aynı çalışmada AcMNPV viral DNA'sının Sf21 hücrelerinde enfeksiyondan 12 saat sonra ve CfMNPV viral DNA'sının ise Cf-124T hücrelerinde enfeksiyondan 24 saat sonra replike olduğu tespit edilmiştir. Benzer başka bir çalışmada, Castro ve arkadaşları (1997), *Anticarsia gemmatalis* nükleopolihedrovirüs viral DNA replikasyonunun Sf21 hücrelerinde enfeksiyondan 6 saat sonra başladığını ve 48 saat sonra yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmiştir. HcNPV'nin Sf21 hücrelerindeki replikasyonu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Lee, 1987; Lee ve Lee, 1988; Park vd., 1999). Bunlara ilave olarak, Sf21 hücrelerinde HcNPV viral DNA replikasyonuna bakıldığında, Shirata ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışma akla gelmektedir. Bu çalışmada da viral DNA replikasyonunun enfeksiyondan 12 saat sonra başladığı, 24 ve 48 saat sonra DNA sentezinin giderek arttığı tespit edilmiştir.

HcNPV viral DNA replikasyonları karşılaştırıldığında, LdElt hücrelerindeki DNA replikasyonunun Sf21 hücrelerindeki gibi enfeksiyondan 12 saat sonra başladığı ve ilerleyen saatlerde (enfeksiyonda 24 ve 48 saat sonra) viral DNA miktarının her iki hücrede de giderek yoğunlaştığı tespit edildi.

Bu sonuçlar, viral DNA replikasyonunun iki hücrede de paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. 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* nükleopolihedrovirüs'ünün 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.

Benzer replikasyon çalışmalarından da anlaşıldığı gibi HcNPV'nin LdElta hücrelerindeki replikasyonu AcMNPV'nin aynı hücrelerdeki replikasyonu ile hemen hemen aynı zamanda başlamasına rağmen, LdNPV'nin aynı hücrelerdeki replikasyonundan yaklaşık 6-8 saat erken meydana gelmiştir.

HcNPV ile enfekte olan Sf21 ve LdElta hücrelerinde virüse ait proteinlerin ekspres olup olmadığı, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendi. NPV'ler bol miktarda polihedra olarak adlandırılan bir inklüzyon yapı üretir. Polihedra, polihedrin olarak adlandırılan tek bir polipeptitten oluşur. Virionların çoğu polihedra içerisine gömülür. Böylece, doğada çeşitli çevresel etkilerden korunmuş olur. Jarvis ve arkadaşları (1991), baculovirus 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 maksimum seviyeye çıkar (Liu ve Bilimoria, 1990; Kovacs vd., 1991).

Sf21 ve LdElta hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonunda, enfeksiyondan 24 saat sonra polihedrin proteinin ekspres olduğu SDS-PAGE ile tespit edildi (LdElta hücrelerinde ince bir bant halinde). Enfeksiyondan 48 ve 72 saat sonra ise hücrelerdeki polihedrin yoğunluğunun giderek arttığı gözlemlendi. 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 HcNPV polihedrin proteininin Sf21 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. Yukarıda da belirtildiği gibi McClintock ve arkadaşlarının (1986), *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs'ün 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. AcMNPV ile enfekte olan

Ld652Y hücrelerinde DNA replikasyonu meydana geldiği halde, viral proteinlerin sentezlenmediği tespit edildi. Yani Ld652Y hücrelerinin AcMNPV için yarıduyarlı olduğu belirlendi. Bu çalışmada ise elde edilen veriler değerlendirildiğinde LdElta hücrelerinin HcNPV için duyarlı (virüs hücreye tutunması, hücre içerisine girişi, DNA replikasyonu gerçekleşmesi, makromoleküller sentezlenmesi, moleküllerin birleşmesi ve virüsün hücreden salınımı gibi olaylar) olduğu tespit edildi.

HcNPV'nin Sf21 ve LdElta hücrelerindeki protein profillerine bakıldığında polihedrinden başka viral yapısal proteinlerin (Liu ve Bilimoria, 1990) de her iki hücrede ekspres olduğu görülmektedir. Bunların yaklaşık 37 kDa, 30 kDa, 23 kDa ve 14 kDa ağırlıklarında oldukları tespit edildi. Bunlara ilave olarak, yaklaşık 55 kDa ağırlığında bir proteinin ise sadece LdElta hücrelerinde ortaya çıktığı belirlendi.

Sf21 ve LdElta hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonunda, enfeksiyondan 10 saat sonra her iki hücrede de virüse ait polihedrin transkriptleri RT-PCR ile tespit edildi. *polh*-ve *p10*-genleri NPV genom organizasyonlarında yüksek oranda korundukları (Rodrigues vd., 2001) için NPV'ler arasındaki filogenetik çalışmalarda (Zanotto vd., 1993; Wolff vd., 2002) ve geç gen analizlerinde (Sadler vd., 1998; Kuzio vd., 1999; Razuck vd., 2002) bu iki gen kullanılmaktadır. Riegel ve Slavicek (1997), *L. dispar* 652Y hücrelerinde birbirinin suşu olan iki LdNPV'nin replikasyon döngüsünü ortaya çıkardıkları bir çalışmada, polihedrin gen transkriptinin enfeksiyondan 30 saat sonra ortamda var olduğunu göstermiştir. Buna ilave olarak, Razuck ve arkadaşları (2002) diğer bir geç gen olan, AgMNPV'ye ait *p10* geninin Ag-286 hücrelerinde enfeksiyondan 18 saat sonra transkrip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, HcNPV'ye ait *polh* geninin hem Sf21 hücrelerindeki transkripsiyon zamanını ortaya koyması açısından hem de LdElta hücrelerinde HcNPV ve LdNPV'ye ait *polh* genlerinin transkripsiyon zamanlarının karşılaştırılması husunda önemli veriler ortaya koymuştur. LdElta hücrelerinde, LdNPV-*polh* genine göre HcNPV-*polh* geni daha erken ekspres olmaktadır. Aynı zamanda, polihedrin gibi enfeksiyonun geç fazında ekspres olan *p10* geni ile mukayese edildiğinde, HcNPV-*polh* geninin her iki hücre kültüründe de AgMNPV-*p10* geninin Ag-286 hücrelerindeki transkripsiyonundan erken transkripsiyon olması önemli bir sonuçtur.

Sf21 ve LdElta hücre kültürlerinde üretilen inklüzyon yapıların *Hyphantria cunea* ve *Lymantria dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkilerine bakıldığında, sırasıyla %51,9 ve %65,38 olduğu görülür. Enfeksiyondan 4 gün sonra ölmeye başlayan larvalar ışık mikroskobu ve boyama yöntemi ile kontrol edildi ve larvaların virüs enfeksiyonundan

öldükleri belirlendi. Baculovirus enfeksiyonunda larvaların ölümleri enfeksiyondan 4 gün sonra başlar ve virüs, enjeksiyonla verilir ise ölüm zamanı sadece önemsiz ölçüde kısalmır (Washburn vd., 1995). Çok sayıda böcek larvalarında dirençliliği seçme çalışmaları, enfekte olmuş orta bağırsak hücrelerinin larvadan atılmalarının baculovirus enfeksiyonuna karşı primer savunma olduğunu ve virüsün herhangi bir zamanda ortabağırsak bazal laminasına geçmesinin, virüse karşı dirençlilik kazandırabildiğini desteklemektedir (Volkman, 1997; Washburn vd., 1998). AcMNPV'nin enfeksiyon işlemi çeşitli Lepidoptera larvalarında incelenmiştir. *Heliothis virescens*'in AcMNPV ile enfeksiyonunda, orta bağırsak hücrelerinin enfeksiyonu ve virüsün bazal laminaya geçişi arasında uzun bir dönem ve virüsün böcek dokularına önemsiz bir şekilde yavaş ilerlemesi tespit edildi (Washburn vd., 1995). Bunun yanında, bazı Lepidoptera larvaları oral enfeksiyona yüksek oranda dirençlidir (Volkman, 1997). Ayrıca, baculovirus ile enfekte olan *Helicoverpa zea* larvalarında orta bağırsağa geçmiş virüsün ilerlemesinin, enfekte olmuş trake hücrelerinin kapsülle çevrilmesi ve hemositlerin kullanılmasıyla sınırlandırılabilirdiği gösterilmiştir (Trunseau vd., 2001). Zhang ve arkadaşları (2002), virüs enfeksiyonu için konak apoptotik (programlanmış hücre ölümü) cevabın *Spodoptera litura* larvalarında, AcMNPV'nin organizma seviyesinde yayılımını azalttığını ve apoptosisin baculovirus enfeksiyonu için konak dağılımını sınırlayıcı bir faktör olabileceğini ortaya koydu.

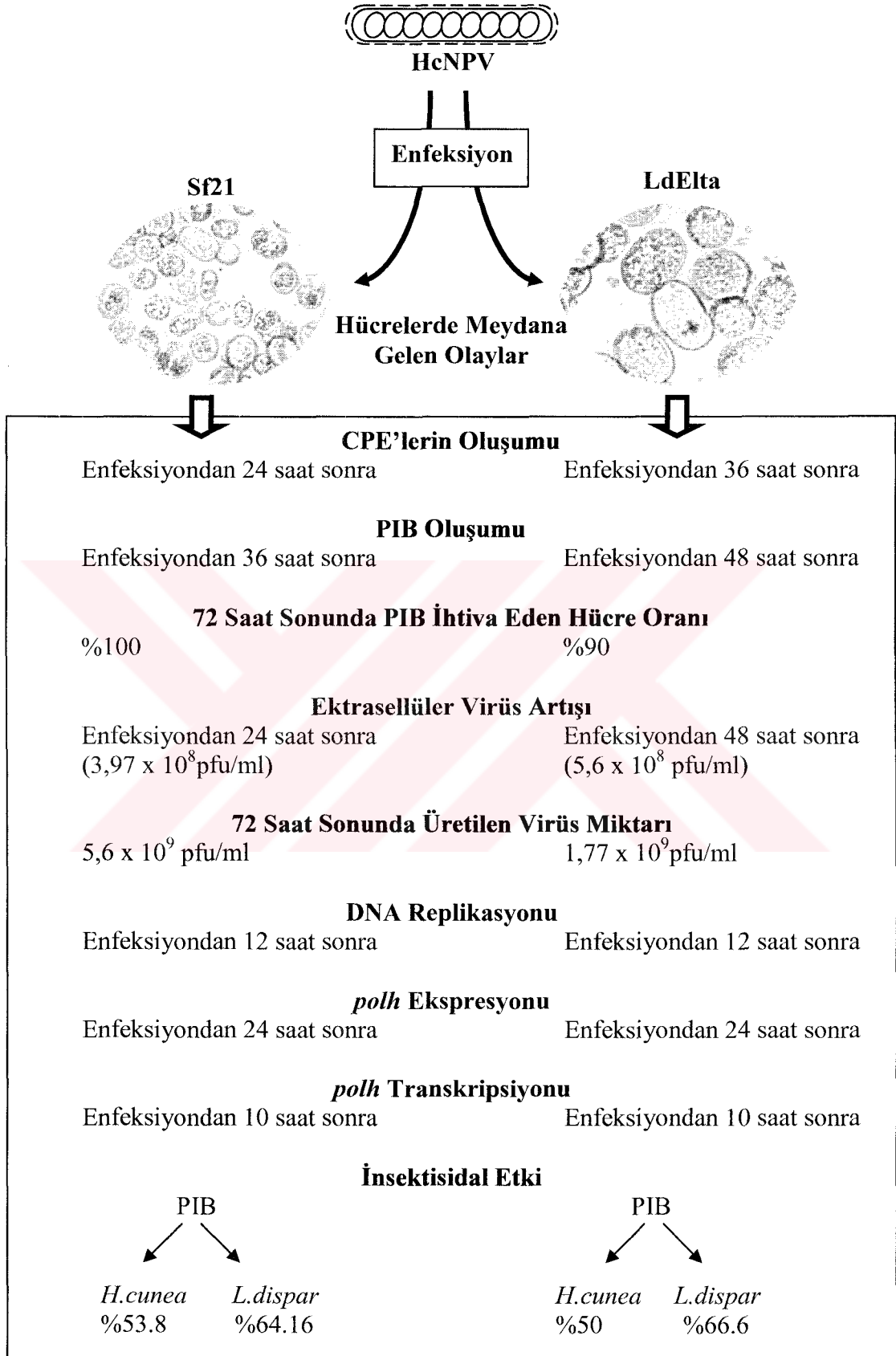
Çalışma sonunda elde edilen insektisidal etkilerin nispeten düşük olmasının yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmada *H. cunea* larvaları enfeksiyondan 7-8 gün sonra pupa evresine girdiği tespit edildi. Bu nedenle test süresi *H. cunea* için 10 gün, *L. dispar* için ise 15 gün olarak uygulandı. Bu farklılık her iki larvanın fizyolojik hayat evrelerine göre ayarlandı. Çünkü, *H. cunea*'nın ortalama hayat süresi 24-33 gün iken, *L. dispar*'ın 45-56 gündür (Zirai Mücadele Teknik Talimatları, 1995). Buna göre her iki konağın da kendisine özgü bir evrimsel hayat döngüsü süresi olduğundan ve *L. dispar* larvaları daha uzun süre enfeksiyona maruz kaldığı için daha yüksek ölüm oranına sahip olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs (HcNPV)'ün *Spodoptera frugiperda* (ILPB-Sf21) ve *Lymantria dispar* (IPLB-LdElta) hücre kültürlerinde replikasyon özellikleri araştırıldı. HcNPV'nin Sf21 ve LdElta hücrelerindeki enfeksiyonu, meydana getirdiği sitopatik etkiler, ekstrasellüler virüs üretimi ve virüs çoğalma eğrisi, polihedral inklüzyon yapı (PIB) oluşumu, viral DNA replikasyonu, viral yapısal

proteinlerin sentezi, *polh* gen transkripsiyonu ve hücrelerde üretilen inklüzyon yapıların *H. cunea* ve *L. dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri belirlenmiş oldu.

Araştırma sonunda elde edilen verilerin toparlanarak özetlenmesi için Şekil 14 oluşturulmuştur. HcNPV'nin ekspresyonu ve konak spektrumunu gösteren bu sonuçlar, virüsün Sf21 ve LdElta hücrelerinde ekspresyon vektörü ve biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılabileceğini ve bu hücrelerin HcNPV için duyarlı hücre kültürleri olduklarını göstermektedir. Ayrıca, HcNPV'nin Sf hücrelerindeki replikasyonu tekrar teyit edilip bazı ilave gelişmeler sağlanırken, Ld hücrelerindeki replikasyonu ise ilk olarak tespit edilmiştir.





Şekil 14. Sf21 ve LdElta hücrelerinin HcNPV ile enfeksiyonu sonunda meydana gelen olaylar

5. SONUÇLAR

Hyphantria cunea nükleopolihedrovirüs (HcNPV)'ünün *Spodoptera frugiperda* (ILPB-Sf21) ve *Lymantria dispar* (IPLB-LdElta) hücre kültürlerinde replikasyonunun ışık mikroskopisi, moleküler teknikler ve hibridizasyon yöntemleriyle belirlendiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Enfeksiyondan sonra hücrelerin irileşmesi, granülleşmesi, sitoplazmik uzantılarını kaybetmesi, hücre şekillerinin bozularak elips şeklini alması, nukleusun kararması ve hücrelerde PIB oluşumu gibi sitopatik etkilere (CPE) bakıldığında LdElta hücrelerinin de Sf21 hücreleri gibi HcNPV için üretken bir sistem olduğu anlaşılmaktadır.

2. CPE'lerin meydana gelmesi, PIB'lerin ortaya çıkması ve ekstrasellüler virüs üretimi Sf21'e göre LdElta hücrelerinde daha geç meydana gelirken, DNA replikasyonu, *polh* transkripsiyonu ve polihedrin ekspresyonunun her iki hücrede de aynı zamanda meydana geldiği tespit edildi.

3. Üretken bir sistem olmasına rağmen, LdElta hücrelerinde CPE'lerin ortaya çıkmasındaki ve ekstrasellüler virüs üretimindeki gecikmelerin, konak faktörlerinin yetersizliği veya uyumsuzluğundan kaynaklanmaktadır.

4. Makromoleküllerin her iki hücrede de aynı zamanda sentezlenmelerine rağmen, virüs partiküllerinin oluşumundaki gecikme ve konsantrasyon düşüklüğünün virüs asamblesi sırasındaki olayların uyumsuzluğundan kaynaklanmış olabileceği kanaatindeyim.

5. Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilen PIB'lerin *H. cunea* ve *L. dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkilerinin düşük olması, bu virüse karşı larvalarda bir dirençlilik mekanizması olduğunu desteklemektedir.

6. ÖNERİLER

1. DNA replikasyonu, protein üretimi ve *polh* gen transkripsiyonu aynı saatte başlamasına rağmen, PIB oluşumundaki gecikmenin ve ekstrasellüler virüs üretimindeki farkların neden meydana geldiği, hangi konak faktörlerinin bu rolü oynadığı daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak anlaşılabilir.

2. Genel itibarıyla HcNPV'nin ve özellikle Sf21 ve LdElta hücrelerinde üretilmiş PIB'lerin konak spektrumlarını belirlemek için daha farklı tarım zararlıları üzerindeki insektisidal etkileri araştırılabilir.

3. Daha etkili bir enfeksiyon oluşturmak için ekstrasellüler virüsler enjeksiyon yöntemiyle larvalara verilerek insektisidal etkileri araştırılabilir.

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

5. HcNPV, yapılacak olan gen transferleriyle daha hızlı, daha etkili ve virülansı artırılmış bir biyolojik mücadele ajanı haline getirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- 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.
- Alves, C.A.F., Ikeda, M. ve Kobayashi, M., 2002. Identification and Characterization of *Hyphantria cunea* Nucleopolyhedrovirus Homologous Repeated Regions, Virus Gen., 25, 281-290.
- 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, pp 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, pp 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.
- 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, Tr. J. of Biology, 21, 63-70.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A.O. ve Demir, İ., 1998. Baculovirus'ün Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması, Tr. J. of Biology, 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.
- Erlanson, M.A. ve Carstens, E.B., 1983. Mapping Early Transcription Products of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, Virology, 126, 398-402.
- 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, pp 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, pp 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, pp 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, pp 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.
- Gula, 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 Polihedrosis 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.
- Hoof 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.
- Hwang, S.H., Yoo, K.H., Moon, E.S., Cha, S.C. ve Lee, H.H., 1998. Overexpression of Insecticidal Protein Gene of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, J. Microbiol., 36, 298-295.
- 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, pp 35-36, Invitrogen Corporation 3985 B Sorrento Valley Blvd, San Diego, USA.
- Jaques, R.P., 1985. Stability of Insect Viruses in the Environment. In: Maramorosch, K. and Sherman, K.E., eds., *Viral Insecticides for Biological Control*, pp 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.
- Kelly, D.C., 1982. Baculovirus Replication, J. Gen. Virol., 63, 1-13.
- 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. 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.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- 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, H.H. ve Lee, K.K., 1988. Isolation, Complementation and Partial Characterization of Temperature-sensitive Mutants of the Baculovirus *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Gen. Virol., 69, 1299-1306.
- Lee, K.K. ve Lee, H.H., 1991. The Genome and Viral Protein Analyses of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus HL-2, Mol. Cells, 1, 241-244.

- Lee, H.H. ve Miller, L.K., 1978. Isolation of Genotypic Variants of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Virol., 27, 754-767.
- 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.
- Liu, J.J. ve Carstens, E.B., 1993. Infection of *Spodoptera frugiperda* and *Choristoneura fumiferana* Cell Lines with the Baculovirus *Choristoneura fumiferana* Nuclear Polyhedrosis Virus, Can. J. Microbiol., 39, 932-940.
- 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.
- 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*, pp 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.
- Martignoni, M.E. ve Iwai, P.J., 1986. Propagation of Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus of *Orgyia pseudotsugata* in Larvae of *Trichoplusia ni*, J. Invertebr. Pathol., 47, 32-41.

- 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/Technology, 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., 28A: 557-559.
- McIntosh, A.H., Christion, P.D. ve Grasela, J.J., 1999. The Establishment of *Heliothis* 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, pp 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.

- Mitchell, F.L. ve Smith, J.W., 1985. Pathology and Bioassay of the Lesser Cornstalk Borer (*Elasmopalpus lignosellus*) Entomopoxvirus, J. Invertebr. Pathol., 45, 75-80.
- 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 Baculoviruses 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/Technology, 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, pp 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 Baculoviruses Gene Expression, Gene, 70, 39-49.
- Razuck, F.B., Ribeiro, B., Vargas, J.H., Wolff, J.J. ve Ribeiro, B.M., 2002. Characterization of the *p10* Gene Region of *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus, Virus Gen., 24, 243-247.
- Reed, L. ve Muench, H., 1938. A Simple Method for Estimating Fifty Percent and 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.
- Rodrigues, J.C.M., Souza, M.L., O'Reilly, D., Velloso, L.M., Pinedo, F.J.R., Razuck, F.B., Ribeiro, B. ve Ribeiro, B.M., 2001. Virus Gen., 22, 103-112.
- 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.
- Sadler, T.J., Ward, V.K., Glare, T. ve Kalmakoff, J., 1998. Examination of New Zealand's Endemic *Wiseana* Nucleopolyhedrovirus by Analysis of the Viral Polyhedrin Gene, Arch. Virol., 143, 2273-2288.
- 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.
- 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.
- 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 Baculovirus Genes, Including *lef-11*, *p.35*, *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* Multiple Nucleopolyhedrovirus Pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zae*, J. Virol., 75, 996-1003.
- URL-1. <http://www.nerc-oxford.ac.uk/chehoford/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.
- 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, Noctuidae), 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*, pp 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*, pp 104-111. Springer-Verlag, New York.
- Volkman, L.E. ve Keddie, B.A., 1990. Nuclear Polyhedrosis Virus Pathogenesis. *Seminars 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. Gener. Virol., 64, 2229-2336.
- Washburn, J.O., Kirkpatrick, B.A., Haas-Stapleton, E. ve Volkman, L.E., 1998. Evidence That the Stilbene-Derived Optical Brightener M2R Enhances *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by Preventing Sloughing of Infected Midgut Epithelial Cells, Biological Control, 11, 58-69.
- Washburn, J.O., Kirkpatrick, B.A. ve Volkman, L.E., 1995. Comparative Pathogenesis of *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis Virus in Larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*, Virology, 209, 561-568.
- 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*, pp 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.
- Wolff, J.L.C., Moraes, R.H.P., Kitajima, E., Leal, E.S. ve Zanotto, P.M.A., 2002. Identification and Characterization of a Baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae), J. Invertebr. Pathol., 79, 137-145.
- Woo, S.D., 2001. Rapid Detection of Multiple Nucleopolyhedroviruses Using Polymerase Chain Reaction, Mol. Cells, 11, 334-340.
- 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.

Zhang, P., Yang, K., Dai, X., Pang, Y. ve Su, D., 2002. Infection of Wild-type *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Induces Apoptosis of *Spodoptera litura* Larvae, J. Gen. Virol., 83, 3003-3011.

Zirai M¼cadele Teknik Talimatları, 1995. T.C. Tarım ve K¼yiřleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel M¼d¼rl¼ę¼, Ankara.

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

24.04.1972 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlk öğrenimini Merkez Yalıncaak Köyü İlkokulunda 1983 yılında tamamladıktan sonra, orta okulu Atatürk Ortaokulunda 1986 ve liseyi de Trabzon Lisesinde 1988 yılında tamamladı. 1990 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü birincilikle kazandı. 1994 yılında aynı bölümden üniversite birincisi olarak mezun oldu ve biyolog unvanı aldı. Aynı yıl mezun olduğu bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Bu tarihten sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine de başladı. 1997 yılında yüksek lisans çalışmalarını tamamladı ve Yüksek Biyolog oldu. Aynı yıl açılan doktora sınavını kazanarak yine Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde doktora çalışmalarına başladı. Halen Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.