

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MALACOSOMA NEUSTRIA NÜKLEOPOLİHEDROVİRÜS (ManeNPV-T2)'ÜN
GENOM ORGANİZASYONU VE AC145 PROTEİNLERİNİN ORAL
ENFEKTİVİTE PROTEİNLERİYLE ETKİLEŞİMLERİ**

DOKTORA TEZİ

Dönüş GENÇER

**OCAK 2019
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs (ManeNPV-T2)’ün Genom Organizasyonu ve AC145 Proteinlerinin Oral Enfektivite Proteinleriyle Etkileşimleri” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “doktora” tezi olarak hazırlanmıştır. Bu tezde ilk defa Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs’ün komple genom analizi yapılmış ve AC145 proteinlerinin maya iki-hibrid sisteminde oral enfektiviteden sorumlu proteinlerle etkileşimi belirlenmiştir.

Tez süresince doktora tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İsmail DEMİR’e, tezin yönlendirilmesinde fikir vererek yardımcı olan tez izleme jürisi üyelerim sayın Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na ve Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Biyoloji Bölümü mikrobiyoloji grubu hocalarımdan, Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, Prof. Dr. Kazım SEZEN’e ve Dr. Öğr. Üyesi. Cihan İNAN’a, mikrobiyoloji laboratuvar çalışma grubu arkadaşlarımdan, Dr. Zeynep BAYRAMOĞLU’na, Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YAKUPOĞLU’na, Dr. Ardahan ESKİ’ye, Aydın YEŞİLYURT’a ve Ebru GÜNEY’e tezimin başarıyla tamamlanması için gerekli alt yapı imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına, teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince BİDEB Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı (2211-A) ile beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na teşekkür ediyorum.

Maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan, hayattaki en büyük moral ve sevgi kaynaklarım aileme ve bana her zaman destek olan ve desteğini hep yanımda bulduğum eşim Kemal Can GENÇER’e ve kızım Nehir GENÇER’e sonsuz teşekkür ederim.

Dönüş GENÇER
Trabzon 2019

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Malacosoma neustria n¼kleopolihedrovir¼s (ManeNPV-T2)’¼n Genom Organizasyonu ve AC145 Proteinlerinin Oral Enfektivite Proteinleriyle Etkileşimleri ” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma s¼recinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her t¼rl¼ yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 03/01/2019

Dönüş GENÇER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Bakülovirüsler.....	4
1.2.1. Baculoviridae Familyasının Genel Özellikleri.....	4
1.2.2. Bakülovirüslerin Taksonomisi ve Yapısı.....	5
1.2.3. Bakülovirüslerin Enfeksiyon Döngüsü	7
1.2.4. Bakülovirüslerde Genom Organizasyonu	9
1.2.5. DNA Replikasyonundan Sorumlu Genler.....	14
1.2.6. Transkripsiyondan Sorumlu Genler	19
1.2.7. Bakülovirüslerde Yapısal Proteinler	24
1.2.8. Bakülovirüslerde Yardımcı Genler	28
1.2.9. Hücresel Metabolizmayı Etkileyen Genler	28
1.2.10. Konak Böceğe Etki Eden Genler	29
1.2.11. Oral Enfektivite için Gerekli Olan Genler	31
1.3. Protein Etkileşimleri	35
1.3.1. Maya İki-Hibrid Sistemi	38
1.4. Çalışmanın Amacı.....	40
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	43
2.1. Komple Genom Analizi ile İlgili Çalışmalar	43
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Virüs ve Böcek Larvaları	43
2.1.2. Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs'ünün Çoğaltılması.....	43

2.1.3.	ManeNPV-T2 Gömülü Yapıların Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini	44
2.1.4.	ManeNPV-T2'den Viral DNA Ekstraksiyonu	44
2.1.5.	ManeNPV-T2 Komple Genom Dizi Analizi ve Verilerin Toplanması	46
2.1.6.	Açık Okuma Zincirlerinin (ORF) Belirlenmesi	47
2.1.7.	Homolog Tekrar Bölgelerinin (hrs) Belirlenmesi	47
2.1.8.	Gen Dizilerinin Dağılıımı (Gene Parity-Plots)	47
2.1.9.	Fonksiyonel Genlerin Tespiti.....	48
2.1.10.	Filogenetik Analiz.....	48
2.2.	Maya İki-Hibrid Sisteminde Etkileşim Deneyleri	48
2.2.1.	ManeNPV-T2'ye Ait Oral Enfektivite Genleri.....	48
2.2.2.	Primer Tasarımı.....	49
2.2.3.	Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması	51
2.2.4.	ManeNPV-T2'ye Ait <i>ac145</i> ve Oral Enfektiviteden Sorumlu Genlerin PCR ile çoğaltılması ve Ara Vektör pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	51
2.2.5.	Oral Enfektiviteden Sorumlu Genlerin ve <i>ac145</i> genlerinin <i>Av</i> ve <i>Yem</i> Vektörlerine Klonlanması	52
2.2.6.	Maya Hücrelerinden Kompotent Hazırlanması	53
2.2.7.	<i>ac145</i> Genlerini İçeren <i>Yem</i> Vektörlerinin Kompotent Maya Hücrelerine Transformasyonu.....	53
2.2.8.	<i>Av</i> Vektörlerinin <i>Yem</i> Vektörlerini İçeren Maya Hücrelerine Transformasyonu	54
2.2.9.	pGBK-T7 Vektörlerini İçeren (<i>ac145-1</i> , <i>ac145-2</i>) Mayalardan Protein İzolasyonu.....	55
2.2.10.	<i>Yem</i> Proteinlerinin Western Blot Analizi	55
2.2.11.	Etkileşimlerin Pull-Down Analiziyle Teyit Edilmesi	56
2.2.12.	Proteinlerin Bakteriyel Sistemde İfadesi.....	57
2.2.13.	GST-Pull-Down Analizi ile Etkileşen Proteinlerin Tespiti.....	57
3.	BULGULAR	59
3.1.	ManeNPV-T2 Genom Analizi ile İlgili alışmalar	59
3.1.1.	Virüsün oğaltılması ve Konsantrasyon Tayini	59
3.1.2.	ManeNPV-T2 Genomunun Ham Veri İstatistikleri	61
3.1.3.	ManeNPV-T2 Genomunun Dizilenmesinin Kalite Kontrolü	61
3.1.4.	ManeNPV-T2 Genomunun zellikleri	63
3.1.5.	ManeNPV-T2 Genomunun Gen İçeriği	73
3.1.6.	ManeNPV-T2 Genomunun Filogenetik Karakterizasyonu.....	78

3.1.7.	ManeNPV-T2 Genomunun Gen Dağılım Analizi (Gene parity-plot)	80
3.2.	<i>ac145</i> Genlerinin Maya İki-Hibrid Sisteminde Etkileşim Deneyleri.....	81
3.2.1.	<i>Av</i> ve <i>Yem</i> Vektörleri için Primerlerin Tasarımı	81
3.2.2.	Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması	82
3.2.3.	Genlerin Transfer Vektörüne Klonlanmaları	83
3.2.4.	Genlerin <i>Av</i> Vektörlerine Klonlanmaları	83
3.2.5.	<i>ac145</i> genlerinin <i>Yem</i> Vektörüne Klonlanması ve Maya Hücrelerinde İfade Edilmesi	84
3.2.6.	<i>ac145</i> Genlerinin Oral Enfektiviteden Sorumlu Genlerle Maya İki-Hibrid Sisteminde Etkileşimlerinin Belirlenmesi	86
3.2.7.	Pull-Down Analizi ile Doğrulama	87
4.	TARTIŞMA	89
5.	SONUÇLAR	97
6.	ÖNERİLER	99
7.	KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

MALACOSOMA NEUSTRIA NÜKLEOPOLİHEDROVİRÜS (ManeNPV-T2)'ÜN GENOM ORGANİZASYONU VE AC145 PROTEİNLERİNİN ORAL ENFEKTİVİTE PROTEİNLERİYLE ETKİLEŞİMLERİ

Dönüş GENÇER

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. İsmail DEMİR
2019, 118 sayfa

Bu çalışmada, *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs T2 (ManeNPV-T2) izolatının komple genom haritası çıkarıldı, genom organizasyonu belirlendi ve diğer bakülovirüs genomlarıyla karşılaştırıldı. Çalışmalar sonunda, ManeNPV-T2 genomunun, % 38.2 G + C'lik bir nükleotid dağılımıyla 130.202 bp büyüklüğünde, dairesel çift sarmallı bir DNA molekülü olduğu belirlendi. ManeNPV-T2'nin toplam genom dizisi NCBI GenBank'a, KY968317 erişim numarası ile kaydedildi. ManeNPV-T2, 38 kor genin aminoasit sekanslarının birleştirilmesi ile çizilen filogenetik ağaçta Grup II Alfabakülovirüslerin bulunduğu kısımda dallanma gösterdi. Genomun, kodlama kapasitesi 50 aminoasitin üstünde 131 ORF içerdiği ve bu ORF'lerden 104'ünün diğer Lepidopteran nükleopolihedrovirüslerle ortak olduğu tespit edildi. ManeNPV-T2'nin genomunda, bakülovirüslere özgü 14, *Malacosoma NPV* türlerine özgü 7 ve ManeNPV-T2'ye özgü 6 olmak üzere fonksiyonu belli olmayan toplam 27 ORF belirlendi. Buna ilave olarak, ManeNPV-T2 genomunda 52 tekrarlı, 11 adet homolog tekrar bölgesi (hrs) belirlendi. ManeNPV-T2 genomunda *bro* genlerinin (ORF93, 94) 2 adet olduğu tespit edildi. *chaB* (ORF 45, 46), *nikotinamid ribozid kinaz 1* (ORF 94, 95) ve *ac145* (ORF 12, 50) genlerinin çoklu kopyalar halinde olduğu gözlemlendi. ManeNPV-T2 AC145 proteininin, oral enfektiviteden sorumlu proteinlerin oluşturduğu komplekste rol alabileceği hipotezi maya iki-hibrid sistemi kullanılarak doğrulandı. Bu çalışmada, ManeNPV'nin ilk kez komple genom dizi analizi yapıldı. Virüse ait gen yapı ve genom organizasyonu detaylı çalışıldı. Bu bilgilerden hareketle yeni çalışmaların planlanması fırsatları da ortaya çıkarıldı.

Anahtar Sözcükler: Komple genom, *Malacosoma neustria NPV* izolatı, hrs, AC145

PhD. Thesis

SUMMARY

GENOME ORGANIZATION OF MALACOSOMA NEUSTRIA
NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (ManeNPV-T2) AND INTERACTIONS OF AC145
PROTEINS WITH ORAL INFECTIVITY PROTEINS

Dönüş GENÇER

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. İsmail DEMİR
2019, 118 pages

In this study, complete genome map of the ManeNPV-T2 isolate was extracted, genome organization was determined and compared with other baculovirus genomes. At the end of the studies, ManeNPV-T2 genome was determined to be a circular double stranded DNA molecule of 130.202 bp with a nucleotide distribution of 38.2% G + C. The total genome sequence of ManeNPV-T2 in the NCBI GenBank can be accessed by accession number KY968317. ManeNPV-T2 showed branching at the part of Group II Alphabaculoviruses in the phylogenetic tree drawn by concatenated amino acid sequences of the 38 core genes. It was found that the genome contained 131 ORFs above 50 amino acids, and 104 of these ORFs were common to other Lepidopteran nucleopolyedroviruses. Totally 27 ORFs, with unknown function, determined at ManeNPV-T2 genome of which 14 specific to baculoviruses, 7 specific to Malacosoma NPV species and 6 specific to ManeNPV-T2 itself. Additionally, 11 homologous repeat regions (hrs) with 52 replicates were determined in the ManeNPV-T2 genome. Two *bro* genes were identified in the ManeNPV-T2 genome. *chaB* (ORF 45, 46), *nicotinamide riboside kinase 1* (ORF 94, 95), and *ac145* (ORF 12, 50) genes were found as multiple copies in the ManeNPV-T2 genome. The hypothesis that the AC145 protein of ManeNPV-T2 could play a role in the complex of oral infectivity proteins was confirmed using yeast two-hybrid system. In this study, the first genome sequence analysis of ManeNPV was performed. Viral gene structure and genome organization were studied in detail. Based on this information, opportunities for planning new studies were also revealed.

Keywords: Complete genome, Malacosoma neustria NPV isolate, hrs, AC145

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bakülovirüslerin morfolojisi	7
Şekil 2. Bakülovirüs hayat döngüsü	9
Şekil 3. ODV giriş kompleksinin modeli	34
Şekil 4. Klasik maya iki-hibrid sistemi	39
Şekil 5. Çoğaltılan OB'lerin makroskobik ve mikroskobik kontrolü	59
Şekil 6. Dizileme analizi için kullanılan DNA	60
Şekil 7. Ham dizilerin baz okumalarının FastQC kontrolü	62
Şekil 8. Phred kalite kontrol puanı örnekleri	62
Şekil 9. ManeNPV-T2 genomunun dairesel haritası	64
Şekil 10. Bakülovirüs kor genlerinin aminoasit sekanslarına dayanan filogenetik ağaç	79
Şekil 11. ManeNPV-T2'nin AcMNPV, TniSNPV, HaNPV, UrprNPV ve CpGV genomları ile karşılaştırmalı gen dağılım analizi	80
Şekil 12. ManeNPV-T2'ye ait oral enfektiviteden sorumlu genler ve muhtemel oral enfektivite genleri	81
Şekil 13. ManeNPV-T2'ye ait 11 ORF'nin PCR jel görüntüleri	82
Şekil 14. Genlerin pGEM-T Easy ara vektörüne klonlandığının doğrulanması	83
Şekil 15. Genlerin pGAD-T7 vektörüne klonlandığının doğrulanması	84
Şekil 16. <i>ac145-1</i> ve <i>ac145-2</i> genlerinin pGBK-T7 vektörüne klonlanması	85
Şekil 17. AC145-1 ve AC145-2 proteinlerinin Western blot hibridizasyon sonucu	85
Şekil 18. Maya iki-hibrid sisteminde kullanılan kompetent hücreler ve belirlenen etkileşimler	86
Şekil 19. Maya iki-hibrid sistemi kullanılarak AC145-1 ve AC145-2 proteinlerinin birbirleriyle ve oral enfektivite proteinleriyle belirlenen protein etkileşimlerinin şematik gösterimi	87
Şekil 20. pGEX-2T PIF 6 ve PIF 8'in büyüklüğü	88
Şekil 21. Pull-down analizi ile AC145-1'in PIF 6 ve PIF 8 ile etkileşiminin doğrulanması	88

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bakülovirüslerin kullanıldığı çalışma alanları	5
Tablo 2. Enfekte ettiği konağa göre Baculoviridae familyasına ait cinsler.....	6
Tablo 3. Bakülovirüslerde bulunan genlerin sınıflandırılması	11
Tablo 4. Bakülovirüs kor genleri ve fonksiyonları	12
Tablo 5. AcMNPV’de tespit edilen PIF’ler	32
Tablo 6. PIF kompleksindeki bileşenlerin protein-protein etkileşimleri için Y2H testi sonuçları	34
Tablo 7. Protein-protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan metotlar.....	37
Tablo 8. Maya iki-hibrid sisteminde etkileşim için kullanılacak primerlerin listesi	50
Tablo 9. ManeNPV-T2 DNA’sının firma tarafından belirlenen sonuçları	60
Tablo 10. ManeNPV-T2 genomuna ait işlenmemiş veriler	61
Tablo 11. Phred kalite kontrol puanlarının hata oranları.....	63
Tablo 12. ManeNPV-T2 genomunda tanımlanan ORF’ler	66
Tablo 13. ManeNPV-T2 genomunda bulunan genler ve fonksiyonları	75
Tablo 14. Homolog bölgelerin (hrs) palindromik tekrarları.....	76
Tablo 15. Bazı Alfabakülovirüslerin genom boyutları ve %G+C oranları	90

SEMBOLLER DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
ssDNA	: Tek zincir DNA
dsDNA	: Çift zincir DNA
ddH ₂ O	: İki kere damıtılmış su
dUTP	: Deoksiüridin trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMSA	: Elektroforetik mobiliti shift assay
hrs	: Homolog tekrar bölgeleri
IAP	: Apoptoz inhibitör proteinleri
ICTV	: Virüs taksonomisi uluslararası komitesi
INM	: İç nükleer membran
kDa	: Kilodalton
bp	: Baz çifti
kbp	: Kilobaz çifti
M	: Molar
mg	: Miligram
ng	: Nanogram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogran
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: H iyon konsantrasyonu
PPI	: Protein-protein etkileşimleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
SSB	: Tek zincirli bir DNA bağlanma proteini
TF	: Transkripsiyon faktörü
vd.	: ve diğerleri

Y2H	: Maya iki-hibrit
WGS	: Tüm genom dizileme
μ l	: Mikrolitre
QC	: Kalite kontrolü
G+C	: Guanin+Sitozin
aa	: Aminoasit
dk	: Dakika
sn	: Saniye
ESCRT	: Taşıma için Gerekli Endozomal Sıralama Kompleksi
Na_2CO_3	: Sodyum bi karbonat
NaCl	: Sodyeum klorür
TE	: Tris-EDTA
OD260	: Optik yoğunluk 260
OD280	: Optik yoğunluk 280
ORF	: Açık okuma dizisi
PBS	: Fosfat-tampon salin
GST	: Glutation S transferaz
pGAD-T7	: Maya plazmidi
pGBK-T7	: Maya plazmidi
pGEM-T	: Klonlama vektörü
JM101	: <i>E. coli</i> suşu
PMSF	: Fenilmetan sulfonil florid
pGEX-2T	: GST füzyon vektörü
IgG	: İmmünoglobülin G
pet28-a	: Ekspresyon vektörü
HA	: Hemaglutinin
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Böcek virüsleri, yalnızca konak böceklerde çoğalabilen ve hastalık yapabilen biyolojik etmenlerdir. Günümüze kadar birçok böcek virüsü tespit edilmiştir. Dünyada hızla yayılan böcek popülasyonlarıyla mücadelede kullanılacak ajanların elde edilmesinde, besin maddesi olarak gerekli olan bazı proteinlerin üretilmesinde ve birçok genin moleküler seviyede karakterize edilmesinde, günümüzde kabul gören ve etkili bir şekilde sonuçlanan biyoteknolojik araştırmalarda böcek virüsleri kullanılmaktadır. Bu virüsler, çeşitli entegre zararlı yönetim programlarında etkili olarak, zararlı böceklerle mücadelede güvenli, etkili ve sürdürülebilir imkanlar sağlamaktadır. En yaygın ve etkili böcek virüsü, dünya çapında 600'den fazla böcek türünü enfekte ettiği bilinen bakülovirüslerdir (Rohrman, 2013). Bakülovirüsler, diğer böcek virüslerinde olduğu gibi çeşitli tarım ve orman ürünlerini veya insan sağlığını tehdit eden zararlı böceklerle mücadelede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu özelliğinden dolayı bakülovirüsler tarım ve ormancılıkta zararlı böceklerle mücadelede kullanılan önemli biyolojik mücadele materyali haline gelmiştir (Flexner ve Belnavis, 2000; Harrison ve Bonning, 2000). Buna ilave olarak, bakülovirüsler böcek hücrelerinde rekombinant proteinlerin üretilmesi için etkili ekspresyon sistemleri ve ayrıca gen terapisi için ümit vaat eden vektörler olarak önem taşımaktadır (Possee, 1997; Summers, 2006). Bu uygulamalar bakülovirüslerin biyoteknolojik değerlerini arttırarak bunları önemli çalışma materyali haline getirmiştir. Bugüne kadar, izole edilen virüslerin klasik tanımlanmalarının yanı sıra bunlardan 80 tanesinin komple genom dizi analizleri de yapılmıştır (URL-1, 2018; Wang vd., 2018). Bakülovirüs genomları, 80-180 kbp arasında değişen dairesel ve çift iplikli DNA'dan oluşur (Lauzon vd., 2004; Hayakawa vd., 1999). Filogenetik analizlere dayanarak, Baculoviridae ailesi dört cins olarak sınıflandırılır: Alfabakülovirüs (Lepidopteran-spesifik nükleopolihedrovirüsler/NPV'ler), Betabakülovirüs (Lepidopteran-spesifik granülovirüsler/GV'ler), Gamabakülovirüs (Hymenopteran-spesifik NPV'ler) ve Deltabakülovirüs (Dipteran-spesifik NPV'ler) (Jehle vd., 2006; Carstens ve Ball, 2008).

Bakülovirüslerin genom analizleri, virüs sınıflandırması, gen fonksiyonu tanımlama ve insektisit geliştirme çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda,

bakülovirüslerin konakçalarına adaptasyonları sürecinde genomik değişikliklerle ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır. Yeni nesil dizileme (NGS) olarak bilinen büyük ölçekli paralel sıralama teknolojisi, biyolojik bilimlerde devrim yaratmıştır. Ultra yüksek verim, ölçeklenebilirlik ve yüksek hız sayesinde NGS, araştırmacıların çok çeşitli uygulamalar yapmasına ve biyolojik sistemlerin mümkün olan en kısa sürede incelenmesine olanak sağlar. Günümüzün karmaşık genomik araştırmalarıyla ilgili veriler, geleneksel DNA sıralama teknolojilerinin kapasitesinin ötesinde bir bilgi derinliğine ihtiyaç duymaktadır. Yeni nesil dizileme, bu boşluğu doldurmuştur ve bu soruları ele almak için günlük bir araştırma aracı haline gelmiştir. Kapiller elektroforez tabanlı Sanger dizilişini kullanarak, İnsan Genom Projesi 10 yılı aşkın bir sürede çalışıldı ve yaklaşık maliyeti 3 milyar dolar oldu (Hood ve Rowen, 2013). Yeni nesil dizileme, tam tersine, büyük ölçekli tüm genom dizileme (WGS)'yi araştırmacı için erişilebilir ve pratik hale getirmektedir. Yeni nesil dizileme sistemlerinden biri olan Illumina HiSeq, kanser araştırmalarından tarıma kadar uzanan alanlarda genetik varyasyon ve fonksiyon analizi için sıralama ve dizi tabanlı çözümler getirmektedir.

Bakülovirüslerin hepsinde korunmuş olarak bulunan 38 kor gen vardır (Garavaglia vd., 2012; Javed vd., 2017). Kor genler olmadan bakülovirüsler varlıklarını idame ettiremezler. Bu genlerin, aminoasit (aa) dizilerinin birbiri ardına yerleştirilerek çizilen filogenetik ağaçlar sayesinde virüsler arasındaki yakınlık dereceleri belirlenir. Bu genlerin içinde oral enfektiviteden sorumlu olduğu düşünülen bazı genler de (*pif 0-pif 8*) vardır. *ac145* geninin de oral yolla enfeksiyondan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Rohrman, 2013).

Son zamanlarda, bazı virüslerin protein bileşimleri proteomik çalışmalarla belirlenmiştir (Braunagel vd., 2003; Deng vd., 2007; Perera vd., 2007; Wu vd., 2008). Bu çalışmalar, gömülü yapısı uzaklaştırılmış virüsler (ODV)'in 20-41 arasında bir dizi protein içerdiğini ve ODV inşası ve yapısının tahmini için yararlı bilgiler sağladığını göstermiştir. ODV topluluğunun, bir dizi protein-DNA ve protein-protein etkileşimini içeren viral DNA paketleme, nükleokapsidin düzenlenmesi ve ODV kılıfı dahil olmak üzere karmaşık ve hassas bir şekilde organize edilmiş bir işlem olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle, viral proteinler arasındaki etkileşimlerin tanımlanması, virüsün oluşumunun ve virüs enfeksiyonunun moleküler mekanizmalarının yorumlanmasında çok faydalı olmaktadır. Protein etkileşimlerinin belirlenmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır: Maya iki-hibrid sistemi, memeli iki-hibrid sistemi, protein mikroarray, faj görüntüleme, afinite

kromotografisi, kütle spektrometresi, pull-down analizi (çöktürme), ko-immunopresipitasyon (immünçökeltme), kolokalizasyon/FRET/BRET (floresan rezonans enerji transferi), çapraz bağlanma (kross-linking), analitik ultrasantrifügasyon, immunofloresan/konfokal mikroskopi ve elektroforetik hareket kayma deneyi (mobiliti shift assay, EMSA). Bunlar arasında böcek virüslerinin protein etkileşimlerinin araştırılmasında maya iki-hibrid sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Maya iki-hibrid (Y2H) tekniği canlı maya hücrelerinde protein etkileşimlerinin yüksek verimli bir şekilde belirlenmesine izin verir (Fields ve Song, 1989). Doksanlı yılların başından beri maya iki-hibrid sisteminin gelişmesi ve kademeli olarak iyileştirilmesi, protein etkileşimlerinin tespit edilebilme yolunda devrim yaratmıştır. Maya iki-hibrid, iki protein veya ilgilenilen polipeptitler etkileştiğinde fonksiyonel bir transkripsiyon faktörünün yeniden oluşturulmasına dayanır. Bu olay genetik olarak değiştirilmiş maya suşlarında gerçekleşir. Burada bir raportör genin transkripsiyonu belirli bir fenotipe yol açar ve genellikle seçici bir ortamda büyüme veya maya kolonilerinin renginde değişimle sonuçlanır. Bu sistem günümüze kadar birçok kez kullanılmış ve çeşitli proteinler arasındaki etkileşim haritaları bu şekilde oluşturulmuştur (Friedel ve Haas, 2011; Grigoriev 2003; Peng vd., 2010).

Yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* L., Lepidoptera: Lasiocampidae) elma, armut, erik, meşe, karaağaç, söğüt, kavak gibi çeşitli ağaçların ve gül gibi dikenli bitkilerin kurumasına neden olan Türkiye'nin kuzey doğusunda bulunan önemli bir tarım zararlısıdır. *Malacosoma neustria*'nın viral patojenlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda zararlının Gümüşhane ve Samsun popülasyonlarından nükleopolihedrovirüs izolasyonu yapılmış ve bu izolatların biyolojik özellikleri belirlenmiştir (Demir vd., 2013; 2014; Gencer vd., yayınlanmamış veri).

1.2. Bakülovirüsler

1.2.1. Baculoviridae Familyasının Genel Özellikleri

Bakülovirüsler, tüm-başkalaşım geçiren (holometabolous) böcekler başta olmak üzere artropodları enfekte eder. Günümüzde bakülovirüslerdeki muazzam çeşitliliği yansıtan Lepidoptera, Diptera ve Hymenoptera takımına ait böcek türlerinde 600'den fazla farklı bakülovirüs hastalıkları tanımlanmıştır (Slack ve Arif, 2007). Bazı üyelerinin de Orthoptera, Coleoptera, Neuroptera, Tysanura ve Trichoptera takımlarını enfekte ettiği tespit edilmiştir. Fakat, gömülü yapılardan (OB) yoksun olmasından dolayı bunlar, geçici olarak Nudivirüs olarak isimlendirilmiştir (Wang ve Jehle, 2009). Bakülovirüslerin çoğu Lepidoptera takımındaki kelebekler ve güvelerden izole edilmiştir (Cory ve Myers, 2003).

Bakülovirüsler, kelebek ve güve larvalarını kontrol etme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle faydalı virüslerdir. Bu larvalar genellikle tarımsal açıdan önemli bitkilere, süs bitkilerine ve orman ağaçlarına zarar vererek ciddi hasarlara neden olurlar. Biyopestisitler olarak etkinliklerini ve güvenliğini iyileştirmek için yapılan araştırmalarla birlikte, bakülovirüsler mikrobiyal insektisitler, protein ekspresyon vektörleri, epitop görüntüleme platformları ve gen terapi vektörleri olarak kullanılır (Tablo 1) (Vlak ve Keus, 1990). Gen terapi vektörleri olarak kullanılan bakülovirüsler aracılığıyla memeli hücrelere gen transferi yapılabilmektedir. Endüstri, tarım, sağlık ve ekonomik alanlarda öneme sahip birçok protein, bakülovirüslerden geliştirilen ekspresyon sistemlerinde büyük ölçeklerde üretilmekte ve biyoteknolojideki çalışmalara katkı sağlamaktadır (Beljelarskaya, 2002). Ayrıca bakülovirüsler, gen yapısı ve organizasyonu bakımından ökaryotik hücrelere benzediği için moleküler biyoloji çalışmaları için model organizmalar olarak kullanılırlar (Blissard ve Rohrmann, 1990).

Tablo 1. Bakülovirüslerin kullanıldığı çalışma alanları

	Kullanılan alan	Kullanım şekli
Bakülovirüs'ler	Biyolojik mücadele	Tarım ve orman zararlısı çeşitli böceklerin mücadelesinde
	Gen ekspresyonu	Endüstri, tarım, sağlık ve ekonomik alanlarda öneme sahip birçok proteinin üretilmesinde
	Gen tedavisi	Kusurlu gen işlevlerinin giderilerek hastalıkların tedavisinde gen tedavi vektörü olarak
	Moleküler biyoloji	Gen yapısı ve organizasyonları nedeniyle ökaryot hücrelerin çalışılmasında model organizma

1.2.2. Bakülovirüslerin Taksonomisi ve Yapısı

Bakülovirüsler, enfekte olmuş hücrelerde protein yapısındaki oklüzyon cisimcikleri (OB'ler) oluşturma kabiliyetleri ile karakterize edilen büyük, heliks kapsidli, çift iplikli DNA virüslerinin bir ailesidir (Baculoviridae). Bakülovirüsler, taksonomik olarak, farklı OB morfolojisine dayanan Nükleopolihedrovirüs (NPV) ve Granülovirüs (GV) cinslerine ayrılmıştır (Blissard vd., 2000). Genom dizisi analizlerinden elde edilen son kanıtlar, Baculoviridae ailesinin taksonomisi ve sınıflandırmasının önemli bir revizyonunu gerektirmiştir. Bakülovirüslerin genomik karşılaştırmaları ile sınıflandırılmaları, morfolojik özelliklerinden çok konukçuyla ilişkilidir. Baculoviridae ailesi, 38 kor genin aminoasit dizilerinin peşpeşe birleştirilmesiyle oluşturulan filogenisine, konak türlerinin çeşitliliğine, karakteristik OB'lerinin içinde gömülü virionların paketlenme şekline göre 4 cinsi içermektedir (Tablo 2) (Herniou ve Jehle, 2007; Jehle vd., 2006).

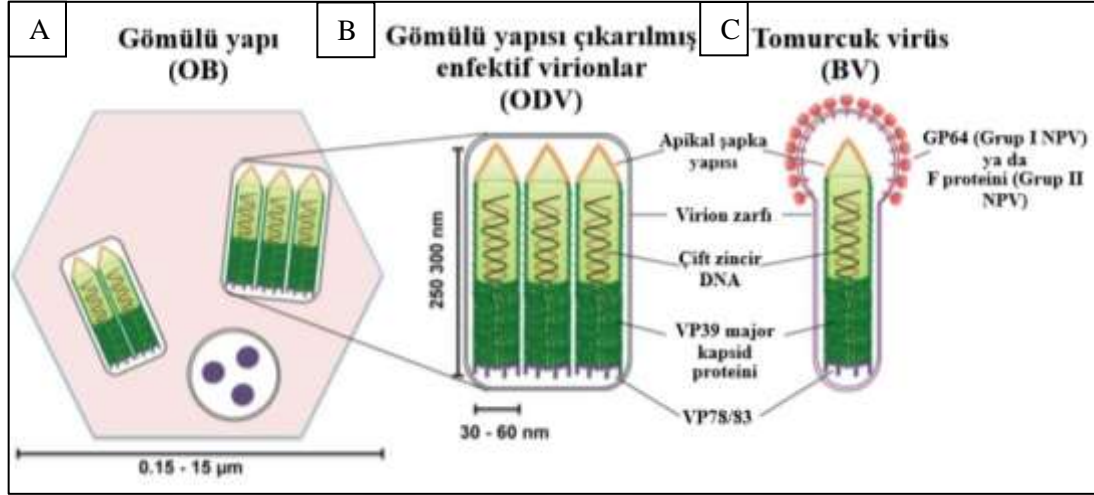
Tablo 2. Enfekte ettiği konağa göre Baculoviridae familyasına ait cinsler

Baculoviridae familyasına ait cins adı	Enfekte ettiği konak		Virüs Adı
Alfabakülovirüsler	Lepidoptera	(Pulkanatlılar, kelebekler ve güveler)	NPV
Betabakülovirüsler	Lepidoptera	(Pulkanatlılar, kelebekler ve güveler)	GV
Gamabakülovirüsler	Hymenoptera	(Zarkanatlılar, arılar)	NPV
Deltabakülovirüsler	Diptera	(Çiftkanatlılar, sinekler)	NPV

Alfabakülovirüsler de kendi içerisinde filogenetik analize dayanan iki gruba ayrılmıştır: Grup I NPV ve Grup II NPV (Zanotto vd., 1993). Bu iki grup, gen içeriği bakımından önemli ölçüde farklıdır. Özellikle Grup I NPV'leri, tomurcuklanan virüs (BV) füzyon proteini olan viral zarf glikoproteini GP64'ü içerirken, Grup II NPV'ler GP64'den yoksundur. Grup II NPV'ler, Betabakülovirüsler ve Gamabakülovirüslerde olduğu gibi F proteinine sahiptirler (Pearson ve Rohrmann, 2002).

NPV'lerin dış yapısında polihedrin proteini bulunurken, GV'lerde ise granülün proteini yer almaktadır. NPV'ler, çok sayıda virion içeren polihedron olarak adlandırılan polihedron-şekilli OB'leri (0.15-15 µm arasında değişen büyüklükte) üretirken, GV'ler normalde tek bir virion içeren granüller olarak adlandırılan daha küçük (yaklaşık 0.3 x 0.5 µm) oval şekilli OB'lere sahiptir. Bunlar gömülü yapısı uzaklaştırılmış virüs (ODV) olarak adlandırılır ve ODV'ler yıllarca hayatta kalabilir (Theilmann vd., 2005; Krell, 2008). Bakülovirüs virionu, ayrı bir yapısal polariteye sahip olan ve bir zarfın içinde bulunan bir veya daha fazla çubuk şekilli nükleokapsidden (çap olarak 30-60 nm ve 250-300 nm uzunluğunda) oluşur. Bakülovirüs adı (baculum: çubuk) bu çubuk şekilli nükleokapsidlerden gelmektedir. Nükleokapsidler yaklaşık 80-180 kbp boyutundaki tek bir dairesel viral DNA molekülünden oluşur. NPV'ler, oklüzyon virionda paketlenmiş potansiyel nükleokapsid sayısına (NC) bağlı olarak tek (single=S) veya çoklu (multiple=M) olarak tanımlanır. Bu farklılaşma, NPV'lerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu morfoloğilerin biyolojik önemi açık değildir. OB'lerde bulunan

virionların yanı sıra, bakülovirüsler genellikle tomurcuklanan virüs (BV) olarak bilinen ikinci tip bir virion üretirler (Şekil 1).



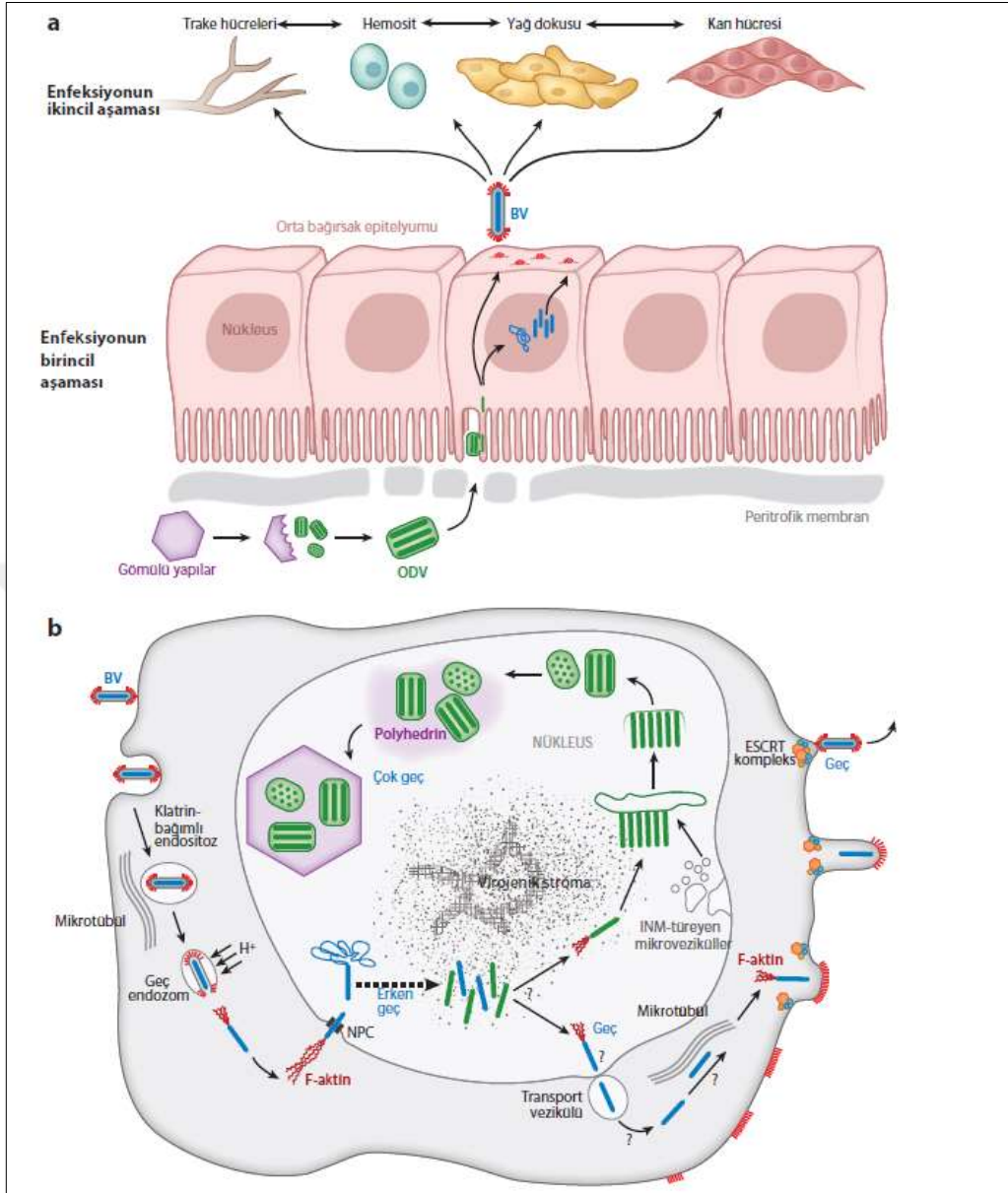
Şekil 1. Bakülovirüslerin morfolojisi. . A: Gömülü yapı (OB); B: Gömülü yapısı çıkarılmış enfektif virion (ODV); C: Tomurcuklanan virus (BV)

1.2.3. Bakülovirüslerin Enfeksiyon Döngüsü

Doğada, NPV'ler genellikle bitki yüzeylerinde ve toprakta kararlı polihedralar şeklinde bulunur. NPV enfeksiyonu böcek larvaları tarafından polihedra alımı ile başlar. Yutulduğunda, OB'ler larva orta bağırsağının alkali ortamında gömülü yapısı çıkarılmış (ODV) enfektif virüsleri serbest bırakarak çözünmektedir. ODV virion zarfı ile orta bağırsak epitelial hücrelerinin mikrovillusları arasında doğrudan membran füzyonu meydana gelir. Füzyondan sonra virionlar soyularak gen ekspresyonunun, DNA replikasyonunun ve yavru (progen) NC birleşmesinin meydana geldiği çekirdeğe nakledilir (Şekil 2) (Granados, 1978; Granados ve Lawler, 1981; Horton ve Burand, 1993). Yavru NC'ler, enfeksiyondan 8 saat sonra, enfeksiyon sürecinde genişlemiş çekirdekte ortaya çıkan, yoğun bir virojenik stroma içerisinde toplanırlar. Yeni birleşen NC'ler, daha sonra epitel hücresinin bazal tarafındaki virojenik stromadan plazma membranına doğru geç ederler. Grup I NPV'lerin enfeksiyonu sırasında, viral kodlanmış esas zarf glikoproteini (GP64) sentezlenir ve plazma membranına aktarılır (Blissard ve Rohrmann, 1990; Oomens vd., 1995). Group II NPV'ler içinse GP64 proteini yerine füzyon proteini (F protein) sentezlenir (Rohrmann, 2013). Tek bir NC, epitelial hücrelerin bazal tarafından hemolenfe

geçerken GP64 proteinini içeren gevşek yapışkan hücre plazma membranından zarfını elde eder. Bu protein verimli tomurcuklanma için gereklidir (Monsma vd., 1996; Oomens ve Blissard, 1999). İkinci virion fenotipi, “tomurcuklanmış virüs” (BV) olarak adlandırılır ve sistemik enfeksiyon için gerekli olduğu bilinmektedir. Virüsün orta bağırsaktan diğer dokulara (yağ dokusu, kas, trake, hemositler, epitel hücreleri) hareketine aracılık eder ve enfekte hayvan içindeki hücelere enfeksiyonu yayar (Flipsen, 1995; Washburn vd., 2003). Enfeksiyonun bu ikincil evresindeki diğer dokuların enfeksiyonu, böcekteki enfeksiyonun daha da yayıldığı ek BV’lerin oluşmasıyla sonuçlanır. ODV ve OB’ler, tüm hücre tiplerinde üretilir ve daha sonra hücreler parçalandığında böceğin sıvılaşmasıyla salınarak yayılır (Şekil 2a).

BV’nin tutunması ve BV’nin tutunmasını sağlayacak reseptörlerin bulunduğu klattrin aracılı endositoz ile hücreye girişin ardından, muhtemelen endozomlar, mikrotübüller boyunca nakledilir ve endozomun asitleştirilmesi üzerine NC (mavi) serbest kalır. Sitoplazmada NC’nin taşınmasını ve nüklear gözenekten içeri geçişinde rol oynayan protein kompleksi olan Arp2/3 ile virüslerde bulunan P78/83 proteininin birlikte çalışmasıyla, sitoplazmada NC’nin taşınması ve nüklear gözenekten nükleusa geçiş için bir itici güç sağlayan aktin polimerizasyonunun başlaması sağlanır. Çekirdekte, NC açılması viral gen ekspresyonu, DNA replikasyonu ve virojenik stromada yavru NC’lerin (mavi ve yeşil) oluşumu ile sonuçlanır. Yavru NC’lerin bazıları, çekirdekten çıkış (mavi) için ve diğerleri de ODV üretimi (yeşil) için etiketlenmiştir. Nükleustan çıkan NC’ler, sitoplazmik veziküllerde (transport veziküller) görülür ve daha sonra bu veziküllerin sitoplazmada NC’leri salgıladığı görülmektedir. NC’lerin plazma membranına taşınması mikrotübülleri, aktin polimerizasyonunu veya her ikisini de içerebilir. ESCRT metabolik yol proteinleri, çekirdekten çıkış aşamasında, plazma zarından tomurcuklanmada veya her ikisiyle de ilişkilidir. ODV’ler haline gelen NC’ler, nihayetinde OB proteini (polihedrin) tarafından paketlenmiş olan ODV’leri oluşturmak için iç nüklear membrandan (INM) türetilen zarlarla etkileşirler (Şekil 2b) (Blissard ve Theilman, 2018). Zarflanan ODV’ler OB olarak isimlendirilir ve hücrenin parçalanmasıyla beraber doğal ortama salınır. Doğal ortamda OB’ler diğer böcekleri enfekte edebilirler ve OB’ler yıllarca bozulmadan doğada kalabilirler.



Şekil 2. Bakülovirüs hayat döngüsü. (a) Bakülovirüs virion fenotipleri ve konukçu dokuların enfeksiyonundaki rolleri. Diyagram, enfeksiyonun birincil ve ikincil aşamalarını göstermektedir. (b) Konağın orta bağırsağının dışındaki hücrelerde bakülovirüslerin girişi, replikasyonu ve salınımı. Diyagram, Alfabakülovirüs BV ile viral replikasyon, BV ve ODV üretimini göstermektedir (Blissard ve Theilman, 2018).

1.2.4. Bakülovirüslerde Genom Organizasyonu

Bakülovirüsler, 90-180 arası kodlama yapan gene sahip büyük (80-180 kbp), dairesel çift iplikli DNA genomu içeren çubuk şeklinde zarflı virionlar ile karakterize edilir (Rohrmann, 2013, Van Oers ve Vlak, 2007). Günümüze kadar 80 adet bakülovirüsün

komple genom dizi analizi tamamlanmıştır. Bu genomlardan 50 tanesi Lepidopteran konakçılara ait bakülovirüslere (Alfabakülovirüslerin), 26 tanesi Betabakülovirüslere, 3 tanesi Gamabakülovirüslere ve 1 tanesi de Deltabakülovirüse aittir (URL-1, 2018). Bu bilgi ile genom yapısı ve gen içeriğinin genel kalıpları ortaya çıkmıştır.

Komple genomu yapılan bakülovirüsler karşılaştırıldığında, tüm gen çeşitliliğinin 895 genden fazla olduğu görülmüştür. Bu durum aslında bakülovirüslerde bulunan gen sayısı içeriğiyle tezat göstermektedir. Bakülovirüs ailelerinin gen sayısı 90 ile 180 gen arasında değişmektedir. Alfabakülovirüslerde 118-169, Betabakülovirüslerde 116-181, Gamabakülovirüslerde 90-93 ve Deltabakülovirüslerde 109 gen bulunduğu belirlenmiştir. Kor genler bu genlerin yalnızca %5'ni kapsamaktadır. Bu ilginç biyolojik özellik, büyük DNA genomları ile virüslerin makroevriminde yapısal mutasyonların önemini vurgulayan hipotezi desteklemektedir. Bakülovirüs sınıflarında paylaşılan genlerin isimlendirmeleri *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (AcMNPV)'üne göre isimlendirilmektedir. Bu nedenle, AcMNPV'nin içerdiği bütün genlerin sınıflandırılması yapıldı ve aynı zamanda AcMNPV'de bulunmayan fakat diğer virüslerde iyi karakterize edilmiş genler de tabloya dahil edildi (Tablo 3) (Rohrman, 2013).

Tablo 3. Bakülovirüslerde bulunan genlerin sınıflandırılması (Rohrmann, 2013).

Gen fonksiyonu	Genlerin isimleri (AcMNPV'de bulunduğu ORF numarası)
Replikasyon	<i>lef-2</i> (ac6), <i>lef-1</i> (ac14), <i>dnapol</i> (ac65), <i>helikaz</i> (ac95), <i>ssdbp</i> (ac25), <i>lef-3</i> (ac67), <i>me53</i> (ac139), <i>ie-1</i> (ac147), <i>pcna</i> (ac49), <i>lef-7</i> (ac125), <i>ie-2</i> (ac151), <i>pe38</i> (ac153), * <i>helikaz-2</i> (ld50), * <i>dna-ligaz</i> (ld22), * <i>dutpaz</i> (op31), * <i>RNaz reduktaz-1</i> (op32), * <i>RNase reduktaz-2</i> (op34)
Transkripsiyon	<i>p47</i> (ac40), <i>lef-8</i> (ac50), <i>lef-9</i> (ac62), <i>vlf-1</i> (ac77), <i>lef-4</i> (ac90), <i>lef-5</i> (ac99), <i>lef-11</i> (ac37), <i>pp31/39k</i> (ac36) , <i>lef-6</i> (ac28), <i>lef-12</i> (ac41), <i>lef-10</i> (ac53a), <i>ie-0</i> (ac147-0)
Yapısal proteinler	<i>vp1054</i> (ac54), <i>gp41</i> (ac80), <i>vp91/p95</i> (ac83), <i>vp39</i> (ac89), <i>p6.9</i> (ac100), <i>odv-e27</i> (ac144), <i>p33</i> (ac92), <i>38k</i> (ac98), <i>p12</i> (ac1021q7), <i>p48/p45</i> (ac103), <i>polh</i> (ac8), <i>odv-e66</i> (ac46), <i>fp25k</i> (ac61), <i>odv-e25</i> (ac94), <i>odv-e18</i> (ac143), <i>dezmozoplakin</i> (ac66), <i>pk1</i> (ac10), <i>gp37</i> (ac64), <i>p87</i> (ac104), <i>gp64</i> (ac128), <i>p24</i> (ac129), <i>kalyx</i> (ac131), <i>p10</i> (ac137), <i>1629-kapsid</i> (ac9), <i>pk2</i> (ac123), <i>Chab</i> (ac58/59), <i>odv-e26</i> (ac16) * <i>vef-1</i> (Agse75), * <i>vef-2</i> (Agse76), * <i>vef-3</i> (Agse128)
Yardımcı genler	<i>alk-exo</i> (ac133), <i>ubikuitin</i> (ac35), <i>fgf</i> (ac32), <i>ctl-1</i> (ac3) <i>ptp-1</i> (ac1), <i>egt</i> (ac15), <i>arif-1</i> (ac20/21), <i>sod</i> (ac31), <i>kitinaz</i> (ac126), <i>katepsin</i> (ac127), <i>94k</i> (ac66), * <i>ptp-2</i> (Anpe7), * <i>ctl-2</i> (anpe28)
Oral enfektiviteden sorumlu faktörler	<i>p74</i> (ac138), <i>pif-1</i> (ac119), <i>pif-2</i> (ac22), <i>pif-3</i> (ac115), <i>pif-4</i> (ac96), <i>odv-e56</i> (ac148), <i>pif-6</i> (ac68), <i>pif-7</i> (ac110), <i>pif-8</i> (ac83)
Apoptoz inhibitör proteinleri	<i>iap-1</i> (ac27), <i>iap-2</i> (ac71), <i>p35</i> (ac135) * <i>iap-3</i> (op35), * <i>iap-4</i> (op106),
Görevi bilinmeyenler	ac4,ac5, ac7,ac11, ac12, ac13, ac17, ac18, ac19, ac26, ac29, ac30, ac33, ac34, ac38, ac39, ac43, ac44, ac45, ac52, ac53, ac55, ac57, ac58, ac63, ac68, ac70, ac72, ac73, ac75, ac74, ac76, ac78, ac81, ac84, ac85, ac87, ac91, ac96, ac97, ac106, ac107, ac108, ac109, ac110, ac111, ac112, ac113, ac114, ac115, ac116, ac117, ac118, ac120, ac121, ac122, ac124, ac132, ac140, ac145, ac146, ac149, ac150, ac152, ac154, <i>telokin</i> (ac82), <i>p18</i> (ac93), <i>pkip-1</i> (ac24), <i>gta</i> (ac42), <i>ets</i> (ac47), <i>etm</i> (ac48), <i>bjdp</i> (ac51), <i>MTase</i> (ac69), <i>cg30</i> (ac88), <i>bro</i> (ac2), <i>he65</i> (ac105), <i>pnk/pnl</i> (ac33), <i>gp16</i> (ac130), <i>p26</i> (ac136)
Diğer genler	enhansin, ökaryotik translasyon başlatma faktörü-5, hoar, nikotinamid ribosid kinaz-1, parg, parp, fotolizaz, serpin, timidilat kinaz, tripsin-benzeri, v-trex

*AcMNPV'de bulunmayıp diğer bakülovirüslerde bulunan genler

Bakülovirüs kor genleri olarak adlandırılan 38 gen homoloğu, Alfa, Beta, Gama ve Deltabakülovirüslerde bulunmaktadır (Tablo 4) (Garavaglia vd., 2012; Harrison ve Hoover, 2012; Javed vd., 2017). Omurgasızları enfekte eden bazı çift iplikli DNA virüsleri (Nudiviridae, Hytrosaviridae, Nimaviridae ve Bracovirus cinsi Polydnviridae'nin), 38 bakülovirüs çekirdek geninin benzer gen kümelerini paylaşır. Bu da ya bakülovirüslerle

ortak bir atayı ya da belirli fonksiyonel gen gruplarının değişimini düşündürür (Williams vd., 2017; Drezen vd., 2017; Theze vd., 2015). Bu korunmuş genler, DNA replikasyonu, geç gen transkripsiyonu ve virion yapısı dahil olmak üzere çeşitli işlevlerde yer alır. Bazı durumlarda, daha büyük genom boyutları tekrarlanan gen ailelerinin varlığından kaynaklanabilir (Hayakawa vd., 1999).

Tablo 4. Bakülovirüs kor genleri ve fonksiyonları (Harrison ve Hoover, 2012).

AcMNPV ORF No.	Gen isimleri	Kategori	Fonksiyon/aktivite
<i>ac6</i>	<i>lef-2</i> ; geç ekspresyon faktör-2	Transkripsiyon/Replikasyon	DNA primaz yardımcı faktör
<i>ac14</i>	<i>lef-1</i> ; geç ekspresyon faktör -1	Transkripsiyon/Replikasyon	DNA primaz
<i>ac22</i>	<i>pif-2</i> ; oral enfektivite faktör-2	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfektivite için gerekli
<i>ac40</i>	<i>p47</i>	Transkripsiyon/Replikasyon	RNA polimeraz alt ünitesi
<i>ac50</i>	<i>lef-8</i> ; geç ekspresyon faktör -8	Transkripsiyon/Replikasyon	RNA polimeraz alt ünitesi
<i>ac53</i>	<i>ubikuitin</i>	Virion yapısı/Paketleme	Nükleokapsid oluşumu/ Ubox/RING-like domaini
<i>ac54</i>	<i>vp1054</i>	Virion yapısı/Paketleme	Kapsid proteini; nükleokapsid paketlenmesi
<i>ac62</i>	<i>lef-9</i> ; geç ekspresyon faktör -9	Transkripsiyon/Replikasyon	RNA polimeraz alt ünitesi
<i>ac65</i>	<i>dnapol</i> ; DNA polimeraz	Transkripsiyon/Replikasyon	DNA polimeraz
<i>ac66</i>	<i>dezmoplakin</i>	Virion yapısı	Nükleokapsid proteini
<i>ac68</i>	Oral enfeksiyon için gerekli (<i>pif</i> 6)	Virion yapısı/Paketleme	Nükleokapsid proteini; polihedron morfogenezini
<i>ac77</i>	<i>vlf-1</i> ; çok geç faktör-1	Transkripsiyon/Replikasyon Virion yapısı/Paketleme	Çok geç genlerin hiperekspsyonu; virion yapısal proteini; viral genomların işlenmesi/paketlenmesi
<i>ac78</i>	-	Yardımcı/Bilinmeyen	Transmembran domaini
<i>ac80</i>	<i>gp41</i>	Virion yapısı/Paketleme	Zar proteini
<i>ac81</i>	-	Yardımcı/Bilinmeyen	Bilinmiyor
<i>ac83</i>	<i>vp91</i>	Virion yapısı/Paketleme	Kapsid proteini

Tablo 4'ün devamı

<i>ac89</i>	<i>vp39; major kapsid proteini</i>	Virion yapısı/Paketleme	Kapsidin ana bileşeni
<i>ac90</i>	<i>lef-4; geç ekspresyon faktör -4</i>	Transkripsiyon/Replikasyon	RNA polimeraz alt ünitesi
<i>ac92</i>	<i>p33</i>	Yardımcı/Bilinmeyen	FAD-bağlantılı sülfhidril oksidaz
<i>ac93</i>	<i>p18</i>	Virion yapısı	Nükleokapsid çıkışı
<i>ac94</i>	<i>ODV-e25</i>	Virion yapısı	ODV zarf proteini
<i>ac95</i>	<i>dnahel; p143; DNA helikaz</i>	Transkripsiyon/Replikasyon	DNA helikaz
<i>ac96</i>	<i>pij-4; oral enfektivite faktör -4</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfektivite için gerekli
<i>ac98</i>	<i>38k</i>	Virion yapısı/Paketleme	Nükleokapsid paketlenmesi
<i>ac99</i>	<i>lef-5; geç ekspresyon faktör -5</i>	Transkripsiyon/Replikasyon	Geç gen transkripsiyonu
<i>ac100</i>	<i>p6.9</i>	Virion yapısı/Paketleme	DNA yoğunlaşması; nükleokapsid paketlenmesi
<i>ac101</i>	<i>p40</i>	Virion yapısı/Paketleme	Kapsid ilişkili protein kompleksinin alt ünitesi
<i>ac103</i>	<i>p45/p48</i>	Virion yapısı/Paketleme	BV üretimi ve ODV zarfı yapısında gerekli
<i>ac109</i>	<i>odv-ec43</i>	Virion yapısı/Paketleme	Virion yapısal proteini
<i>ac110</i>	<i>pij-7</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfektivite için gerekli
<i>ac115</i>	<i>pij-3; oral enfektivite faktör -3</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfektivite için gerekli
<i>ac119</i>	<i>pij-1; oral enfektivite faktör -1</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfektivite için gerekli
<i>ac133</i>	<i>alk-exo; an; alkalın nükleaz</i>	Transkripsiyon/Replikasyon	DNA rekombinasyonu
<i>ac138</i>	<i>p74</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfeksiyon için gerekli
<i>ac142</i>	<i>49k</i>	Virion yapısı/Paketleme	Virion paketlenmesi
<i>ac143</i>	<i>odv-e18</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; virion paketlenmesi
<i>ac144</i>	<i>odv-ec27</i>	Virion yapısı/Paketleme	Virion yapısal proteini
<i>ac148</i>	<i>odv-e56</i>	Virion yapısı/Paketleme	ODV zarf proteini; oral enfektivite için gerekli

Bakülovirüs genlerinin transkripsiyonu zamansal olarak düzenlenir. Gen grupları erken ve geç gen sınıfı olmak üzere ikiye ayrılır. Geç genler de kendi içinde geç ve çok geç genler olarak ayrılır. Gen sınıfları (erken, geç ve çok geç) bakülovirüs genomunda tek bir yerde kümelenmez ve genomda her iki zincirde de kodlama fonksiyonlarında yer alır. Erken genler, konakçı RNA polimeraz II ile transkriptlenirken, geç ve çok geç genler, bir

alfa amanitin-dirençli viral RNA polimeraz ile transkriptlenir (Huh ve Weaver, 1990). Nadir de olsa transkripsiyondan sonra RNA uç birleştirmesi (splising) görülür (Chisholm ve Henner, 1988, Pearson ve Rohrmann, 1997). Erken ve geç gen transkripsiyon ve DNA replikasyon çalışmaları, en az virüs kodlu üç proteinin erken gen transkripsiyonunu düzenlediğini (Guarino ve Summers, 1986; Kovacs vd., 1991; Lu ve Carstens, 1993; Yoo ve Guarino, 1994), geç gen transkripsiyon faktörleri (LEF) olarak bilinen yaklaşık 20 viral proteinin de geç gen transkripsiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (Rapp vd., 1998; Huijskens vd., 2004). Yaklaşık 20 LEF proteinin yarısının, DNA replikasyonuna da dahil olduğu görüldü (Lu ve Miller, 1995a). Geç gen transkripsiyonu, bakülovirüs geç promotörünün korunmuş 5'-TAAG-3' promotör motifinin ikinci adenininde başlar (Chen vd., 2013). Varsayılan replikasyon orijinleri, bakülovirüs genomu içinde çeşitli yerlerde bulunan tekrarlanan sekanslardan oluşur (Pearson vd., 1992; Hilton ve Winstanley, 2007). Homolog tekrar bölgeleri (hrs) olarak adlandırılan bu diziler, farklı bakülovirüs türleri arasında yüksek ölçüde korunmuş değildir. Tek kopya, hrs olmayan replikasyon kaynakları da tanımlanmıştır (Kool vd., 1994). Geç gen transkripsiyonu DNA replikasyonu için gereklidir. Virion yapısal proteinlerinin çoğu geç genler tarafından kodlanır. Geç ve çok geç genlerin transkripsiyonları, DNA replikasyonundan hemen sonra başlıyor gibi görünmekle birlikte, gömülü yapıya özgü proteinleri kodlayan bazı çok geç genler, daha sonraki bir zamanda son derece yüksek seviyelerde transkript edilmektedir (Thiem ve Miller, 1990). BV üretimi esas olarak geç evrede gerçekleşir ve gömülü yapı üretimi çok geç fazda meydana gelir.

Bakülovirüslerin hayat döngüsünde görev alan genler; DNA replikasyondan sorumlu genler, transkripsiyondan sorumlu genler, yapısal genler, yardımcı genler, hücrel metabolizmayı etkileyen genler, konak böceğe etki eden genler, oral enfektivite için gerekli olan genler olmak üzere alt başlıklar halinde açıklanır.

1.2.5. DNA Replikasyonundan Sorumlu Genler

Bakülovirüs DNA sentezinde yer alan genler, sıcaklığa duyarlı mutantların (Lu ve Cartens, 1991) ve geçici replikasyon analizlerinin karakterizasyonunun bir arada kullanılması ile tanımlanmıştır (Kool vd., 1994; Lu ve Miller, 1995b). DNA replikasyonu için gerekli olan altı gen tanımlanmıştır ve bunların bazılarının uyarıcı olduğu bulunmuştur. Replikasyon için gerekli genler, *dnapol*, *helikaz (p143)*, *lef-1* (geç ekspresyon

faktörü-1), *lef-2*, *lef-3* ve *ie-1* (*en erken ekspresyon geni-1*)'dir. İlk dört genin homologları, tüm dizilenmiş bakülovirüs genomlarında tanımlanmıştır (Okano vd., 2006). *ie-1* ve *lef-3* gen dizilerinin homologlarının bulunmaması bunların işlevlerini yapan, görevleri aynı baz dizisi farklı genlerin bulunduğu anlamına gelmektedir. Bu iki gen grubu, herpes simpleks 1 virüsünde geçici DNA replikasyonu için gerekli olduğu belirlenen genlerle benzerdir (Wu vd., 1988). Her iki virüsde konukçu enzimlerinin de bu sürece katılması muhtemeldir. Herpes virüsünün ve bakülovirüs replikasyonu ile diğer genlerin tamamlayıcısının benzerliği, bu virüsün ökaryotların diğer büyük DNA virüslerinden ayrı bir soy üyesi olabileceği yönündeki önerilere yol açmıştır (Iyer vd., 2006). *E. coli* gibi iyi karakterize edilmiş sistemlerde DNA replikasyonunun başlatılması, DNA replikasyon orijini ile etkileşime giren bu bölgeyi gevşeten bir orjin bağlanma proteini ile başlar ve bu proteine helikazın bağlanmasıyla DNA çift ipliğindeki açılmanın genişlemesi sağlanır. Devamında primazın (bakülovirüslerde LEF1/LEF2) çalışmasının ardından DNA polimeraz gelerek ikincil ipliğin sentezine başlar. Bakülovirüs DNA replikasyonu ile ilgili birçok faktör diğer organizmalarda bulunanlara benzerdir ve DNA replikasyonu IE-1 ile başlar.

✓ IE-1 (AC147): *ie-1* geni, Lepidoptera'dan izole edilen ve genomu belirlenen tüm NPV genomlarında tanımlanmıştır. Aynı genin GV genomlarının bazılarında da olduğu görünmektedir, fakat homologları çok düşüktür. Homologlar, dizilenen Hymenopteran ve Dipteran virüs genomlarında tanımlanmamıştır (Okano vd., 2006). IE-1, hrs bölgelerine bağlanan bir transkripsiyon aktivatörüdür. Bir hrs bağlanma proteini olarak varsayımsal replikasyon orjinleri ve *ie-1* geninin tanımlanması, IE-1'in bir başlangıç bağlanma proteini olduğunu ve replikasyon kompleksinin oluşumu için bir işaretleyici olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. IE-1, bakülovirüs erken genlerinin transkripsiyonel transaktivatörü olarak davrandığından ve DNA replikasyonuna dahil olan tüm viral genler erken gen olduğundan, IE-1 tüm bu genlerin transaktivatörü olarak hareket edebilir. IE-1 ile transaktivasyon olmadan, replikasyon genleri tespit edilecek geçici DNA replikasyonu için yeterince yüksek bir konsantrasyonda sentezlenemeyebilir.

✓ LEF-3 (AC67): LEF-3, tek zincirli bir DNA bağlanma proteini (SSB)'dir. DNA replikasyon sistemleri SSB'lerin varlığına bağımlıdır. Aynı zamanda, ssDNA'nın renatürasyonunu önler ve ssDNA'nın spesifik olmayan diğer proteinlerle etkileşimlerini inhibe edebilir. Kooperatif bir şekilde bağlanır ve replikasyon proteinleri ile etkileşebilir. LEF-3 homologları tüm Lepidopteran bakülovirüs genomlarında bulunmasına rağmen Hymenoptera veya Dipteradaki bakülovirüslerde bildirilmemiştir (Okano vd., 2006). Bu

virüslerde bir LEF-3 homologu bulunması muhtemeldir, ancak birincil aminoasit dizisi, kolaylıkla tanımlanamayacak kadar evrimleşmiş olabilir. Örneğin, varsayılan *Xestia c-nigrum* GV (*XecnGV*) LEF-3 ve *AcMNPV* LEF-3'ü arasında sadece %14 aa dizi benzerliği vardır.

LEF-3'ün bir SSB olmasının yanı sıra, bir dizi başka rolü vardır. LEF-3, alkali nükleaz ile etkileşir ve bu enzimin işlevini düzenleyebilir, konsantrasyonu veya redoks durumuna bağlı olarak hem DNA'nın çözülmesini hem de yeniden birleşmesini sağlar ve donör ve alıcı moleküller arasındaki *in vitro* iplik değişimi yoluyla rekombinasyon ara ürünlerinin üretimini kolaylaştırabilir (Mikhailov vd., 2003; 2004; 2005; Mikhailov, 2000).

✓ Helikaz (*p143*) (AC95): DNA helikazları, DNA replikasyonuna dahil olan kritik enzimlerdir. Bunlar, çift sarmalda bazlar arasındaki hidrojen bağlarını bozarak, DNA'yı serbest bırakan motor proteinlerdir. Bazların ortaya çıkarılmasıyla, tamamlayıcı DNA ipliklerinin sentezi gerçekleşir. Helikaz, aynı zamanda LEF-3 ile etkileşir ve bu da helikazın ssDNA ile etkileşimini kolaylaştırır.

✓ DNA primaz [(LEF-1 (AC14) ve primaza bağlı faktör, LEF-2 (AC6)]: Bir DNA segmenti SSB'ler ile etkileşerek diğer zincirlerden ayrıldıktan ve kararlı hale getirildikten sonra, DNA replikasyonu başlatılır. Bununla birlikte, DNA polimerazlar, yeni bir DNA dizisinin sentezini bağımsız olarak başlatamaz. Ancak, mevcut bir iplikçikte sadece bir -OH grubundan uzayabilir. Bu nedenle, ilk olarak kısa bir oligonükleotid dizisi sentezlenmelidir. Primerler, primaz olarak adlandırılan bir RNA polimeraz ile üretilir. Bu işlem, DNA'ya bağlı küçük RNA bölgeleri içeren hibrid moleküller oluşturur. Sonunda, RNA primer çıkarılarak DNA ile değiştirilir. LEF-1 korunmuş bir primaz alanı (WVVDAD) içermektedir ve LEF-1'in LEF-2 ile etkileştiği bulunmuştur (Evans vd., 1997).

✓ DNA polimeraz (AC65): Yukarıda tarif edildiği gibi DNA polimerazları, DNA'yı bir RNA primerinin 3'-OH grubundan 5' den 3' yönünde uzatır. Bu, süresiz olarak devam edebilen öncü bir ipin sentezi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, ikinci DNA zincirinin sentezi, 5' ile 3' yönünde ilerlemek için öncü sarmalın ters yönünde gerçekleşmelidir. Öncü iplik sentezlendikçe, tamamlayıcı iplikçikte parçalı DNA segmentleri oluşur. Sonuç olarak, öncü iplik sentezi sürekli olabilirken, tamamlayıcı iplikçik sentezi Okazaki parçaları olarak adlandırılan segmentlerde gerçekleşir. DNA polimerazlar sıklıkla ekzonükleaz aktivitelere sahiptir. Bir 3' ile 5' ekzonükleaz aktivitesi, sentezin yönüyle ilişkilidir ve polimerazın DNA'yı sentezlerken yaptığı hataları düzeltmesine izin verir. DNA

polimerazlar 5' ile 3' ekzonükleaz aktivitesine sahip değildir ve bu aktivite RNA primerlerinin çıkarılması için kullanılır. Bakülovirüs DNA replikasyonu sırasında primerlerin nasıl uzaklaştırıldığı net değildir (Rohrmann, 2013).

✓ Replikasyondan sorumlu diğer genler: DNA replikasyonunu etkileyen bakülovirüslere ait başka çeşitli genler tanımlanmıştır, ancak bu süreçteki rolleri belirlenememiştir. Bunlar aşağıdadır;

✓ DBP (AC25), ikinci bir SSB: AcMNPV, SSB'lerin tipik özelliklerini taşıyan iki proteini, LEF-3'ü ve DNA bağlayıcı protein (DBP) olarak adlandırılan bir proteini kodlar. DBP'nin homologları, Dipteran (*Culex nigripalpus* NPV, CuniNPV) dışında tüm sekanslanmış bakülovirüs genomlarında bulunur ve bazı durumlarda *dbp* geninin çoklu kopyaları mevcuttur. LEF-3'e benzer özelliklere sahip olması, kendisiyle etkileşmesi ve hem DNA'yı çözme hem de tekrar çift zincir haline getirebilme yeteneğine sahip olması anlamına gelmektedir (Mikhailov vd., 2007).

✓ LEF-11 (AC37): LEF-11'in homologları, Dipteran CuniNPV hariç tüm bakülovirüs genomlarında mevcuttur. Geç gen transkripsiyonunu uyardığı, ancak DNA replikasyonu için gerekli olmadığı bulunmuştur (Kool vd., 1994).

✓ ME53 (AC139): ME53'ün homologları, tüm Lepidopteran bakülovirüslerin genomlarında bulunur. Bu geni silinmiş AcMNPV bakmidi, DNA'sını çoğaltmadı ve nükleokapsid üretmedi (Xi vd., 2007).

✓ LEF-7 (AC125): LEF-7, geçici DNA replikasyonu için uyarıcıdır (Lu ve Miller, 1995a). Bu genin homologları, tüm Grup I NPV, bazı grup II NPV ve bazı GV genomlarında mevcuttur.

✓ Çoğalan hücre nüklear antijeni (PCNA) (AC49): PCNA, hücre nüklear antijenini çoğaltan genlerle benzer homolojiye sahiptir. PCNA homologları, bazı Grup I (BmNPV değil) ve Grup II Lepidopteran NPV genomlarında bulunmuştur. Ökaryotik PCNA enzimsel bir fonksiyona sahip olmamasına rağmen, DNA sentezi, DNA onarımı ve hücre döngüsünde rol oynar. DNA ile protein etkileşimlerine aracılık eden ve DNA replikasyonu sırasında replikasyon çatalı hem öncü hem de izci ipliklerin koordineli sentezi için gerekli olan dairesel bir kelepçe olarak işlev görür (Johnson ve O'Donnell, 2005).

✓ DNA ligazlar ve ikinci bir helikaz: Bazı NPV genomlarında tespit edilmiş başka bir enzim, DNA ligazdır. Bu enzim, Okazaki fragmentlerinin birbirine bağlanması için gereklidir. DNA ligaz homoloğu bulunmayan virüsler için bir konukçu enzimin bu

işlevi sağladığı varsayılmaktadır. Bununla birlikte, ligaz homologları, dizilenmiş olan tüm granülovirüs genomlarında ve iki NPV genomunda (LdMNPV ve MacoNPV-B) bulunur. Bu ligazlar, en çok DNA tamirinde yer alan ligaz III'e benzemektedir.

✓ dUTPaz: Deoksiüridin trifosfat (dUTP), DNA'ya dâhil edildiğinde mutajenik olabilir. Enzim dUTPaz, dUTP'den fosfat grubunu uzaklaştırarak timidin biyosentezi için bir substrat olan dUMP'ye dönüştürür. Bakülovirüsler, bu geni konukçu geni eklemek veya yerine geçmek için kullanıyor olabilir.

✓ Viral üç aşamalı onarım ekzonükleazı (v-trex): İki bakülovirüs genomunda (AgMNPV ve CfMNPV), diğer sistemlerdeki 3' ile 5' ekzonükleaz aktivitesine sahip genlerle aynı homolojide bir gen tanımlanmıştır (Slack ve Shapiro, 2004; Yang vd., 2004). Bu enzimler DNA polimerazı tarafından kullanılanlara benzer bir hata düzeltme fonksiyonu gerçekleştirmektedir.

✓ AC79: AC79'un, DNA onarımında yer alan endonükleazların UvrC süper familyasının bir üyesi olduğu öne sürülmüştür (Aravind vd., 1999). *ac79*'un homologları, tüm Grup I'in tamamında ve Grup II Lepidopteran NPV'lerin yaklaşık yarısında ve ayrıca, birkaç GV genomunda bulunur. Bunlar, diğer böcek virüslerinde ve çeşitli bakterilerde bulunan ORF'ler ile benzer homolojiye sahiptir.

✓ PARP: Poli ADP-riboz polimerazın (PARP) bir homoloğu, AgMNPV - Ag31 bakülovirüs genomunda bulunur (Oliveira vd., 2006). PARP, DNA onarım enzimlerini aktifleştirerek ve işleyerek DNA'daki tek zincir kırıklarının onarımında rol alan proteinler üzerinde ADP-riboz polimerlerini sentezlemek için bir substrat olarak NAD⁺'yı kullanan bir enzimdir.

✓ PARG: Poli ADP-riboz glikohidrolaz (PARG), PARP tarafından üretilen ürünleri tersine çeviren bir enzimdir (Chen vd., 2001). Tüm sekanslı Grup II genomları, PARG homologlarını kodlamaktadır (Deng vd., 2007). PARG, *in vivo* olarak poli ADP-riboz katabolizmasından sorumlu birincil enzimdir. ADP-riboz üretmek için poli ADP-riboz içindeki glikozidik bağların hidrolizini katalize eder (Miwa vd., 1974). Bu nedenle, PARP çeşitli süreçleri uyarırken, PARG PARP ürünlerini tersine çevirir.

✓ Nikotinamid ribozid kinaz 1 (NRK1): NRK1 ortologları, çoğu Grup II NPV'de ve bazı GV'lerde bulunur. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) sentezinde rol oynar. Nikotinat mononükleotidi veren nikotinamid ribozidi fosforile eder (Magni vd., 2004).

✓ Ribonükleotid redüktaz: Ribonükleotid redüktaz, büyük ve küçük alt birimlerden oluşan bir heterodimerdir (sırasıyla *rr1* ve *rr2*). DNA sentezinde nükleotidlerin sağlanması için bir yol olarak ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere katalizlenmesinde rol oynar. Günümüzde *rr1* ve *rr2* genleri, bazı GV, Grup II NPV ve Grup I'de bulunan OpMNPV'nin genomlarında bildirilmiştir (Esteban vd., 2005).

✓ Çok geç faktör-1 (VLF-1) (AC77): VLF-1, kesin rolü açık olmamasına rağmen, genom işlemede rol oynadığı düşünülmektedir. Bu gen, lambda integraz (Int) protein ailesinin bir üyesidir. İntegrazlar, DNA'nin yeniden düzenlenmesini katalizleyen, virüsler dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda bulunan, viral genomların entegrasyonu ve yeni kopyalanmış kromozomların birleştirilmesinde yer alan, bir bölgeye özgü DNA rekombinaz grubudur. VLF-1 homologları, tüm bakülovirüs genomlarında bulunur ve bunların bakülovirüs biyolojisinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. VLF-1'in bakülovirüs biyolojisinde iki farklı işlevi vardır. Çok geç genlerin hiperekspresyonunda rol oynar ve ayrıca genomun işlenmesinde yer alan transkripsiyondan bağımsız başka bir işlevi olabilir (McLachlin ve Miller, 1994).

1.2.6. Transkripsiyondan Sorumlu Genler

Birçok virüsün ortak bir özelliği, transkripsiyonlarının erken ve geç kategorilere ayrılmasıdır. Bu gruplandırma en erken, erken, geç ve çok geç olarak da ayrılabilir. Erken ve geç transkripsiyon arasındaki ayırım her zaman DNA replikasyonuna göre belirlenir. Erken transkripsiyonda konağa ait RNA polimerazın görev aldığı belirlenmiştir. Geç transkripsiyonda DNA replikasyonu ile ilişkili bazı genlerin dahil olduğu 19 genin ilişkisi tespit edilmiştir. Bu genlerden bazılarının 560 kDa büyüklüğünde bir kompleks oluşturduğu belirlenmiştir. Bu kompleks, sırasıyla 54, 102, 55 ve 47 kDa olarak tahmin edilen moleküler kütlelere sahip geç ekspresyon faktörleri LEF -4, -8, -9 ve p47'yi içerir.

LEF-9 katalitik merkezindeki Mg^{+2} bağlanma bölgesi, diğer RNA polimerazlarda bulunanlara benzemektedir (Ferrelli vd., 2012).

lef-5 ve *vlf-1* geç transkripsiyona katılan diğer iki temel genlerdir. AcMNPV'de LEF-5 proteininin bir başlangıç faktörü olduğu öne sürülmektedir (Guarino vd., 2002). VLF-1 proteini çok geç transkripsiyonda ve gömülü yapının morfogenezinde rol oynayan *polihedrin/granulin* ve *p10* çok geç genlerinin ekspresyonu için gereklidir (McLachlin ve Miller, 1994). Geçici sentezleme deneyleri LEF-6, LEF-10, LEF-12 ve PP31 gibi diğer

proteinlerin geç transkripsiyon için ayrıca gerekli olduğunu göstermiştir (Rohrmann, 2013).

✓ Homolog tekrar bölgeleri (hrs): Çoğu bakülovirüs genomunun karakteristik özelliği, homolog tekrar bölgelerinin varlığıdır. Bunlar, oldukça değişkendir ve bir genomdaki her tekrar bölgesi birbiriyle yakından ilişkili olmasına rağmen, farklı virüslere ait tekrar bölgeleri arasında çok sınırlı benzerlikler görülür. Örneğin, CpGV genomunda, homolog tekrar bölgeleri belirgin değildir, ancak 75 bp kusurlu bir palindromun, genom üzerinde 13 farklı noktada bulunduğu görülmüştür (Luque vd., 2001). Hrs'ler hem transkripsiyon arttırıcıları hem de bir dizi bakülovirüsde DNA replikasyonunun kökenleri olarak gösterilmiştir (Pearson ve Rohrmann, 1995). AcMNPV'de, hrs'ler transkripsiyon aktivatörü IE-1 (AC147)'e bağlanır ve bu bağlanma IE-1 transaktivasyon seviyesini 1000 katına kadar yükseltebilir (Guarino ve Summers, 1986).

✓ En erken gen-1 (İE-1, AC147): Birçok bakülovirüs replikasyon döngüsünü başlatan transkripsiyonel basamakları harekete geçirmek için transkripsiyon aktivatörü IE-1'i kullanır. Tüm Grup I ve II genomlarında IE-1 ortologları tanımlanmıştır. Aynı zamanda, GV genomlarında mevcut oldukları bilinmektedir, fakat bunların benzerliği çok düşüktür. Örneğin *XcGVorf9* ve *ac147* yaklaşık %10 benzerlik göstermektedir. IE-1 (AC147) sekansının bir kısmı IE-0 (AC147-0) olarak adlandırılır. AcMNPV'de, IE-1 veya IE-0 viral çoğalmayı destekleyebilir (Rohrmann, 2013).

✓ En erken gen-0 (İE-0, AC147-0): IE-1 transkriptinin bir kısmı IE-0 olarak adlandırılır ve burası, AcMNPV'de toplam 636 amino asitlik IE-1'in N-terminal ucunda 54 amino asitlik bir ektir (Chisholm ve Henner, 1988). AcMNPV IE-1 bir homodimer olarak bulunur, ayrıca IE-0 ile bir heterodimer oluşturabilir. IE-1 veya IE-0, enfektif virüs üretimini destekleyebilir. Bununla birlikte, hangi genin ekspres edildiğine bağlı olarak, olayların zamanlaması ile BV ve polihedra üretiminde bazı farklılıklar vardır. Bu durum, hem IE-0'ın hem de IE-1'in yaban tip enfeksiyon seviyesi için gerekli olduğunu düşündürmektedir (Stewart vd., 2005).

✓ AC151 (IE-2 / IE-n): IE-2'nin homologları Grup I Lepidopteran NPV genomları ile sınırlıdır. IE-2, diğer proteinlerle etkileşime gireceğini gösteren tahmini bir RING parmak motifi içerir ve *Bombyx mori*'de bu bölgenin kendisiyle etkileştiği bulunmuştur (Imai vd., 2000). IE-2'nin, IE-1'in aktivasyonunu arttırdığı ve Sf-21 hücrelerine transfekte edildiğinde, plazmid DNA replikasyonu için gerekli olduğu ancak, Tn-368 hücrelerinde çok az etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Lu ve Miller, 1995b).

✓ AC153 (PE38): AcMNPV'deki diğer potansiyel transkripsiyon aktivatörü AC153'tür. AC153'ün homologları, tüm Grup I NPV ve CpGV, PhopGV, CrleGV ve PiraGV genomlarında bulunur. *pe38* silindiğinde, birkaç genin ifadesi etkilenmemiş olsa da diğerleri gecikmiştir (Jiang vd., 2006). Bu silinme, enfeksiyonu geciktirir ve BV üretiminde %99 oranında, DNA sentezi miktarında ve larvalarda oral enfektivitede azalmaya neden olur (Milks vd., 2003).

✓ RNA polimeraz: Yeni bir bakülovirüs RNA polimeraz mevcudiyetinin bulguları, bakülovirüs geç genlerinin ekspresyonunun α -amanitine dirençli olduğu gözlemiyle öne sürülmüştür (Gruha vd., 1981; Fuchs vd., 1983). Alfa-amanitin, RNA polimeraz II'yi ve dolayısıyla çok düşük konsantrasyonlarda mRNA sentezini inhibe eden bir fungal toksindir. α -amanitine karşı direnç gözlemlendiğinde, bakülovirüs geç genlerinin yeni bir geç promotör elemanı kullandığı belirlenerek bakülovirüs geç genlerinin ekspresyonunda rol oynayan ayrı bir RNA polimerazın bulunduğu ifade edildi.

✓ LEF-9: Bu protein, DNA'ya bağımlı RNA polimerazın büyük alt birimlerindeki katalitik merkezde bulunan Mg^{++} bağlanma dizisine (NADFDGD) benzer 7-amino asitlik bir motif (NTDCDGD) içerir (Lu ve Miller, 1994).

✓ LEF-4 (RNA şapkalama enzimi): 5' RNA şapkası, ökaryotik hücrelerde ve virüslerde bulunan mRNA'ların özelliğidir. Bakteriler ve arkealar bu şapkanın sentezi için gerekli enzimlerden yoksun olduğu için, bakteriyal ve arkeal mRNA'lar şapkadan mahrumdur. Başlık, mRNA'nın 5' ucuna eklenir ve mRNA'ya bağlanmış bir guanin nükleotidinden oluşur. Guanozin, N-7 pozisyonunda metil transferaz adı verilen bir enzim ile metillenir. Bu guanozin, mRNA'nın 5' ucundaki riboz şekerlerinin 2' hidroksil gruplarının ek bir metilasyonu ile daha da modifiye edilebilir. LEF-4'ün bu iki aşamada yer aldığı belirlenmiştir (Rohrmann, 2013).

✓ AC69, metiltransferaz (MTase): AC69 bir metiltransferazı kodlar ve Grup II NPV'nin yaklaşık yarısının, Grup II NPV'lerin tamamının ve NeseNPV genomlarında bulunur. Ac69'un, yapılan bir analizde geç gen transkripsiyonunu uyardığı bulunmuştur (Li vd., 1999). Gen, RNA şapka (nükleosit-2-O) metiltransferaz aktivitesi ile ilgili bir proteini kodlar. AcMNPV'de silinmesiyle oluşan mutasyonda, hücre kültüründe normal olarak replike olabilir (Wu ve Guarino, 2003).

✓ AC38 (bakülovirüslerde şapka çıkarma enzimi): AC38, nudiks pirofosfatazların alt ailesinin bir üyesi olan bir ADP-riboz pirofosfataz (ADPRase)'dir. Tüm Lepidopteran NPV ve GV genomlarında ortologları bulunur. Nudiks süper ailesinin

proteinleri tüm organizmalarda yaygındır ve T4 bakteriyofaj, Afrika domuz ateşi virüsü (aile: Asfarviridae) ve poksvirüs de dahil olmak üzere diğer virüslerde bildirilmiştir. AcMNPV *ac38* geninin delesyon mutantında BV'lerin üretiminin yaban tipte üretilen BV'nin %1'i kadar olduğu belirlenmiştir (Ge vd., 2007).

✓ Çok geç faktör 1 (VLF-1, AC77): Bakülovirüslerin yeni bir özelliği, genleri enfeksiyonda çok geç aşamada yüksek seviyelerde ifade etme yetenekleridir. Bu durum, ifade vektörleri olarak bakülovirüslerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Çok yüksek oranda ifade edilen çok geç genler, *polihedrin* ve *p10* olarak belirlenmiştir. Bu genlerin promotorları ifade vektörlerinde kullanılmaktadır. Hem *polihedrin* hem de *p10* genlerinin, yüksek seviyeli ifadelerinde yer alan bir geç promotor dizisinin aşağısında A/T açısından zengin bir dizi içerdiği belirlendi (Ooi vd., 1989). Bu diziye 'burst dizisi' adı verildi. Çünkü enfeksiyonda çok geç bir transkripsiyon patlamasına neden oldu. Çok geç ekspresyon faktörü 1 (VLF-1) çok geç genlerin hipereksresyonunu etkilediği için orijinal olarak tanımlanmıştır (McLachlin ve Miller, 1994). Kanıtlar, VLF-1'in, bakülovirüs genomlarının işlenmesine veya paketlenmesine de dahil olabileceğini düşündürmektedir.

✓ LEF-2 (AC6) ve PK-1 (AC10): VLF-1'e ek olarak, LEF-2'nin (AC6) çok geç transkripsiyonda yer aldığı görülmektedir. Görünüşte bir primaz aksesuar faktörü olarak işlev gören önemli bir replikasyon geni olmasına rağmen, AcMNPV'nin LEF-2 mutantlarının, çok geç transkripsiyonu etkilediği ve hem replikasyonda hem de transkripsiyonda rol oynayabileceği belirlenmiştir (Merrington vd., 1996). BmNPV'de, LEF-2'nin, DNA replikasyonu üzerindeki etkisinden bağımsız olarak geç transkripsiyonu aktifleştirdiği de gösterilmiştir (Sriram ve Gopinathan, 1998). Bir serin/treonin kinazı (PK-1) kodlayan AC10'un da çok geç gen ekspresyonunu etkilediği öne sürülmüştür. Tüm Lepidopteran bakülovirüs genomlarında AC10'un ortologları bulunur. Ayrıca PK-1 çok geç bir transkripsiyon kompleksi ile ilişkili olabilir ve LEF-8'in fosforilasyonuna dahil olabilir (Mishra vd., 2008).

✓ LEF-5 (AC99, olası bir TFIIS ortoloğu): Tüm bakülovirüslerde *lef-5*'in ortologları bulunur ve bunlar Nudivirüslerde de yer almaktadır (Wang vd., 2007). LEF-5 başlangıçta geçici geç gen transkripsiyonu için gerekli olarak tanımlanmıştır. LEF-5'in kendisiyle etkileşime girdiği ve RNA polimeraz II uzama faktörü TFIIS'e benzer bir motif içerdiği gösterilmiştir (Harwood vd., 1998). Sonraki araştırmalar, LEF-5'in *in vitro* transkripsiyon için oldukça uyarıcı olmasına rağmen, bakülovirüs polimerazın uzama

yolunda çalışmadığı ve uzama faktörü yerine bir başlangıç faktörü olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Guarino vd., 2002).

✓ LEF-6 (AC28, olası bir mRNA'yı taşıma faktörü): Tüm Lepidopteran NPV ve GV'lerin genomlarında *lef-6*'nın homologları bulunur. Geç genlerin transkripsiyonu için gereklidir (Passarelli vd., 1994). *lef-6* geni silinmiş mutantlarda enfeksiyon gecikmiştir. En büyük etki ise transkripsiyonun başlaması gecikmesi olarak geç transkripsiyonun başlangıcında görülmüştür (Lin ve Blissard, 2002).

✓ LEF-10 (AC53a): Bu ORF, orijinal AcMNPV genom dizisinde tanımlanmadığı için AC53a olarak isimlendirilmiştir. Çünkü küçük bir ORF kodlama sırasına (78 aa) sahiptir ve 3' ucundaki kodlama bölgesinin yaklaşık yarısı *ac54*'ün 5' bölgesiyle çakışmaktadır. LEF-10'un homologları tüm Grup I NPV, çoğu Grup II NPV ve GV genomlarında bulunur. LEF-10 geç gen ekspresyonu için gereklidir (Lu ve Miller, 1994).

✓ AC41 (LEF-12). LEF-12, Grup I ve Grup II NPV genomlarının yaklaşık yarısında dizilenmiştir. AC40 (p47)'a olan yakınlığı nedeniyle, ilk zamanda AC41 (LEF-12) tanımlanamamıştır. Daha sonra, *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde geç gen transkripsiyonu için gerekli olduğu, ancak *Trichoplusia ni* hücrelerinde geç transkripsiyon için gerekli olmadığı gösterilmiştir (Rapp vd., 1998; Li vd., 1999). LEF-12'nin AcMNPV genomunda fonksiyonel olarak gereksiz olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar doğrultusunda virüs genomunun geri kalanı mevcut olduğunda, LEF-12'nin geç transkripsiyon için gerekli olmadığı ileri sürülmüştür (Guarino vd., 2002).

✓ PP31 (39K-Ac36): PP31, IE-1 tarafından uyarılan erken bir promotor içermektedir (Guarino ve Summers, 1986). Homologları tüm Lepidopteran NPV ve GV genomlarında bulunur. Bu protein, fosforile edilir ve enfekte olmuş hücrelerin virojenik stromasına yerleşir ve DNA'ya bağlanabilir, ancak virion yapısal proteini değildir (Guarino vd., 1992). BmNPV'deki (Bm27) pp31 homologunun silinmesi, virüs yaşayabilir olmasına rağmen, geç gen transkripsiyonunda azalma, BV üretiminde 100 kat azalma ve virojenik stromanın uygunsuz oluşumu ile sonuçlanmıştır (Gomi vd.,1997). Bu genin rolünün doğrudan geç transkripsiyon üzerinde etkili olup olmadığı veya virojenik stroma yapısal bir proteini olup olmadığı net olarak belli değildir.

1.2.7. Bakülovirüslerde Yapısal Proteinler

Enfeksiyon yapan bakülovirüslerin, çıplak DNA'larının duyarlı böcek hücrelerine transfeksiyonu ve enfeksiyonun başlatılması için gerekli olan erken genlerin transkripsiyonunun, konukçu hücre RNA polimerazı yoluyla gerçekleştirildiği, uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle, viral yapısal proteinler, viral genomun korunması ve enfeksiyonun başlatılması için gerekli olmakla birlikte, transkripsiyon veya DNA replikasyonu gibi işlevler için çok gerekli değildir. Bakülovirüs virion yapıları ile ilişkili olan proteinler; gömülü yapı virüsler (OB), tomurcuklanan virüs (BV) ve gömülü yapısı uzaklaştırılmış virüslerin (ODV) zarfları ve nükleokapsidlerin bileşenleridir. BV ve ODV'lerin köken ve zarf protein bileşimleri farklı fakat, nükleokapsid bileşimleri ise aynıdır (Ferelli vd., 2012). Polihedrin NPV'lerinin başlıca gömülü yapı proteini iken; granülin, GV'nin başlıca gömülü yapı proteini. Başlıca gömülü yapı proteinlerinden farklı olarak, diğer birçok protein de OB morfogenezinde rol oynamaktadır. Polihedrin/granulin bir protein tabaka ile çevrenmesi, bağırsakta OB'nin çözünme yeteneğini arttırmaktadır (Gross vd., 1994). OB oluşumu sırasında P10 ile oluşan fibril yapısıyla ilişkili olan kaliks/polihedron zarfı başlıca gömülü proteini kapsayan protein tabakasıdır. P10, OB'nin bir parçası değildir ancak, onun doğru morfogenezinde rol oynar (Williams vd., 1989).

Polihedrin/granülin ile ilişkili diğer proteinler, türlere bağlı olan virüs enhansin faktör (VEF) ve proteinazlardır (Ferelli vd., 2012). Örneğin, *Xestia c-nigrum* GV (XcGV), enhansinlerin dört kopyasını içerir (Hayakawa vd., 1999). Enhansinler musinin parçalanmasına ve ODV'lerin peritrofik membran içinden geçmesine yardımcı olur (Wang ve Granados, 1997). OB'lerin, gömülü yapının çözünmesini sağlayan ve ODV'leri serbest bırakan alkalın proteinazlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (Rohrmann, 2013). Ancak, bu enzimler için bakülovirüs genomunda kodlanan tanımlanmış herhangi bir gen yoktur ve bunların bakteriyel ya da böcek hücre kökenli olabileceği düşünülmektedir (Rohrmann, 2013). Bakülovirüs genomları, nükleokapsidlerden viral protein örtüsü içerisinde paketlenmiştir. Nükleokapsidler, BV oluşturmak için enfekte hücrelerden tomurcuklanarak modifiye plazma membran zarfı kazanırlar (Ferelli vd., 2012). OB'ler enfeksiyonun geç safhasında üretilir ve nükleokapsidleri gömülü olmadan önce nüklear membrandan bir zarf alırlar (Herniou vd., 2003).

Genomik DNA, nükleokapsid oluşturmak için proteinlerle etkileşir. *p6.9*, *vp39*, *vp1054* ve *vp91* isimli 4 gen nükleokapsid yapısının oluşumu için gereklidir (Herniou vd., 2003). P6.9 proteini tarafından nükleokapsid içindeki DNA'nın yoğunlaştırılması kolaylaştırılır (Kelly vd., 1983). VP39 büyük bir nükleokapsid proteinidir (Faulkner vd., 1997). VP1054 ve VP91, BV ve OV ile ilişkilidir (Olszewski ve Miller, 1997). Virion yapısının kısımlarını oluşturan diğer kor gen ürünleri, GP41 (zar proteini), 38K, P49 ve ODV-EC27, hem BV'lerde hem de ODV'lerde bulunur ve nükleokapsid ile ilişkilidir (Ferelli vd., 2012).

Proteinlerle ilgili çalışmalar AcMNPV, CuniNPV, *Helicoverpa armigera* NPV (HearNPV) ve *Pieris rapae* GV (PrGV)'lerdeki ODV ve AcMNPV'lerdeki BV yapılarını içermektedir (Braunagel vd., 2003; Perera vd., 2007; Deng vd., 2007; Wang vd., 2011; Wang vd., 2010).

✓ Polihedrin/Granülün (AC8): Polihedrin ve granülün birbirleriyle yakından ilişkilidir ve oklüzyon cisimciklerinin temel yapısal bileşenleridir (NPV'lerdeki polihedrin ve GV'lerde granülün). Polihedrin/granülün ortologları, Dipteran virüsü CuniNPV haricinde tüm bakülovirüs genomlarında bulunur. Şaşırtıcı bir şekilde, CuniNPV, diğer bakülovirüslerin polihedrininden farklı aa sırasına sahip ve yaklaşık üç kat daha büyük bir oklüzyon vücut proteinine sahiptir (Perera vd., 2006).

✓ Kaliks/polihedron zarfı (PE): Kaliks/polihedron kılıfı, polihedrayı çevreleyen pürüzsüz, kesintisiz bir yüzey oluşturan elektronca yoğun bir yapıdır. Kaliks/PE'nin işlevi, polihedranın yüzeyini çevrelemek ve kararlılığını arttırmak olarak görünmektedir. Polihedra, alkalın işlemine tabi tutulduğunda kristalin kafes çözülür, ancak polihedron zarfı birçok virionun tutulduğu torba benzeri bir yapı olarak kalır. Kaliks/polihedron kılıfın başlangıçta karbonhidrattan oluştuğu görülmesine rağmen (Minion vd., 1979), fosforile bir protein bileşeni daha sonra tanımlanmıştır (Whitt ve Manning, 1988). Bu protein kaliks/PE'nin ayrılmaz bir bileşeni gibi görünmektedir (Gross vd., 1994). PE proteininin homologları (AC131) tüm Lepidopteran NPV'lerin genomlarında bulunur.

✓ AC68 (PIF6): Polihedron morfolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. AC68'in homologları tüm bakülovirüslerde mevcuttur. *ac68* silindiğinde, önemli etki olarak sadece larvalarda daha uzun bir ölümcül zaman saptandı (Wu vd., 2008).

✓ P10 (AC137): P10, büyük vücut proteini gibi görünmese de PE proteini ile birlikte yerleşir ve polihedron örtüsünün düzgün oluşumu için gerekli olduğu

görülmektedir. P10 fosforile edildiğinde, mikrotübüller ile ilişkili hale gelir (Cheley vd., 1992).

✓ Viral artırıcı faktörler (enhansin): Enhansinler, birkaç Lepidopteran NPV (örn., Ld-, Cf- ve MacoNPV) ve GV'ler (örn., Ag-, As-, Tn-, XcGVs) tarafından kodlanan bir metalloproteinaz sınıfıdır (Lepore vd., 1996). Enhansinlerin, peritrofik membranı sindirerek bakülovirüs enfeksiyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir.

✓ Proteinazlar: Oklüzyon vücut yapısı üzerine yapılan ilk araştırma, araştırılan proteinleri bozan proteinazların varlığı ile engellenmiştir. Daha sonra, oklüzyon cisimcikleri ile ilişkili proteinazların, böcek bağırsağı ile ilişkili enzimlere benzer özelliklere sahip olduğu ve hücre kültüründe üretilen polihedranın, ilişkili proteinazlardan yoksun olduğu bulunmuştur (Rubinstein ve Polson, 1983; Wood, 1980). Birçok bakülovirüs, bir katepsin benzeri proteinazı kodlarsa da AcMNPV'de AC127 asidik (pH 5) koşullar altında en aktif olanıdır (Slack vd., 1995). Bu nedenle, oklüzyon cisimcikleri ile ilişkili proteinazlar, muhtemelen bakteri, böcek bağırsağı ve virüsten türetilen enzimlerin bir kombinasyonudur.

✓ Bakülovirüs virionları, zarf proteinleri: En iyi çalışılan bakülovirüs olan AcMNPV iki farklı süreçle hücrelere girebilir; direkt füzyon ve reseptör aracılı endositoz (Dong vd., 2010). Muhtemelen en iyi karakterize edilen bakülovirüs yapısal proteini, Grup I bakülovirüslerde bulunan zarf füzyon proteini GP64'dür. Çünkü füzyon aktivitesi için yapılan araştırmalarda erken safhada belirlendi (Blissard ve Wenz, 1992). Ayrıca, bu virüslerin F olarak adlandırılan farklı bir füzyon proteini kullandığı ve F'nin homologlarının GP64 içeren virüslerde olduğu belirlenmiştir. GP64'ü kodlayan virüslerdeki bu F homologları, füzyon proteinleri olarak inaktiftir. Bu durumda GP64'ün bir bakülovirüs tarafından kullanıldığını ve F proteinin füzyon fonksiyonunu değiştirdiğini gösterir. Her ne kadar GP64 ve F düşük pH ile aktifleşen füzyon proteinleri olsa da, F çeşitli virüslerde bulunan füzyon proteinlerinin Grup II nesline aittir. Oysa GP64 Grup I'e aittir (Pearson ve Rohrmann, 2002).

✓ GP64 (AC128): GP64, yağ asiti bağlanmış bir glikoprotein ve AcMNPV'nin tomurcuklanan virionları ile ilişkilidir. Ayrıca, GP64 en bol bulunan proteinlerinden biri olup düşük pH ile aktifleşen zarf füzyon proteini (Roberts ve Faulkner, 1989; Volkman, 1986). GP64 geninin varlığı, Grup I virüslerinin başlıca ayırt edici özelliklerinden biridir. AcMNPV'de *gp64*'ün silinmesi öldürücüdür, virüsler tek bir hücrede çoğalabilirler, fakat etraftaki hücreleri enfekte edemezler. (Kuzio, 1999; Oomens ve Blissard, 1999).

✓ Füzyon proteini, F (AC23): F (AC23), AcMNPV’de aktif bir zarf füzyon proteini olmasa da Grup II NPV’lerinde, GV’lerde ve Dipteran virüsünde (CuniNPV), F’nin ortologları muhtemelen füzyon proteini olarak kullanılmaktadır, çünkü bu virüslerin tümü GP64 homologlarından yoksundur. Bir istisna, hem F hem de GP64 proteinlerinin homologlarından yoksun olan Hymenopteran NPV’leri gibi görünmektedir. Grup II virüslerinin ayırt edici özelliklerinden biridir.

✓ Zarfla ilişkili ek proteinler: AcMNPV BV’inde proteomik analizler yapılmasına rağmen, zarf ve nükleokapsid proteinleri ayrı ayrı analiz edilmemiştir. AC17, AC23 (F proteini), PKIP (AC24), LEF-6 (AC28), FGF (AC32), GP37 (AC64), AC74, AC103 ve AC126 proteinlerinde yapılan çalışmalarda BV ile ilişkili olduğu görülmüştür (Hou vd., 2013). BV/ODV-E26 (AC16) homologları Lepidopteran Grup I NPV’lerinde bulunur. AcMNPV için AC16’ın BV ve ODV zarflarıyla ilişkisine dair kanıtlar bildirilmiştir (Wang vd., 2010). ODV-E25, (AC94) tüm bakülovirüs genomları tarafından kodlanmış gibi görünmektedir (Yuan vd., 2011). Bu gen tarafından kodlanan protein, orijinal olarak OpMNPV’de tanımlandı ve ODV zarfı ile ilişkili olduğu belirlendi (Russell ve Rohrmann, 1993). ODV-EC43, (AC109)’un homologları tüm bakülovirüs genomlarında bulunur. Yapılan çalışmalar, ODV’nin AcMNPV (Braunagel vd., 2003) ve *Helicoverpa armigera* NPV (Ha94 = ODV-EC43) (Deng vd., 2007) ile ilişkili olduğunu ve ayrıca, AcMNPV’de BV ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Fang vd., 2009a). ODV-E18, (AC143) ve ODV-EC27 (AC144) genlerinin homologları, tüm bakülovirüslerin genomlarında bulunur ve hem ODV hem de BV zarflarıyla ilişkilidir (Rohrmann, 2013). VP1054, (AC54), ORF büyüklüğüne göre adlandırılmış ve nükleokapsid düzeneği için gerekli bir proteini kodlar. Hem BV hem de ODV’de (Olszewski ve Miller, 1997) bulunur ve 38K (AC98) ile etkileşir (Wu vd., 2008). AC66, tüm bakülovirüs genomlarında AC66’nın ortologları olarak bulunur. AC66’nın çekirdeklerden etkili virion çıkışı için gerekli olduğu düşünülmektedir (Ke vd., 2008). Çok geç faktör olan VLF-1 (AC77), lambda integraz (Int) protein ailesinin bir üyesidir ve çok geç genlerin muhtemelen düzenleyici bölgelerine bağlanarak hiperekspresyonunu etkilemektedir. VLF-1 hem BV hem de ODV’de bulunan yapısal bir protein gibi görünmektedir ve nükleokapsidlerin üretimi için gereklidir (Yang ve Miller, 1998).

1.2.8. Bakülovirüslerde Yardımcı Genler

Yardımcı genler viral gen ekspresyonu, genom replikasyonu veya yeni virüs oluşumunda doğrudan gerekli olmayan ürünleri kodlayan genlerdir (Herniou vd., 2003). Elli yedi bakülovirüs genom analizi, bu genomlarda mevcut olan 895 farklı genin ve 31 temel genin varlığını ortaya koymuştur (Miele vd., 2011). Farklı genlerdeki yüksek sayıdan dolayı Ferelli vd. (2012), bazı genlerin gerekli olmadığını fakat eksikliklerinde enfeksiyonun zayıfladığını öne sürmektedir. Buna ek olarak, bazı genlerin belirli bir işlevi olabilir ve sadece spesifik virüs-konak etkileşimlerinde bir rol oynayabilir.

1.2.9. Hücrel Metabolizmayı Etkileyen Genler

Apoptozis, viral patojenlerin istilasına ve yayılmasına karşı konak hücrelerin savunma mekanizmalarından biridir. Tüm bakülovirüslerin genomları replikasyon döngülerini tamamlamak amacıyla anti-apoptotik genleri kodlamaktadır. Anti-apoptotik genler P35/P49 homologlarına ve apoptoz inhibitör proteinlerine (IAP) ayrılmıştır (Ferelli vd., 2012). Kaspazların faaliyeti bazı NPV'lerde ve bir GV'de bulunan P35/P49 proteini tarafından doğrudan engellenir (Escasa vd., 2006). IAP'lar, apoptotik yolun sonlarındaki bir aşamasında faaliyet gösterirler (Van Oers ve Vlaskovits, 2007). Enfekte hemositlerdeki serbest radikalleri uzaklaştırma, bakülovirüsler arasında yaygın olarak bulunan bir superoksit dismutaz (sod) geni ile desteklenir (Rohrmann, 2013). Lepidopteran bakülovirüsler konakçı enzimler tarafından parçalanabilen viral proteinleri stabilize etmek için konak parçalayıcı yollarındaki aşamaları inhibe eden bir viral ubiquitin kodlamaktadır (Haas vd., 1996).

✓ P35 (Bakülovirüs anti apoptoz geni): İlk bakülovirüs apoptotik inhibitörü, amaçlanan rekombinant proteini eksprese edemeyerek, anormal özelliklere sahip bir gömülü yapı negatif plağının tespit edildiği bir laboratuvar çalışmasında keşfedilmiştir. Mutant virüs genomunun araştırılması, *p35* adı verilen bir bakülovirüs geninin keşfine yol açmıştır. Bu genin büyük kısmı, bu anormal virüste silinmiştir. Normal koşullar altında *p35*'in yaban tip virüs ile enfekte olmuş hücrelerde apoptotik yolu bloke edebildiği, ancak silinmiş mutantlarda apoptotik yolun bloke edilemediği bulunmuştur (Clem vd., 1991). Bakülovirüsler P35'in varlığından yarar görmelerine rağmen, bunun evrimsel durumu açık değildir. P35 ile ilişkili homologlar sadece AcMNPV ile yakından ilişkili birkaç Grup I

bakülovirüste bulunur. P35 homologları aynı zamanda da *Choristoneura occidentalis* GV (ChocGV) ve bir entomopox virüsünde rapor edilmiştir (Escasa vd., 2006).

✓ P49 (P35'in bir varyantı): Grup II NPV olan SpliNPV'de P49 olarak adlandırılan bir varyant bulunmuştur (Du vd., 1999). Efektör kaspazlarının, p35 ile p49'un inaktivasyon şekillerinin farklı olduğu bulunmuştur (Guy vd., 2008).

✓ IAP (*iap 1-5*): P35'in ilk keşfinden sonra, dağılımını ve çeşitliliğini anlamak için diğer bakülovirüslerdeki varlığı araştırılmıştır. Bu durumda, *p35*'in konumunun öngörüldüğü yerde bir delesyona sahip olduğu gösterilen CpGV ve OpMNPV üzerinde çalışıldı (Gombart vd., 1989). *p35* silinmiş bir AcMNPV mutantında, *p35*'in dışında bir genin *p35* eksikliğini telafi ettiği bulunmuştur (Birnbaum vd., 1994). Bu gen, *apoptoz inhibitörü (iap)* olarak adlandırıldı. Daha sonra, *p35*'in bakülovirüslerin arasında sınırlı dağılımının tersine, neredeyse tüm bakülovirüslerin genomlarında *iap* homologları bulundu. Homologlar, entomopoks ve iridovirüsler gibi diğer böcek virüslerinde de bulunmuştur. Ayrıca mayadan memelilere kadar ökaryotlarda da yaygın olarak belirlenmiştir. *iap* genleri bakülovirüslerde çoklu kopyalar şeklinde *iap 1-5* olarak tanımlanmıştır. Genellikle tek bir bakülovirüs genomunda birkaç *iap* gen grubu temsilcisine rastlanır. *iap* genlerinin dağılımı şu şekildedir: *iap-1* sadece Grup I NPV'lerde; *iap-2* hem Grup I hem de II NPV'lerde; *iap-3* Grup I, II, GV'ler ve Hymenopteran NPV'lerde; *iap-4* sadece birkaç Grup I ve II NPV genomunda mevcuttur. *iap-5* geni granülovirüs genomlarında bulunur. *iap-3* genleri, böceklerin *iap* genleri ile yakından ilişkilidir. Farklı *iap* genlerinin farklı hücre tiplerinde çalışabilmesi mümkündür (Clem, 2007).

✓ AC92 (P33): Tüm sekanslı bakülovirüs genomlarında *ac92* homologları mevcuttur. Bu gen için silinebilen canlı rekombinantlar izole edilmediğinden önemli bir genidir (Nie vd., 2011). AC92'nin sülfidril oksidaz aktivitesine sahip olduğunun gösterilmesi bunun disülfid bağlarının oluşumunda rol oynadığını göstermektedir (Long vd., 2009). Aynı zamanda AC92'nin apoptoz ve hücre döngüsünde rol oynadığı da düşünülmektedir (Rohrmann, 2013).

1.2.10. Konak Böceğe Etki Eden Genler

Lepidopteran bakülovirüsler, trakeal sistem sayesinde yayılan BV'ler tarafından konakta sistemik enfeksiyona neden olurlar (Miller ve Lu, 1997). Alfa ve

Betabakülovirüsler gibi bazı bakülovirüsler genomları içinde *viral fibroblast büyüme faktörü* homologlarını (*v-fgf*) kodlayan genleri taşır. Bu genler, sınırlı orta bağırsak enfeksiyonlarına neden olan Gama ve Deltabakülovirüslerde bulunmaz (Ferrelli vd., 2012). Yaban tip virüslerle, *v-fgf* geni silinmiş AcMNPV ve BmNPV enfeksiyonu karşılaştırıldığında delesyonun konak ölümünün gecikmesine neden olduğu gözlemlenmiştir (Passarelli, 2011). Konak böceği etkileyen bir başka gen ürünü, yeni virüsün büyük miktarlarda üretilmesi amacıyla, böceklerin deri değiştirme hormonu ekdizon inaktivasyonunu sağlayan ekdisteroid UDP-glikoziltransferaz (*egt*)'dir. Öldükten sonra larvaların sıvılaşmasına katepsin ve kitinaz adında viral olarak kodlanan iki enzim aracılık etmektedir (Hawtin vd., 1997).

✓ Fibroblast büyüme faktörü (vFGF, AC32): AC32, fibroblast büyüme faktörü (*fgf*) ile aynı homolojiye sahiptir ve *v-fgf* olarak adlandırılır. Homologlar tüm Lepidopteran bakülovirüslerin genomlarında bulunur. AcMNPV *fgf*, *Drosophila melanogaster*'deki bir gen ile yakından ilişkilidir, oysa LdMNPV'den bir Grup II *fgf* homologu, böcek homologları ile daha az ilişkilidir ve GV homologları, NPV *fgf* homologlarına sınırlı bir benzerlik göstermektedir. *v-fgf* geni silinmiş AcMNPV, kültür hücrelerinde hiçbir değişiklik göstermemesine rağmen, larvalara verildiğinde ölüm zamanı uzamıştır (Detvisitsakun vd., 2007). Son kanıtlar, vFGF'nin sistemik enfeksiyonların oluşumunu hızlandırabilecek bir olaylar dizisini başlattığını göstermektedir. Bu iki süreç içerir. Virüsle enfekte olmuş orta bağırsak hücrelerindeki vFGF, bazal lamina içinden yayılır ve enfekte olmuş orta bağırsak hücrelerine bitişik olan bazal trakeal hücreleri etkiler. vFGF daha sonra trakeal hücrelerin uçlarında bulunan FGF reseptörlerini aktifleştirir. Bu aktivite, matriks metalloproteazlarının aktivasyonuna yol açar. Matriks metalloproteazları, daha sonra, ekstraselüler olarak hareket eden efektör kaspazlarını aktifleştirir. Böylece, laminin bileşeninin sindirilmesiyle bazal laminanın bozunması sağlanır. Bu, virüsün trakeal hücrelerden diğer dokulara geçişine izin verir ve sistemik enfeksiyona yol açar (Means ve Passarelli, 2010).

✓ EGT (AC15): Enfeksiyonun seyrini etkileyebilen bir başka viral protein, bir enzim olan ekdisteroid UDP-glukosiltransferazdır. Egt homologları, tüm Lepidopteran NPV (I ve II) ve bazı GV (XcGV ve SpliGV) genomlarında bulunur. Böcek steroid metabolizmasındaki rolü nedeniyle, bu enzimi kodlayan bir genin muhtemel kaynağı, bir konukçu böceğe aittir. Bununla yakından ilişkili homologlar, *Bombyx mori* gibi çeşitli böceklerde bulunur. Viral EGT'nin fonksiyonu, glikozun UDP-glikozdan ekdisteroidlere

transferini katalize ederek, bu böceklerin eritici hormonlarını etkisiz hale getirmek ve enfekte olmuş larvalarda deri değişimini ve pupa oluşumunu bloke etmektir (O'Reilly ve Miller, 1990).

✓ Kitinaz (AC126) ve katepsin (AC127): Böcek parçalanmasını kolaylaştıran enzimlerdir. Kitinaz genleri çoğu Lepidopteran Grup I ve II NPV ve birkaç GV genomunda bulunur. Bu virüslerin kitinazları, çeşitli Lepidopteran kitinazlarıyla, örneğin AcMNPV (AC126) ve BmNPV (BM103) proteinleri ile filogenetik olarak kümelenmiştir. *B. mori* kitinazına %60'ın üzerinde bir dizi özdeşliği göstermektedir. Aynı zamanda *Serratia marcescens* bakterisinin kitinazına %60 benzerdir (Fukamizo vd., 2011). Her ne kadar yakından ilişkili olsa da böcek ve viral enzimler farklı özelliklere sahiptir. AcMNPV kitinaz, endoplazmik retikulumda tutulur ve alkali koşullar altında işlev görürken, böcek kitinaz enzimi salgılanır ve yüksek pH da aktivitesi azalır (Daimon vd., 2006). Bir başka enzim ile birlikte, viral bir proteinaz (katepsin) ve kitinaz, enfeksiyonun geç dönemlerinde böceklerin sıvılaşmasına katılmaktadır. Kitinaz veya katepsin geninin silinmiş olduğu virüslerle enfekte olmuş böcekler, ölümden birkaç gün sonra bile bozulmadan kalmıştır (Hawtin vd., 1997). *Anticarsia gemmatalis*'e karşı kullanım için bir biyolojik mücadele etmeni üretilen tesiste, virüsten bu iki genin silinmesi ile elde edilen rekombinant virüsün parçalanmış böceklerden bozulmadan toplanması sağlanmıştır (Oliveira vd., 2006).

Viral katepsinlerin (AC127) homologları AC126'ya (kitinaz) benzer bir dağılım gösterir ve çoğu Grup I/II NPV ve birkaç GV genomunda bulunur. Viral ve böcek kitinaz genlerinde olduğu gibi viral katepsinler böcek katepsinleri ile yakından ilişkilidir. Örneğin, *ac127* bir *Apis mellifera* katepsinine %39 özdeştir.

1.2.11. Oral Enfektivite İçin Gerekli Olan Genler

Bakülovirüsler, Lepidopteran, Hymenopteran ve Dipteran böcek türlerinin larvalarını oral olarak enfekte eden artropodlara özel geniş DNA virüsleridir. Böcek larvaları OB ile kontamine yiyecekler yediklerinde, OB'ler larval orta bağırsağın yüksek alkali ortamında parçalanır ve ODV'ler salınır. ODV'ler daha sonra orta bağırsak kolumnar hücrelerinin mikrovillüslerine bağlanır ve viral zarf hücre membranı ile birleşerek nükleokapsidleri hücreye bırakır. Bu virüs giriş süreci, ODV zarfında, oral (*per os*) enfektiviteden sorumlu faktörler (PIF) olarak adlandırılan belirli bir protein kümesi tarafından sağlanır.

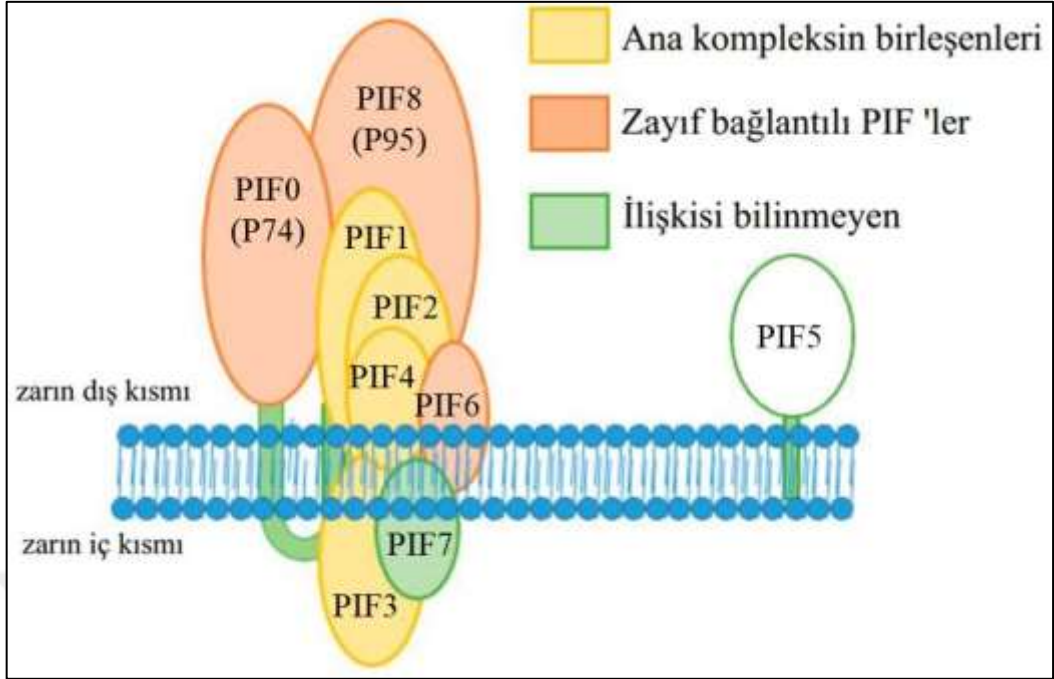
Oral enfektivite faktörleri, primer enfeksiyon için gerekli olan proteinlerdir. *pif* genlerin delesyonları sonucunda ODV'lerin oral enfektivitesini kaybettiği belirlenmiştir. AcMNPV genomu kullanılarak, dokuz ODV zarf proteini PIF olarak tanımlanmıştır (Tablo 5). Böcek içindeki virüsün hücreden hücreye yayılımı için PIF'lere ihtiyaç duyulmadığından, BV'lerin enfektivitesi *pif* genlerinin silinmesinden etkilenmez. Sonuç olarak, bu genlerin delesyonunun yapıldığı virüsler böcek hücre kültürlerinde yaban tip virüsle enfekte edilmiş hücrelerle aynı özellikleri gösterir. Fakat, larvaların enfeksiyonu için *pif* genleri silinmiş mutantların BV'leri orta bağırsağa değil, doğrudan larvaların hemoseline enjekte edilerek enfeksiyon yapılabilir. Bugüne kadar bilinen tüm PIF proteinleri, bakülovirüs kor genleri tarafından kodlanmıştır. Yani, bunlar Baculoviridae ailesindeki dört cinsin tüm genom dizisi yapılmış bakülovirüs genomlarında mevcuttur ve yüksek ölçüde korunmuştur. Bazı PIF'ler Nudivirüsler, Bracovirüsler, Hitrosavirüsler ve Nimavirüsler gibi diğer omurgasız DNA virüslerinde de bulunur (Wang vd., 2017).

Tüm PIF'lerde ortak olan bir özellik, yüksek oranda korunan sistein kalıntılarının varlığıdır (Tablo 5). Bu yüksek seviyede korumuş sisteinler, sülfat köprülerinin PIF'lerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri için önemli olduğunu göstermektedir. Sistein bulundurmalarının yanı sıra bu genlerin kitin bağlanma domaini de içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca, 6 tane PIF (PIF-1,-2,-3,-4,-7 ve -8)'in N-terminalinde transmembran motifi bulunmaktadır.

Tablo 5. AcMNPV'de tespit edilen PIF'ler

PIF	ORF	Boyut (kDa)	Sistein sayısı	Referanslar
PIF0 (P74)	<i>ac138</i>	74	6	Faulkner vd., 1997
PIF1	<i>ac119</i>	60	24	Kikhno vd., 2002
PIF2	<i>ac22</i>	44	14	Pijlman vd., 2003
PIF3	<i>ac115</i>	23	12	Ohkawa vd., 2005
PIF4	<i>ac96</i>	20	2	Fang vd., 2009b
PIF5 (ODV-E56)	<i>ac148</i>	56	6	Harrison vd., 2010
PIF6	<i>ac68</i>	16	1	Nie vd., 2012
PIF7	<i>ac110</i>	7	1	Liu vd., 2016
PIF8 (VP91/P95)	<i>ac83</i>	96	13	Zhu vd., 2013

AcMNPV’de, ODV zarfında bir makromoleküler kompleks oluştuğu belirlenmiştir (Peng vd., 2010; 2012). Şimdiye kadar, dokuz PIF proteininin yedisi bu kompleksin bileşenleri olarak tanımlanmıştır. Bu ODV giriş kompleksini PIF-1, -2, -3 ve -4’ün oluşturduğu ve PIF-0, -6 ve -8’in daha gevşek bir şekilde bağlandığı sabit bir çekirdekten (ana kompleks) oluşur (Şekil 3). Kompleksin çekirdeği sabit olarak karakterize edilir, çünkü ODV’ler SDS ile kısmen denatüre edildiğinde ve indirgeyici ajanlar ve 50 °C’de inkübasyon yapıldığında, Western blot analizinde 170 kDa’luk bant olarak görünür. Bu koşullar altında sıcaklık 95 °C’ye yükseltildiğinde, çekirdek kompleksi tamamen PIF monomerlerine ayrılmıştır. PIF-1, -2 ve -3, çekirdek kompleksinin oluşumu için gereklidir. Çünkü ilgili genlerin herhangi biri silindiğinde kompleks tespit edilememiştir (Peng vd., 2010). Bununla birlikte, *pif4*’ün silinmesinden sonra, Western blot analizi ile PIF-1, -2 ve -32’ten oluşan daha küçük bir kompleks bulunmuştur (Peng vd., 2012). Yapılan çalışmalarda *pif-7*’nin de komplekse bağlandığı belirlenmiştir (Liu vd., 2016). Yalnızca PIF-5’in bu komplekse ilişkisi belirlenememiştir (Peng vd., 2012). Bu kompleks sayesinde virüsün ODV’lerinin orta bağırsak lümeniyle füzyon yaparak içeriye geçiş yaptığı düşünülmektedir, fakat bunun ayrıntıları tam olarak bilinmemektedir (Zheng vd., 2017).



Şekil 3. ODV giriş kompleksinin modeli. Sarı renk, çekirdek kompleksinin bileşenlerini (PIF-1, 2, 3 ve 4); ve turuncu renk, daha düşük ilişkili giriş kompleksine bağlanan PIF (PIF-0, -6 ve -8)'leri göstermektedir. PIF-7, denatüre edici olmayan koşullar altında giriş kompleksinde tespit edildiği için yeşil olarak gösterilmiştir. Fakat bu PIF'in kompleks ile ilişkisi bilinmemektedir. PIF-5, giriş kompleksinin bir parçasını oluşturmaz ve beyaz olarak tasvir edilir (Boogaard vd., 2018).

Bazı PIF proteinleri arasındaki etkileşimler maya iki-hibrid sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 6) (Zheng vd., 2017). Bu etkileşim sonucunda birbirleriyle etkileşimde olan proteinler belirlendi.

Tablo 6. PIF kompleksindeki bileşenlerin protein-protein etkileşimleri için Y2H testi sonuçları (Zheng vd., 2017).

pGBK-T7	Ade-, Leu-, Trp- ve His-eksik ortamında kolonilerin büyümesi						
	pGAD-T7						
	PIF-0	PIF-1	PIF-2	PIF-3	PIF-4	PIF-6	PIF-8
PIF-0	-	-	-	-	-	-	-
PIF-1	-	-	++	+++	++	-	+++
PIF-2	-	++	-	+++	-	-	-
PIF-3	-	+++	+++	-	++	-	-
PIF-4	-	++	-	++	-	-	-
PIF-6	-	-	-	-	-	-	-
PIF-8	-	-	-	-	-	-	-

-: Büyüme yok; +: zayıf pozitif büyüme; ++: ara büyüme; +++: güçlü büyüme.

Ayrıca, oral enfektiviteden sorumlu olabileceği düşünülen başka proteinler de vardır. Bunlar ODV-E66 (AC46), AC5, AC108, AC145 ve AC150'dir (Hong vd., 1994; Zheng vd., 2017; Lapointe vd., 2004).

✓ AC145: AC145'in homologları, Dipteran NPV hariç tüm bakülovirüslerde bulunur. *ac145* geni kitin bağlanma motifi içermektedir (Dall vd., 2001). Bir çalışmada, AcMNPV *ac145* geninin silinmesi sonucunda virüsün enfektivitesinin *Trichoplusia ni* larvalarında 6 kat düşüşe yol açtığı belirlenmiştir. Fakat *Heliothis virescens* üzerinde herhangi bir virülans değişimi gözlenmemiştir (Lapointe vd., 2004). Aynı zamanda *ac145*'in BV ve ODV ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. *ac145*'in *ac150* ile beraber silindiği çalışmalarda *H. virescens* üzerindeki enfektivitede yaptığı azalmalar gözlendiğinden, iki genin de oral enfektiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Lapointe vd., 2004).

1.3. Protein Etkileşimleri

Protein-protein etkileşimleri (PPIs), hücre-hücre etkileşimleri ve metabolik ve gelişimsel kontrol de dahil olmak üzere geniş bir yelpazede biyolojik süreçleri ele alır (Braun ve Gingras, 2012). PPI, sistem biyolojisinin ana hedeflerinden biri haline gelmektedir. Yan zincirleri arasındaki kovalent olmayan temaslar, protein katlanması, protein montajı ve PPI için temeldir (Ofra ve Rost, 2003). Bu temaslar proteinler arasında çeşitli etkileşimlere ve ilişkilere neden olur. Yapısal ve fonksiyonel özelliklerine dayanarak, PPI'ler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (Nooren ve Thornton, 2003). Etkileşim yüzeyleri temelinde, homo veya heterooligomerik olabilirler. İstikrarlılığı değerlendirildiğinde, etkileşimler zorunlu olabilir veya zorunlu olmayabilir. Kalıcılıklarıyla ölçüldüğünde, geçici veya kalıcı olabilirler (Zhang, 2009). Belirli bir PPI, bu üç özel çiftin bir kombinasyonu olabilir. Geçici etkileşimler sinyal yollarını oluşturacak, sürekli etkileşimler ise kararlı bir protein kompleksi oluşturacaktır. Tipik olarak proteinler, *in vivo* daki işlevlerini, türlerden izole edildiğinde *in vitro* da göstermezler (Yanagida, 2002). Proteinlerin %80'inden fazlasının tek başına değil komplekslerde çalıştığı ortaya çıkmıştır (Berggard vd., 2007). Varlığı doğrulanmış proteinlerin önemli analizleri sonucunda, aynı hücresel süreçlerde yer alan proteinlerin tekrar tekrar birbirleriyle etkileştiği bulunmuştur. PPI'ların çalışması, hücre içindeki protein işlevini anlamak için önemlidir. Tanımlanmamış proteinlerin işlevselliği, işlevi zaten ortaya çıkmış olan bir protein ile etkileşimlerinin kanıtı üzerinden tahmin edilebilir. PPI'ların ayrıntılı çalışması,

hücrenel süreçlerin moleküler mekanizmalarını örneklendirmek için fonksiyonel yolların modellenmesini hızlandırmıştır. Verilen bir proteomda proteinlerin etkileşimlerini karakterize etmek, hücrenin biyokimyasını anlamak için olağanüstü olacaktır. İki veya daha fazla proteinin belirli bir fonksiyonel hedefle etkileşime girmesi çeşitli yollarla oluşturulabilir. PPI'ların önemli özellikleri, Phizicky ve Fields (1995) tarafından belirlenmiştir. Bu özellikler, enzimlerin kinetik özelliklerini değiştirmek, substrat geçişine izin vermek için genel bir mekanizma olarak hareket edebilir. Bir proteinin substratı için farklı bağlanma partnerleri ile etkileşim yoluyla spesifitesini değiştirebilir, yollarda düzenleyici rol oynayabilir. Son yıllarda, PPI verileri, maya iki-hibrid sistemleri, kütle spektrometresi, faj gösterimi ve protein çip teknolojisi gibi garantili yüksek verimli deneysel yöntemler ile geliştirilmiştir (Zhang, 2009). Bu deneysel kaynaklardan kapsamlı PPI ağları oluşturulmuştur. Bununla birlikte, PPI verilerinin kapsamlı süreçleri, laboratuvarında doğrulanması için zorlayıcıdır. PPI ağlarının sayısal analizi, keşfedilmemiş proteinlerin işlevlerini anlamak için giderek daha fazla zorunlu bir araç haline gelmektedir. Günümüzde PPI, modern sistem biyolojisinin gelişimi ve ilerlemesi için temel konulardan biridir.

Protein etkileşimlerini tespit etmek için deneysel yöntemler kullanılır. Protein etkileşimlerinin karakterizasyonunda kullanılan deneysel metotlar deneysel düzeneğin doğasına göre değişiklik gösterir. Örneğin maya iki-hibrid (Y2H) sistemi kullanılarak, ilgilenilen bir proteinin, cDNA kütüphanesi gibi çok yüksek sayıda protein ile arasındaki etkileşimler test edilebilir. Pull down analizi gibi diğer tekniklerle, ilgilenilen iki protein arasındaki etkileşim teyit edilir. Protein etkileşimlerinin çalışılmasında kullanılan teknikler genel olarak üç gruba ayrılır. Bunlar genetik yöntemler (Y2H, memeli iki hibrid), biyokimyasal yöntemler (pull-down analizi, birlikte immün çökeltme, affinite kromatografisi-kütle spektrometrisi, çapraz bağlanma) ve biyofiziksel yöntemler (analitik ultrasantrifügasyon, immunofloresan mikroskopi, birlikte lokalizasyon/FRET/BRET, konfokal mikroskopi, elektroforetik hareket kayma deneyi (EMSA))'dir. Bu yöntemlerin karşılaştırmaları Tablo 7'de gösterilmiştir (Rao vd., 2014).

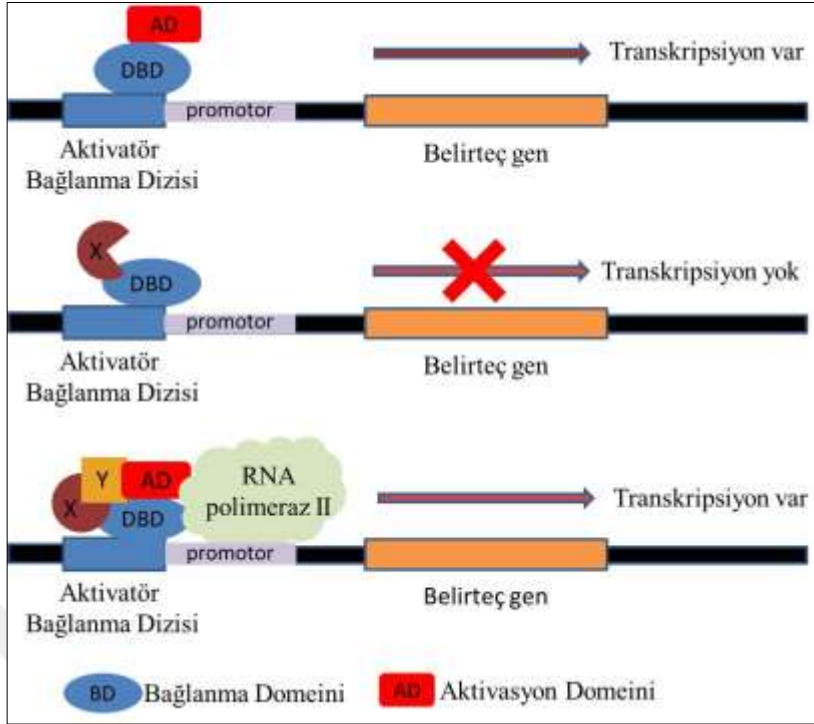
Tablo 7. Protein-protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan metotlar (Rao vd., 2014).

Metot	Deneysel Amaç: Yeni Keşif	Deneysel Amaç: Doğrulama ya da Karakterizasyon	Hücreye dayalı deneysel şekil	Hücre bağımsız deneysel şekil
Maya İki-Hibrid Sistemi	+	-	+	-
Memeli İki-Hibrid Sistemi	+	+	+	-
Protein Mikroarray	+	+	+	+
Faj Display	+	-	+	-
Afinite Kromatografisi ve Kütle Spektrometresi	+	+	+	+
Pull-down Analizi (Çöktürme)	-	+	+	+
Birlikte İmmün Çökeltme	-	+	+	+
Birlikte Lokalizasyon /FRET/BRET	-	+	+	-
Çapraz Bağlanma Analitik	-	+	+	+
Ultrasantrifügasyon	-	+	-	+
İmmunofloresan/ Konfokal Mikroskopisi	-	+	+	-
Elektroforetik Hareket Kayma Deneyi (EMSA)	-	+	-	+

Protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan bütün tekniklerin kendine göre bir avantajı ve dezavantajı bulunmaktadır. Bu sebeple PPI'lerini birden fazla teknik ve yaklaşımla analiz ederek yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak çok önemlidir. Genel olarak araştırmacılar genetik metotla tespit edilen bir etkileşimi biyokimyasal olarak da doğrulamaktadır. Bununla birlikte bir proteomik çalışmada çok fazla etkileşim tespit edilmişse bunlardan bir veya birkaç tanesinin doğrulanması ile çalışma sonuçlandırılır. Çünkü çıkan bütün etkileşimleri doğrulamak çok fazla zaman ve masraf gerektirir (Ngounou Wetie vd., 2014).

1.3.1. Maya İki-Hibrid Sistemi

Fields and Song, 1989 yılında *Saccharomyces cerevisiae* mayasında doğrudan protein-protein etkileşimlerini saptamak için bir genetik sistemi tanımlayarak protein etkileşim analizinde devrim yarattı (Fields ve Song, 1989). O zamana kadar, iki protein arasındaki etkileşimler çoğunlukla biyokimyasal teknikler kullanılarak incelenmiştir. Yeni analitik araçların gelişimi, ökaryotik transkripsiyon faktörlerinin moleküler analizi ile tetiklenmiştir. Ptashne Laboratuvarı mayada bir transkripsiyon aktivatörü olan *Gal4*'ün modüler yapısını keşfetmiştir. *Gal4*'ün spesifik bir DNA sekansına (upstream aktivasyon alanı, UAS) bağlandığını ve böylece, galaktoz varlığında transkripsiyonu aktifleştirdiğini göstermişlerdir. Mayalarda GAL gen ailesi içerisinde birçok yapısal ve düzenleyici gen yer almaktadır. Bunlardan *Gal3*, *Gal4* ve *Gal80* düzenleyici genlerdir. *Gal1*, *Gal2*, *Gal7*, *Gal10* ve *MEL1 (Gal5)* genleri ise galaktoz metabolizması ile ilgili yapısal genlerdir. Maya iki-hibrid metodunun ana aktörlerinden biri olan GAL4 proteinini kodlayan gen, 16. kromozom üzerinde yer almaktadır. Maya GAL4 proteini 881 aminoasitten oluşan, yaklaşık 92 kDa ağırlığında bir proteindir ve homodimer yapıda transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür. GAL4 proteininin amino-terminal bölgesi (1-74. amino asitler) DNA molekülünde kendine özgü dizilere bağlanmada rol oynar (DNA binding domain: DBD). GAL4 proteini DBD bölgesi ile DNA üzerinde 17 nükleotidlik bir diziyi (upstream activation sequence: UAS) tanıyarak buraya bağlanır. Proteinin amino-terminal bölgesi aynı zamanda hücre nükleusunda lokalizasyon işlevi de üstlenir. GAL4 proteininin karboksi-terminalinde yer alan 738-881. aminoasit bölgesi ise ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eden bölgedir (activation domain: AD) (Şekil 4). Bu bulgulardan esinlenilerek, Fields ve Song, protein-protein etkileşimlerini izlemek için transkripsiyon faktörü GAL4'ün modüler özelliklerini kullanmıştır. Temel fikir X ve Y'nin iki proteininin sırasıyla DBD ve AD'ye kaynaştırılmasıydı. Öyle ki X ve Y arasındaki etkileşim, daha sonra raportör gen ekspresyonunu çalıştırabilen bir fonksiyonel transkripsiyon faktörünü yeniden oluşturdu (Şekil 4).



Şekil 4. Klasik maya iki-hibrid sistemi. İlgili X proteini, yem olarak adlandırılan bir yapı olan DNA bağlama alanına (DBD) kaynaştırılır. Potansiyel etkileşen protein Y, aktivasyon alanına (AD) kaynaştırılır ve av olarak adlandırılır.

Yem, yani DBD-X füzyon proteini, promotorun yukarıdaki aktivatör bağlanma dizisine (UAS) bağlanır. Yemin av yani AD-Y füzyon proteini ile etkileşimi, AD'yi getirir ve böylece, işlevsel bir transkripsiyon faktörünü yeniden oluşturur. Oluşan yapıya RNA polimeraz II'nin gelmesiyle raportör genin transkripsiyonu meydana gelir. Geniş çaplı çalışmalarda cDNA kütüphanesi *av* olarak hazırlanır. *Av* ve *yem* genler bir maya promotorunun kontrolü altında farklı vektörler olarak oluşturulur. İlgilenilen *yem* ve *av* vektörler maya hücresine transform edilir. *Yem* ve *av* genler sitoplazmada ifade edilir ve ifade edilen proteinin transkripsiyonu aktive edebilmesi için nükleusa girmesi gerekir. Bu durum ise klasik maya iki-hibrid sisteminin kullanım alanına bir sınırlama getirir. Bu sebeple ilerleyen yıllarda Y2H sisteminin farklı versiyonları da (örneğin membran proteinleri için) geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Örneğin, ikili *yem* sisteminde X1 proteini LexA'nın DNA bağlanma bölgesi (BD) ile X2 proteini de lamda bakteriyofajın cI represörünün BD ile füzyon oluşturacak şekilde aynı hücrede ifade edilir. X1 ile pozitif etkileşim olduğu durumda LexA operatörü altındaki LEU2 ve LacZ'nin aktivasyonu, X2 ile pozitif etkileşim olduğunda cI operatörü altındaki LYS2 ve GusA (beta-

glukuronidaz)'nın aktivasyonu gerçekleşir. Bu sistem büyük proteinlerin seçici bölgeleriyle protein etkileşimi olduğunu tanımlamak için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Klasik maya iki-hibrid sistemi GAL4'ten farklı diğer DNA bağlanma proteinlerinin (örneğin, *E. coli* represör proteini olan LexA'nın BD), transkripsiyonel aktivatörlerin (örneğin *Herpes simplex virus*'ün VP16 proteini) ve çeşitli marker genlerin kullanımıyla genişletilmiştir. İşaretçi gen olarak belirlenmesi kolay olan okzotrofik genler kullanılmaktadır. Bunlar genellikle lösin, histidin, adenin, urasil ve lizindir (LEU2, HIS3, ADE2, URA3, LYS2). Y2H sisteminin güvenilirliğini arttırmak ve seçici olmayan etkileşimlerden dolayı olabilecek yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için genellikle iki aktif marker gen kullanılır. Maya iki-hibrid sistemi daha sonra maya bir hibrid, üçlü hibrid şeklinde de uyarlanmıştır (Brückner vd., 2009).

Maya iki-hibrid sistemi zayıf ve geçici protein etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan hassas bir metottur. Bu etkileşimler biyokimyasal olarak tespit edilemeyebilir. Fakat kompleks biyolojik sistemlerin tam fonksiyonunu tespit etmek için önemli olabilir. Bununla birlikte, maya iki-hibrid sistemi *in vivo*'da gerçekleştirildiği için proteinler doğal konformasyonlarına çok benzerdir. Bu metot ile birlikte protein etkileşimlerini belirleme noktasında güvenilirliğe en yakın sonuç alınabilir (Guarente, 1993; Estojak vd., 1995).

Maya iki-hibrid sistemi günümüzde membran proteinleri, transkripsiyonel olarak aktif olan proteinler ve hücrenin alt ünitelerinde toplanıp yerleşen proteinler gibi neredeyse bütün hücrel proteomun etkileşimini çalışabilmek için kullanılabilir.

1.4. Çalışmanın Amacı

Malacosoma neustria (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lasiocampidae) elma, armut ve erik gibi kültür bitkilerinde ve meşe, kuşburnu, söğüt, kavak, huş ağacı ve berberis gibi yabani bitkilerde önemli yaprak yiyicisidir. Uygun mevsimsel koşullarda bitkileri tamamen yapraksız bırakmakta ve bitkilerin kurummasına neden olmaktadır. Zararlının en önemli mikrobiyal patojeni nükleopolihedrovirüslerdir (Jankevica vd., 1998). Bu virüs farklı araştırmacılar tarafından farklı ülkelerde tespit edilmiştir (Kovacevic, 1926; Arvy, 1953; Gershenson, 1955; Zarins ve Kalnina, 1971; Kikhno ve Stokovskaya, 1997; Jankevica vd., 1998). Virüsün ülkemizde de varlığı farklı zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Yaman, 2002; Demir vd., 2009; 2013; 2014; Gencer vd., yayınlanmamış veri).

Bu çalışmalarla ülkemizden 5 farklı ManeNPV izolatu tespit edildi. Bu izolatların morfolojik, moleküler ve virülansları gibi çeşitli biyolojik özellikleri belirlendi.

Bakülovirüsler gen ekspresyon vektörü, gen terapi vektörü, biyolojik mücadele ajanları ve model organizmalar olarak kullanılan en önemli biyoteknolojik araçlardır. Bu kullanılabilirlikleri onların ayrıntılı gen yapı ve genom organizasyonlarının belirlenmesiyle yaygınlaşmaktadır. Dünya da olduğu gibi ülkemizde de bu kadar yaygın olmasına ve diğer çok sayıda NPV'nin genom organizasyonları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, ManeNPV'de komple genom dizi analizi ve gen yapı ve organizasyonu ile ilgili bugüne kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, bu tezde ülkemizden Demir vd. (2013), tarafından izole edilen ve ManeNPV-T2 olarak kodlanan virüsün komple dizi analizi yapılarak gen yapı ve organizasyonunun belirlenmesi, bakülovirüslerde oral enfektivite faktörü olduğu düşünülen *ac145* genlerinin (*ac145-1*, *ac145-2*) ManeNPV-T2 genomundaki homologlarının varlığının tespit edilmesi ve genoma ait oral enfektiviteden sorumlu proteinlerle olan etkileşimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda hedefler aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

- ManeNPV-T2'nin komple genom dizi analizinin yapılması
 - ✓ Virüsün çoğaltılması, saflaştırılması ve konsantrasyonunun tayini
 - ✓ Saflaştırılmış virüs süspansiyonundan DNA izolasyonu
 - ✓ Komple genom dizilenmesi (Macrogen, Korea)
 - ✓ Biyoinformatik analiz
 - ManeNPV-T2'nin komple genomunun toplanması ve analizi
 - Genomun açık okuma zincirlerinin (ORF) belirlenmesi
 - Diğer bakülovirüslerle karşılaştırılarak ManeNPV-T2 genlerinin sınıflandırılması
 - Gen dağılım analizi (Gene parity-plot)
 - Fonksiyonel genlerin tespiti
 - Homolog tekrar bölgelerinin (hrs) belirlenmesi
 - Filogenetik analiz
- AC145 proteinlerinin oral enfektiviteden sorumlu proteinlerle (PIF0-PIF8) maya iki-hibrid sisteminde etkileşiminin belirlenmesi
 - ✓ *ac145* genlerine ve oral enfektiviteden sorumlu genlere uygun primerlerin tasarlanması

- ✓ Oral enfektiviteden sorumlu genlerin ve *ac145* genlerinin PCR ile çoğaltılması
- ✓ PCR ile çoğaltılan DNA'ların ara vektöre klonlanması
- ✓ *ac145* genlerinin maya sistemindeki pGBK-T7 (*yem*) vektörüne ve ManeNPV-T2'ye ait diğer tüm *pif 0-8* genlerinin pGAD-T7 (*av*) vektörüne klonlanması
- ✓ *Yem* ve *av* vektörlerinin maya hücrelerine (AH109) transformasyonu ve tanımlanması
- ✓ *ac145* ve *pif 0-8* genlerinin gösterdiği etkileşim sonuçlarının belirlenmesidir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Komple Genom Analizi ile İlgili Çalışmalar

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Virüs ve Böcek Larvaları

Bu tez çalışmasında Demir vd. (2013), tarafından Gümüşhane ili Köse ilçesinden *Malacosoma neustria* larvalarından izole edilmiş ve ayrıntılı tanımlaması yapılmış aynı zamanda zararlı üzerindeki öldürücü etkisi belirlenmiş *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs T2 (ManeNPV-T2) izolatu kullanıldı.

Çalışmada ihtiyaç duyulan *Malacosoma neustria* larvaları Mayıs-Temmuz 2016 ve 2017 yıllarında, Gümüşhane ve bu ile bağlı çeşitli ilçe ve köylere yapılan arazi çalışmaları sırasında toplandı. Uygun yöntemler kullanılarak, bitki sürgün ve yapraklarıyla birlikte toplanan böcekler, yeterince havalandırılmalı özel kutularla laboratuvara getirildi. Laboratuvarda, larvalar doğal besinlerle beslendi ve çalışmalarda kullanmak üzere sağlıklı olanlar seçildi.

2.1.2. *Malacosoma neustria* nükleopolihedrovirüs'ünün Çoğaltılması

Virüs, sağlıklı *M. neustria* larvalarında çoğaltıldı. Bunun için, 10^7 OB/ml konsantrasyonda virüs larvaların doğal olarak beslendikleri yapraklara bulaştırıldı. Yaklaşık 6 saat aç bırakılmış larvalar hazırlanan virüs bulaştırılmış besinler ile beslendi. Tipik bakülovirüs enfeksiyon semptomları olan negatif geotropizm, ishal ve yiyeceklerin sindirilememesi işaretleri gözleninceye kadar 22 ± 2 °C'de, 16:8 ışık:karanlık periyodunda ve %60 nem ortamında yetiştirildi (Keddie ve Erlandson, 1995). Makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonunda, viral enfeksiyondan öldükleri tespit edilen larvalar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.1.3. ManeNPV-T2 Gömülü Yapılarının Saflaştırılması ve Konsantrasyonunun Tayini

Viral suşların çoğaltılması için yapılan enfeksiyonlar sonunda ölen larvalardan gömülü yapılar (OB) saflaştırıldı (Boughton vd., 1999; El-Salamouny vd., 2003). Enfeksiyondan ölen ve -20 °C’de bekletilen yaklaşık 30-40 larva, 100 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8) içerisinde homojen hale getirildi ve kaba parçaların ayrılması için 2-3 kat tülbenkten geçirildi. Süzölmüş karışım oda sıcaklığında 1000 rpm’de, 5 dk santrifüj edildi. Ayrı bir tüpe alınan sıvı kısım, 12.000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Oluşan pellet 50 mM Tris-HCl (pH 8) içerisinde tekrar süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon, %40-65 (v/w) lineer sukroz gradientinde, 14.000 x g’de, 20 °C’de, 30 dk santrifüj edildi. OB’leri ihtiva eden bant alınarak, saf su ile yıkandıktan sonra 12.000 rpm’de, 4 °C’de, 15 dk santrifüj edildi. Saflaştırılmış OB’lerden oluşan pellet, Tris ile çözüldü ve -20 °C’de muhafaza edildi.

Saflaştırılmış virüsün mikroskopik incelemeleri için ışık ve elektron mikroskobu kullanıldı. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) için, saflaştırılmış virüs süspansiyonu yuvarlak metal lamel üzerine konuldu ve havada bir gece kurumaya bırakıldı. Kurutulan örnek, SEM (Zeiss EVO LS10) için püskürtmeli bir kaplayıcıda (Quorum Technology SC7620-CF) altın püskürtülerek kaplandı. Kaplanan numune SEM’de incelendi (büyütme gücü: 7,055X).

Saflaştırılmış virüsün konsantrasyonunun doğru bir şekilde hesaplanması, sonuçların değerlendirilmesi bakımından oldukça önemlidir. Bakülovirüslerde mikroskop altında hemositometre kullanılarak OB’lerin sayılması ile virüs stok konsantrasyonu belirlendi. Bir kareye 100 – 200 OB gelecek şekilde süspansiyon seyreltildi ve 10 µl virüs süspansiyonu sayım için kullanıldı. OB’lerin sayımı çapraz beş büyük kare üzerinden yapıldı. Aynı stoktan tekrar seyreltik hazırlanarak işlem ikinci kez tekrarlandı. Stok virüs konsantrasyonu 10^7 OB/ml olacak şekilde hazırlandı.

2.1.4. ManeNPV-T2’den Viral DNA Ekstraksiyonu

Saflaştırılan OB’lerden 100 µl alınarak 3 kez 1 ml ddH₂O ile yıkandı ve 300 µl ddH₂O içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Üzerine 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilerek 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra, bu karışıma 150 µl 3 X çözücü tampon (0.3 M Na₂CO₃, 0.03 M EDTA, 0.5 M NaCl, pH 10.9) ilave edildi ve 37 °C’de 30 dk

boyunca bekletilerek virionların (ODV'ler) OB'lerden salınması sağlandı. Karışıma 15 µl nötralizasyon tamponu (1 M Tris, pH 7.0) ve 50 µl %10 SDS ilave edilerek yeniden 37 °C'de 30 dk daha inkübe edildi. Viral DNA, fenol/kloroform ile ekstrakte edilerek etanol ile çöktüldü (Sambrook ve Russell, 2001). Pellet DNA 200 µl TE içinde süspansiyon edildi ve 0.1X TE tampon (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7.5) içinde 4 °C'de 24 saat boyunca diyaliz edildi. DNA'nın konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometrede (Thermo Scientific, NanoDrop 2000) ölçüldü ve DNA'nın saflığı, 260/280 oranının belirlenmesiyle kontrol edildi.

Macrogen (Korea) firmasına gönderilen DNA'nın saflığı Picogreen (Invitrogen, P7589) boyası ile floresan bazlı olan Victor 3 fluorometresi kullanılarak ölçülmüştür. Macrogen, başlangıç genomik malzemesini, bir UV-spektrometre bazlı yöntemden ziyade, bir floresan bazlı yöntem tarafından nicelleştirir. Bunun nedeni, çift iplikçikli DNA'ya özgü bir boya kullanan floresan bazlı yöntemlerin, birçok ortak kirletici madde varlığında bile çift zincir DNA'yı spesifik ve doğru bir şekilde nicelleştirmesidir. Spektrofotometrenin 260 nm dalga boyundaki okumalarına dayanan UV spektrometre yöntemleri, RNA ve genomik DNA preparatlarında yaygın olarak bulunan diğer kontaminantların mevcudiyetine bağlı olarak DNA konsantrasyonunun yüksek çıkmasına neden olabilecek bir yöntemdir.

Ayrıca, DNA'nın durumunu değerlendirmek için hem bizim tarafımızdan hem de Macrogen firması tarafından jel elektroforezinde görüntüleme yapılmıştır. Jel elektroforezi, bir numunedeki DNA'nın durumunu (varlığı veya yokluğu dahil) ortaya çıkarmak için güçlü bir yöntemdir. Bu uygulamada deterjan veya protein kontaminantların, DNA'ya bulaşıp bulaşmadığı açığa çıkarılır. RNA kontaminasyonunun belirlenmesi, genellikle bir jelin dibinde RNA bantlarının görülmesiyle anlaşılır. İlgilenilen bir bantın altında bir bant veya leke, DNA'da bir hasarın olduğunu göstermektedir.

Macrogen firması tarafından bizim isteğimiz doğrultusunda DNA'nın boyut kontrolü yapıldı. DNA parçalarının 1kbp'den küçük olduğunu belirlemek için 2100 Bioanalizer kullanıldı. Bioanalizer DNA kitleri kullanılarak, hazırlanan kütüphanedeki sıraların konsantrasyonu belirlendi ve kütüphane yapımına devam edilip, edilemeyeceğine karar verildi.

2.1.5. ManeNPV-T2 Komple Genom Dizi Analizi ve Verilerin Toplanması

ManeNPV-T2 DNA'sının, saflığı OD260 / OD280'de 1.85 ve konsantrasyonu (35 ng/ μ l) belirlendi. DNA, genom analizleri için MacroGen firmasına (Seoul, Kore) gönderildi. MacroGen firması tarafından dizi analizi aşamasında kullanılacak programlar bizim tarafımızdan belirlendi. Illumina NGS iş akış şeması numune hazırlığı, kütüphane inşası, dizileme ve dizilenen verilerin analiz için ham verilere dönüştürülmesi olmak üzere 4 temel adımı içerir.

Numune hazırlığı yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı. DNA'nın kalite kontrolü (QC) yapıldıktan sonra, kütüphane yapımı aşamasına geçildi. Dizileme kütüphanesi, DNA veya cDNA numunesinin rastgele parçalanması ve ardından 5' ve 3' adaptör ligasyonu ile hazırlandı. Adaptör-ligasyonlu fragmanlar daha sonra PCR ile çoğaltıldı ve jelden temizlendi. Genomik kütüphane hazırlığı için TruSeq DNA PCR-Free kiti (Illumina) kullanıldı. Illumina HiSeq, sistem kontrolü ve RTA (Real Time Analysis. V1.18) adı verilen entegre birincil analiz yazılımı aracılığıyla temel bazların belirlenmesi için HCS (HiSeq Control Software v2.2) kullanılarak ham veriler üretildi. BCL (baz aramaları), illumina paketi bcl2fastq (v1.8.4) kullanılarak FASTQ'a dönüştürüldü. FASTQ, yüksek verimli sıralama yapmak için belirlenen ham dizi verileri üzerinde bazı kalite kontrolleri yapmak için basit bir yol sağlamayı amaçlamaktadır. Daha fazla analiz yapmadan önce, verilerin herhangi bir sorunu olup olmadığının hızlı bir şekilde anlaşılabilmesi için kullanabilecek modüler bir analiz setidir. DNA dizilimi bir HiSeq 2500 System V ve HCS v2.2 dizileme kontrol yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. ManeNPV-T2 örnekleri için toplam baz sayısı, %G+C, %Q20 ve %Q30 değerleri hesaplandı. % Q20, 20'nin üzerinde Phred kalite puanına sahip olan okumaların oranını gösterirken, % Q30 Phred kalite puanı 30'dan fazla olan okumaların oranını göstermektedir. Okumalar, her bir okuma, Q20'ye eşit veya daha büyük baz okuma kalitesine sahip bazların %90'ından fazlasına sahip olacak şekilde montajdan önce filtrelendi. Montaj için SOAPdenovo2 programı kullanıldı. Bu program, grafik yapısındaki bellek tüketimini azaltan, kontig montajında daha fazla tekrarlanan bölgeleri çözen, iskele yapımında kapsama alanını ve uzunluğunu artıran, boşluk kapanmasını geliştiren ve büyük genom birleştirilmelerini optimize edebilen yeni bir algoritma tasarımının avantajına sahiptir. Pilon, referans genom dizisini baz alarak hata düzeltilmesi için kullanıldı.

2.1.6. Açık Okuma Zincirlerinin (ORF) Belirlenmesi

ManeNPV-T2 için tam nükleotid dizisinin ortaya çıkarılması, açık okuma çerçevelerinin (ORF'ler) ve tekrarlanan dizilerin tahmin edilmesi ile gerçekleştirildi. Varsayılan ORF'ler FGENESV0 (Solovyev ve Salamov, 1999) (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) ve NCBI ORF bulucusu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gORF/gORF.html>) kullanılarak tahmin edildi. Minimum 150 bazlık ürün oluşturacak gen bölgeleri belirlendi. Bölgelerin belirlenmesinin ardından ORF'ler genomda buldukları lokasyona göre öncelikle genomun 5' ucundan başlayarak 3' ucuna göre numaralandırıldı. ORF'lerin yerleştirilmesinde literatürdeki verilerden yola çıkılarak polihedrin genini kodlayan bölge 1 numaralı ORF olarak işaretlendi.

2.1.7. Homolog Tekrar Bölgelerinin (hrs) Belirlenmesi

Viral genomlar kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde çeşitli motifler içeren homolog tekrar dizileri (homologous repeat sequences, hrs) içermektedir. Elde edilecek tüm genom sekansının hrs bölgeleri Tandem Tekrarlar Bulucu (Tandem Repeats Finder) (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) programı ve PHOBOS yazılımı ile araştırıldı.

2.1.8. Gen Dizilerinin Dağılımı (Gene Parity-Plots)

Tespit edilecek ve isimlendirilecek genlerin benzerlikleri iki bakülovirüs sınıfından referanslar seçilerek bu referans virüslerin genleri ile karşılaştırıldı ve benzerliklerini gösteren haritalar çizildi. Belirlenen ManeNPV-T2 ORF'leri numaralandırıldı. Hesaplama karşılaştırmasına izin vermek için seçilen HearNPV, TniSNPV, UrprNPV, AcMNPV ve CpGV'nin ORF'leri de numaralandırıldı. Bir numaralı gen polihedrin (granülün) olarak belirlendi. Bu şekilde numaralanan bakülovirüs genomları Microsoft Excel yazılımına girildi. Gene parity-plot analizi olarak adlandırılan işlemde X eksenini bir virüsün gen sırasını Y eksenini diğer virüsün gen sırasını ifade edecek şekilde yer aldı. Bu analizin sonucunda iki tarafta da olan genler ortak düzlemde bulundu. Gene parity-plot sayesinde ManeNPV-T2 ile referans alınan virüsler arasındaki gen organizasyonu arasındaki fark elverişli olarak karşılaştırıldı (Hu vd., 1998).

2.1.9. Fonksiyonel Genlerin Tespiti

Bakülovirüsler, viral replikasyon, transkripsiyon, translasyon, apoptozis inhibisyonu, virüs inşası gibi temel fonksiyonlarda rol alan birçok gen içerir. Ayrıca, işlevleri açıkça tanımlanamamış bazı korunmuş genler de ihtiva ederler. ManeNPV-T2'ye ait ORF'ler taranarak bu işlevlerden sorumlu olan genler sınıflandırıldı ve bir tablo haline getirilerek yerel izolatanın genomunda olan ve olmayan gen bölgeleri tespit edildi.

2.1.10. Filogenetik Analiz

Bakülovirüsler ile yapılan çalışmalar sonucunda bir takım genlerin tüm bakülovirüs üyelerinde korunmuş olduğu belirlenmiştir. ICTV'nin 2018 yılında yayınlanan raporuna göre, bu genler kor gen olarak sınıflandırıldı. Bu genler *ac6*, *ac14*, *ac22*, *ac40*, *ac50*, *ac53*, *ac54*, *ac62*, *ac65*, *ac66*, *ac68*, *ac77*, *ac78*, *ac80*, *ac81*, *ac83*, *ac89*, *ac90*, *ac92*, *ac93*, *ac94*, *ac95*, *ac96*, *ac98*, *ac99*, *ac100*, *ac101*, *ac103*, *ac109*, *ac110*, *ac115*, *ac119*, *ac133*, *ac138*, *ac142*, *ac143*, *ac144* ve *ac148*'dir. Tüm genom dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen ManeNPV-T2 dizisinde bu 38 kor genin varlığı araştırıldı. Kor gen dizilerinin aminoasit dizileri uç uca birleştirilip NCBI veri tabanında bulunan bakülovirüsler ile karşılaştırıldı. Uç uca birleştirme için 38 kor genin amino asit dizileri MegAlign Pro (v.14) üzerinde MAFFT kullanılarak hizalandı (Kato vd., 2002). Kor gen aminoasit dizisi hizalamaları, BioEdit 7.1.3.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Jones-Taylor-Thornton (JTT)'ye dayanan Maksimum Likelihood yöntemi kullanılarak bir filogenetik ağaç inşa edildi.

2.2. Maya İki-Hibrid Sisteminde Etkileşim Deneyleri

2.2.1. ManeNPV-T2'ye Ait Oral Enfektivite Genleri

Oral enfektiviteden sorumlu olan 9 adet gen (*pif0-pif8*) belirlenmiştir (Peng vd., 2012). Bu genler dışında *ac145* geninin de oral enfektiviteden sorumlu olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (Lapointe vd, 2004). ManeNPV-T2 genomunda *ac145* geninden 2 adet belirlenmiştir. Genomda iki homoloğu bulunan *ac145* geninin oral enfektiviteden sorumlu diğer genlerle etkileşiminin belirlenmesi için aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

2.2.2. Primer Tasarımı

Maya iki-hibrid sisteminde *av* (*prey*) ve *yem* (*bait*) vektörler bulunmaktadır. Genlerin ifadesi güçlü promotor olan *ADHI* promotoru altında gerçekleşmektedir. Protein etkileşimlerinin gösterilebilmesi için ifade edilen bu proteinlerin, nükleusa geçerek marker genlerin çalışmasını sağlaması gerekir. Proteinlerde transmembran bölgesi bulunduğu proteinler hücre membranında birikir ve nükleusa geçemez. Aynı zamanda, proteinlerin membranda fazla miktarda birikmesi hücrede toksik etkiye neden olur. Bu nedenle, maya iki-hibrid sisteminde etkileşimi belirlenmek istenen genlerin transmembran bölgeleri çıkarılarak ifade edilmeleri gerekir. Virüste bulunan oral enfektiviteden sorumlu genlerin (*pif0-8*) (*orf20*, *orf111*, *orf117*, *orf102*, *orf75*, *orf8*, *orf52*, *orf81*, *orf66*), *ac145* genleriyle (*orf12*, *orf50*) etkileşimini belirlemek için öncelikle bu genlerin sinyal peptid bölgelerinin ve transmembran domainlerinin varlığı araştırıldı. Bunun için TMHMM yazılımı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) ve SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) kullanıldı. Sinyal peptid ve transmembran bölgeleri bulunan genlerden bu kısımlar çıkarıldıktan sonra primerler tasarlandı (Tablo 8). Primerler, i) pGBK-T7 ve pGAD-T7 vektörlerine uygun kesim bölgelerini içerecek şekilde, ii) okuma dizisinde kayma olmayacak şekilde, iii) baz eklemek gerektiğinde prolin ve stop kodonu kodlamayacak şekilde, iv) primer çiftlerinin hibridizasyon sıcaklıkları ve birbiriyle komplementasyonlarına dikkat edilerek ve v) başlangıç ve stop kodonları da çıkarılarak hazırlandı.

Tablo 8. Maya iki-hibrid sisteminde etkileşim için kullanılacak primerlerin listesi

ORF	Nükleotid çifti (bp)	Motif	<i>Av-yem</i> vektörler için ileri diziler	<i>Av-yem</i> vektörler için geri diziler	Çoğaltılan büyüklük (bp)	Kullanılan enzimler
ac145-1eks	279	SP	GAATTCCATCAGATGCAAAAAG CTTCT	GGATCCCTATCAACAAGTTTCT GTACAAA	228	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
ac145-2eks	366	TM	GAATTCAACAAAAACGACAA GAAAAAC	GGATCCCATCGATGATGTCATT AGTAGG	258	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
pif0-1E	1944	TM	GAATTCGCCACTTTGACCGCC	TTGTAACCGAAAGGATCCCACA AAATTCTAGTCATCGCTTTGG	1272	<i>EcoRI</i>
pif0-2E	1944	TM	CCAAAGCGATGACTAGAATTT TGTGGGATCCTTTTCGGTTACAA	CTCGAGCCAAGAGATATATCAG TGCGGC	447	<i>XhoI</i>
pif1-E	1602	TM	GAATTC CGAGTCAATTATGAA CCTATCGC	GGATCC CAAGAATCGAATAGTT GGGATACGT	1527	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
pif2-E	1155	TM	GAATTC GCATCGAGCGATT AGG	GGATCC CACTATTTTGTGGTAC CGGTC	1086	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
pif3-E	639	TM	GAATTC CGATTGGTTCAAGAT CATCTCGAT	GGATCC CCACGACGTCGTAAAT TGTGGA	540	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
pif4-E	516	TM	GGATCC TTCCCTACCGAAACG CCG	CTCGAG CCCTTAATATGAACAAA ACCGCCGT	429	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>
pif5-1E	1104	TM	GAATTC AGCTTTTTTACAAATT TACGGC	ACATTTTGTCTGATTCATTATCTT TTTGTTGCTAGAGCTAGCGC	948	<i>EcoRI</i>
pif5-2E	1104	TM	GCGCTAGCTCTAGCAACAAAA AGATAATGAATCAGCAAAATG T	CTCGAG CACGTCGCAAATTCAT ATATGT	53	<i>XhoI</i>
pif6-1E-Fw	411	TM	GAATTC GATTTTATTAATGG AGAATTTTAAACG	GCCATCGTTCTTATCGGCAGATT TTAAAGTTAAACTGACCG	279	<i>EcoRI</i>
pif6-2E	411	TM	CGGTCAGTTTAACTTTAAAATC TGCCGATAAGAACGATGGC	GGATCC CTTGCGTATCAGCTGC AG	53	<i>BamHI</i>
pif7-E	171	TM	GAATTC AAATTGAATAAACAG CAT	GGATCC CCAAAGTTTTCAAATT ATGT	102	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
pif8-E	2481	TM	GGATCC TTGAATTTAACGAAA TAGAATTCAAC	CTCGAG CCTTGTAATGTTCCAA AAAATACA	2406	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>

2.2.3. Elektrokompotent Hücrelerin Hazırlanması

Escherichia coli DH10 β hücrelerinin büyütüldüğü petriden tek bir koloni alınarak NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aşılandı ve 16 saat büyütüldü. Bu kültürden LB sıvı besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 600 nm dalga boyunda yoğunlukları 0.6-0.9 olana kadar 37 °C'de büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu bu yoğunluğa ulaşıncaya kadar kültür tüplere alınarak 30 dk buz üzerinde bekletildi. Ardından 4000 rpm'de 4 °C'de, 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan sıvı kısım atıldı. Çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti soğuk %10'luk gliserolde çözüldü, 5000 rpm'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Üst kısım tekrar atıldı ve çökelti %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Kompetent hücreler 50 μ l'lik hacimlerde mikrosantrifüj tüplerine bölündü ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.4. ManeNPV-T2'ye Ait *ac145* ve Oral Enfektiviteden Sorumlu Genlerin PCR ile Çoğaltılması ve Ara Vektör pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

ManeNPV-T2'ye ait oral enfektiviteden sorumlu 9 gen ve 2 adet *ac145* geni olmak üzere toplam 11 adet gen doğrulama aktivitesi bulunan Phusion DNA polimeraz (Finnzymes) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile aşağıdaki koşullarda çoğaltıldı. PCR reaksiyonu 1 μ l ManeNPV-T2 DNA'sı (10ng), 10 μ l 5 X PCR reaksiyon tamponu, 3 μ l MgCl₂ (25mM), 1 μ l dNTP karışımı (her birinden 10 mM), her bir primerden 1.5 μ l (10mM), 0,5 μ l Taq DNA polimeraz (5U/ μ l) ve ddH₂O ile son hacim 50 μ l'ye tamamlanarak hazırlandı. PCR koşulları 98 °C'de 30 sn denatürasyondan sonra 98 °C'de 10 sn, 55-65 °C (primerlere uygun sıcaklıklarda) arasında 30 sn ve 72 °C'de 1 dk şeklinde 35 döngü halinde tamamlandı. Son olarak 72 °C'de 10 dk bekletilerek eksik kalan hibridizasyon reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve uygun büyüklüğe sahip DNA bantları jelden temizleme kiti (Nucleospin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) ile agaroz jelden temizlendi. Jelden temizlenen DNA sıralarının konsantrasyonları belirlendi. Kullanılan enzim, reaksiyon sonunda küt uç oluşturduğundan, sarkık uçlu pGEM[®]-T'ye klonlamak için yeni bir reaksiyonla PCR ürünlerinin 3' ucuna A'lar takıldı. Bu işlem için hazırlanan reaksiyona 7.5 μ l DNA (jelden

temizlenen sıraların, 200ng), 2 µl 5 X Taq Tampon, 0.5 µl dATP, 1.5 µl MgCl₂ ve 0.5 µl Taq DNA polimeraz eklendi. Karışım 70 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra klonlama için gen ve vektör oranı 1:3 olacak şekilde pGEM[®]-T Easy (Promega) klonlama kiti kullanılarak genlerin pGEM[®]-T Easy vektöre ligasyonu yapıldı. Ligasyon ürünlerinin önceden hazırlanan kompetent *E. coli* DH10β hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Çıkan rekombinant kolonilerin doluluğu koloni PCR ile kontrol edildi. Reaksiyona 4 µl 5 X Green Go-Taq tamponu, 0.4 µl 10 mM dNTP, 1.2 µl 25 mM MgCl₂, 0.8 µl pGEM-T ye özgü ileri ve geri primerler, 0.1 µl Go-Taq DNA polimeraz (Promega) ve dH₂O eklenerek, hacmi 20 µl'ye ayarlandı. Transformasyon petrisinde oluşan koloniler hazırlanan karışıma kürdanla aktarıldı. PCR koşulları 95 °C'de 2 dk, denatürasyondan sonra 95 °C'de 1 dk, 55-65 °C (primerlere uygun sıcaklıklarda) arasında 30 sn ve 72 °C'de 1 dk şeklinde 35 döngü ve 72 °C'de 5 dk hibridizasyon olarak belirlendi. Bu koşullarda PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri jelde yürütülerek klonlanan geni içerdiği belirlenen kolonilerden birer tane klon seçildi, bunlardan plazmit izolasyonu Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System kiti (Promega, USA) ile yapıldı ve *EcoRI* enzimi ile kesilerek klonlamanın doğruluğu teyit edildi.

2.2.5. Oral Enfektiviteden Sorumlu Genlerin ve *ac145* genlerinin *Av* ve *Yem* Vektörlerine Klonlanması

Genler klonlandıktan sonra genleri içerdiği doğrulanan pGEM[®]-T Easy vektörleri ve *av* (pGAD-T7) ve *yem* (pGBK-T7) vektörleri Tablo 8'de belirtilen enzimler ile kesildi. Kesim reaksiyonu 1.5 µg DNA, 10 X restriksiyon enzim tamponundan son hacmin 1/10'u kadar ve enzimlerin her birinden 5U kullanılarak oluşturuldu. Karışım 37 °C'de 3 saat kesime bırakıldı ve sonra klonlanacak gen ve vektörler %1'lik agaroz jelde yürütüldü. İstenilen enzimle kesildiği belirlenen vektör ve genler kit (Nucleospin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel) kullanılarak jelden temizlendi. Ligasyonlarda kullanılacak genlerin nanogram miktarını belirlemek için formül kullanıldı: (Reaksiyonda kullanılacak vektörün nanogram miktarı x 5) / (vektörün baz çifti uzunluğu / klonlanacak genin baz çifti uzunluğu). Ligasyon reaksiyonu karışımı, 50 ng vektör DNA'sı, klonlanacak gen DNA'sı, son hacmin yarısı kadar 2X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz, 1 µl 10 mM ATP ve dH₂O ile hazırlandı. Ligasyonlar, vektör:klonlanacak gen oranı 1:5 olacak şekilde kuruldu ve transformasyonları yapıldı. Ligasyon ürünü +4 °C'de bir gece inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra elektrotransformasyonla *E. coli* DH10 β hücrelerine aktarıldı. Transformasyon petrilerinde oluşan klonlardan, geni içerenleri tespit etmek için 6-12 koloni seçilerek plazmidde özgü ileri ve gene özgü geri primerler kullanılarak koloni PCR ile kontroller yapıldı. PCR sonucu, içinde gen tespit edilen kolonilerden Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System kiti (Promega, USA) ile plazmid DNA'ları izole edildi. Bu DNA'lar uygun restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek doğruluğu teyit edildi. Dolu olduğu belirlenen klonlar DNA dizi analizine gönderildi (Macrogen, Hollanda).

2.2.6. Maya Hücrelerinden Kompotent Hazırlanması

AH109 maya suşu (-80 °C) YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; 20 gr Difco Pepton, 10 g yeast extract, 950 ml dH₂O, pH: 6,5, otoklavdan sonra 50 ml steril %40 dekstroz çözeltisi ilave edilir) agara ekildi. Maya hücrelerinin büyümesi için 1-2 hafta beklendi. Çapı 1-2 cm olan kolonilerinden 50 ml YPD besiyerine inokülasyon yapıldı. Bu maya hücrelerinin absorbansı (OD₆₀₀) 1.5'i geçene kadar 30 °C'de 250 rpm'de yaklaşık 16-18 saat arasında çalkalanarak inkübe edildi. İstenilen absorbansa ulaşan gece kültüründen OD₆₀₀'de 0.2-0.3 olacak şekilde 100 ml YPD besiyerine inoküle edildi. OD₆₀₀'de 0.4-0.6 arasına gelene kadar 230 rpm'de 30 °C'de 3 saat inkübe edildi. Büyütülen kültür 50 ml'lik tüplere alınarak 1000 x g'de 20 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Kalan 50 ml kültür pellete eklendi ve yeniden aynı şekilde santrifüj edildi. Oluşan çökelti üzerine 25 ml steril dH₂O ilave edilerek hücreler yıkandı ve aynı şekilde yeniden santrifüj edildi. Kültürün santrifüjü esnasında 1X TE/1X LiAc (1 ml 1 M Lityum asetat, LiAc, 1 ml 10 X TE tampon, 8 ml dH₂O) tamponu hazırlandı. Pellet bu taze hazırlanan (1X TE/1X LiAc) tampon ile çözülerek kompotent hücreler hazırlandı. *Yem* plazmitlerinin transformasyonu için hazırlanan maya kompotent hücreleri 1 saat içerisinde kullanıldı.

2.2.7. *ac145* Genlerini İçeren *Yem* Vektörlerinin Kompotent Maya Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon işleminin doğruluğu için pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Yaban tip GAL4 proteinini kodlamakta olan pCLI plazmidini içeren JM101 hücreleri ampisilin içeren LB (Luria-Bertani; 5 gr yeast extract, 10 gr NaCl, 10 gr tripton) besiyerine

ekim yapılarak büyütüldü. Aynı zamanda negatif kontrol olarak pGBK-T7 Lam plazmidini (insan lamin proteinini kodlamakta) içeren JM101 hücreleri kanamisinli LB besiyerinde büyütüldü. Büyütülen kültürlerden gece kültürü atılarak plazmid izolasyonu yapıldı.

Ependorf tüplere 150 µl AH109 kompetent hücre eklenerek, *ac145-1* ve *ac145-2* genlerini içeren her bir pGBK-T7 vektörü (*bait*, *yem* vektörler) 100 ng olacak şekilde üzerlerine eklendi ve iyice vortekslenildi. Üzerine 600 µl steril yeni hazırlanmış PEG/LiAc (polietilen glikol/lityum asetat; 1 ml 1 M lityum asetat pH 7.5, 1 ml 10X TE tampon, 8 ml %50 PEG4000) çözeltisi ilave edildi. Vorteksle en yüksek hızda karıştırıldı. Karışım 200 rpm'de ve 30 °C'de 30 dk çalkalanarak inkübe edildi. Karışımın üzerine yavaşça 70 µl DMSO ilave edildi ve ependorflar yavaşça alt-üst edildi. Isı şoku uygulaması için hücreler 42 °C'de 15 dk bekletilerek buz üzerine alındı. Daha sonra 14.000 rpm'de 21 °C'de 5 sn santrifüj edildi. Pellet, içerisine 2 µl D-Glukoz eklenmiş 100 µl YPD içerisinde çözüldü. Karışım, yeni hazırlanan triptofan negatif sentetik agar besiyeri içeren petrilere ekildi.

2.2.8. *Av* Vektörlerinin *Yem* Vektörlerini İçeren Maya Hücrelerine Transformasyonu

Yem plazmitlerini içeren maya hücrelerinden yeni kompetent hücreler hazırlandı. İlk önce bu hücreler triptofan negatif besiyeriye inoküle edildi ve OD₆₀₀ >1.5 olacak şekilde büyütüldü. Daha sonraki işlemler Bölüm 2.2.6'da belirtildiği gibi yapıldı.

Hazırlanan kompetent hücrelerden (*yem* vektörlerini içeren) 150 µl ependorf tüplere bırakılarak üzerine oral enfektiviteden sorumlu genleri içeren pGAD-T7 vektörlerinden 100 ng olacak şekilde eklendi. Karışım iyice vortekslenildi. Karışıma yeni hazırlanmış steril 600 µl PEG/LiAc çözeltisi ilave edildi ve vorteksle en yüksek hızda karıştırıldı. Ependorf tüpler 30 °C'de 200 rpm'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Sonra karışımın üzerine 70 µl DMSO yavaşça ilave edildi ve tüpler yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı. Isı şoku için karışımlar 42 °C'de 15 dk bekletildi ve ardından 1-2 dk buz üzerine alınarak bekletildi. Ardından 14.000 rpm'de 21 °C'de 5 sn santrifüj edildi. Oluşan pellet YPD besiyeri içerisinde çözümlenerek adenin, histidin, lösin, triptofan negatif SD agar besiyeri içeren petrilere ekimi yapıldı. Negatif kontrol olarak *yem* plazmidleri içeren maya hücrelerine oral enfektiviteden sorumlu genleri içermeyen pGAD-T7 vektörü transform edildi.

2.2.9. pGBK-T7 Vektörlerini İçeren (*ac145-1*, *ac145-2*) Mayalardan Protein İzolasyonu

Triptofan negatif (Trp-) 10 ml sıvı besiyerine *yem* vektörlerini içeren maya kolonileri inoküle edildi. Gece boyu 30 °C'de büyütülen kültürlerden 50 ml Trp- besiyerine aşılandı. Maya hücreleri, OD₆₀₀'de 0.4-0.6 olana kadar büyütüldü. OD₆₀₀ değerleri not edilerek maya hücreleri buz üzerine alındı. Kültürler 50 ml'lik tüpler içerisinde 1000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan pellet 30 ml dH₂O ile yıkandı ve yeniden santrifüj edildi. Yıkanan pellet sıvı azot içinde hızlıca dondurularak -80 °C'de muhafaza edildi. Hücrelerin OD₆₀₀ dalga boyundaki değerleri (Absorbans x 50 ml) hesaplandı. OD₆₀₀'deki her 7.5 absorbans değeri için hücrelerin üzerine 50 µl 100 X PMSF (0.1742 g PMSF 10 ml isopropanolde çözülür) ve 100 µl parçalama tamponu [1 ml parçalama tamponu stok çözeltisi (%5 SDS, 8 M üre, 0.1 mM EDTA, 40 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.4 mg/ml bromofenol mavisi)], 10 µl β-merkaptoetanol ve 70 µl proteaz inhibitör çözeltisi (2.1 mg/ml aprotinin, 200 mM benzamidin, 10.5 mM leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A) ilave edildi. Karışıma 200 µl cam tozu (425-600 µm, Sigma) eklendi. İnkübasyon için 70 °C'de 10 dk bekletildi. Sonra karışım 1 dk vortekslendi ve 14.000 rpm'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz alındı, hızlı bir şekilde kaynatılarak %10'luk poliakrilamid jele yüklendi.

2.2.10. *Yem* Proteinlerinin Western Blot Analizi

ac145 genlerini içeren pGBK-T7 vektörlerinin maya hücrelerinde ifade edilip edilmediğinin tespit edilmesi için Western blot hibridizasyonu gerçekleştirildi. Bunun için vektörde buluna c-Myc kuyruğu ile hibrid oluşturacak olan monoklonal c-Myc antikoru (9E10, Santa Cruz Biotechnology) kullanıldı.

Poliakrilamid jeldeki proteinlerin immobilon membrana aktarımı için yarı-kuru elektroforetik cihaz (semi-dry blotting system) kullanıldı. Bu işlem için whatman kâğıtları ve immobilon-P membranı poliakrilamid jel büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesildi. Whatman kâğıtları transfer tamponunda ıslatıldıktan sonra 2 whatman kâğıdı, 1 immobilon-P membranı, poliakrilamid jel ve 2 whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla cihaza yerleştirildi. Cihaz 40 miliamperde 1.5 saat çalıştırıldı. Membran %0.3'lük süt tozu (1 X PBS'de hazırlanmış) içinde 2 dk yıkandıktan sonra 3 saat oda sıcaklığında %3'lük süt tozu içinde bloke edildi. Daha sonra membran %0,3'lük süt tozu içinde 3 kez 10'ar dk

yıkandı. Membran primer antikoru (1:1000 sulandırma) içeren %0.3'lük süt tozu içinde 1 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Tekrar %0.3'lük süt tozu içinde 3 kez 10'ar dk yıkandı. Alkalın fosfataz (AP) bağlı sekonder antikor (Anti-Mouse IgG, Sigma, A3562) (1:1000 sulandırma) %0.3'lük süt tozu içine eklenerek membran ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonu sağlandı. Sonra %0.3'lük süt tozu içinde membran 3 kez 10'ar dk yıkandı ve tekrar 10'ar dk 2 kez AP tamponu içinde yıkanması sağlandı. Ardından boyama için 10 ml AP tamponu içine 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stok solusyonu, Roche, 11681451001) solusyonu eklenerek membran üzerine ilave edildi. Bantlar görüntüledikten sonra reaksiyonu durdurmak için membran dH₂O ile yıkandı.

2.2.11. Etkileşimlerin Pull-Down Analiziyle Teyit Edilmesi

Bulunan etkileşimlerin doğruluğunun tespit edilmesi, bilginin güvenilirliği için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, tespit edilen protein etkileşimleri, genetik bir yol olan maya iki-hibrid yöntemiyle tespit edilmesinin yanı sıra biyokimyasal bir metod olan GST-pull down analiziyle de doğrulandı. Bütün etkileşimlerin doğrulanması maliyetli ve zaman alıcı olacağından sadece bir veya birkaç etkileşimin doğrulanması hedeflendi. Bu çalışmada sadece iki etkileşimin doğrulanmasına yönelik olarak *ac145-1* geninin pET28-a vektörüne ve *pif-6* ile *pif-8* genlerinin de pGEX-2T vektörüne klonlanması sağlandı.

ac145-1 geni N-terminali HA (hemaglutinin) kuyruk içeren primer sayesinde pET28-a vektörüne klonlanarak bakteriyel sistemde ifade edildi. Bunun için *ac145-1* genini çoğaltmak amacıyla kullanılan geri primere, HA kuyruk sırası (AGCGTAGTCTGGG ACGTCGTATGGGTA) ilave edildi. Doğrulama aktivitesi bulunan DNA polimeraz enzimiyle genler çoğaltıldı ve pGEM[®]-T Easy ara vektörüne Bölüm 2.2.4'te anlatıldığı şekilde klonlandı. Daha sonra *ac145-1* genini içeren pGEM[®]-T Easy ve pET28-a vektörü *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle Bölüm 2.2.5'da belirtildiği gibi kesildi ve ligasyon reaksiyonu gen:vektör oranı 1:3 olacak şekilde kuruldu (Hegedus vd., 2003).

pGEX-2T vektörü, çoklu klonlama bölgesinin (MCS) yukarısında glutation S transferaz (GST) geni ve güçlü bir promotor içermektedir. GST ve MCS'ye klonlanan gen füzyon oluşturarak ifade edilmektedir. Genleri taşıyan pGEM[®]-T Easy ve pGEX-2T vektörleri *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle Bölüm 2.2.5'da belirtildiği gibi kesildi ve ligasyon reaksiyonu gen:vektör oranı 1:3 olacak şekilde kuruldu.

Klonlama işlemlerinden sonra transformasyon için *E. coli* BL21-DE3 hücreleri kompetent hale getirildi. Bu nedenle, *E. coli* BL21-DE3 suşu LB besiyerinde büyütüldü. Hücreler, Bölüm 2.2.4'te belirtilen yönteme göre elektrokompotent haline getirildi (Danismazoglu vd., 2018).

Rekombinant vektörlerin analizi için genlerin füzyon halinde bulunduğu vektörler elektrokompotent haline getirilen *E. coli* BL21 hücrelerine elektroporatör cihazı (BioRad) kullanılarak transform edildi. Kontrol amaçlı pGEX-2T ve pET28a vektörleri de *E. coli* BL21 hücrelerine transform edildi. Rekombinant vektörlerin doğruluğunun analizi için, uygun restriksiyon enzimler kullanılarak Bölüm 2.2.5'de açıklandığı gibi kesim yapıldı.

Rekombinant vektörlerin analizinden sonra aşağıda anlatıldığı şekilde protein ekspresyonu ve GST-pull down analizi deneyleri gerçekleştirildi.

2.2.12. Proteinlerin Bakteriyel Sistemde İfadesi

pET28-a vektörünü içeren *E. coli* BL21 hücreleri 100 µg/ml kanamisinli ve pGEX-2T vektörünü içeren *E. coli* BL21 hücreleri 100 µg/ml ampisilinli 2 ml LB sıvı besiyerlerinde 37 °C'de gece boyu büyütüldü. Gece kültürlerinden, 5 ml antibiyotik içeren LB besiyerlerine 1:100 oranında aşılandı. Hücreler OD₆₀₀ absorbans değeri 0.5 oluncaya kadar büyütüldü. İndüklemek için son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edildi ve 30 °C'de 3 saat inkübe edildi. Her bir hücreden mikrosantrifüj tüplerine 1.5'er ml aktarıldı ve 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Pellet -20 °C'de gece boyu inkübe edildi ve hücreler ertesi gün 500 µl dH₂O'da çözüldü. Daha sonra 3 kez 1 dk'lık sonikasyon işlemi ile patlatıldı. Patlatılan hücreler 13.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra pellet (çözünemeyen proteinler) ve üst sıvı (çözünebilir proteinler) ayrı ayrı %10'luk SDS-PAGE'de yürütüldü.

2.2.13. GST-Pull-Down Analizi ile Etkileşen Proteinlerin Tespiti

Bölüm 2.2.12'te anlatıldığından farklı olarak proteinler 100 ml LB besiyerinde ifade edildi. Proteinlerin çözünebilir kısımları kullanılabildiği kadar -80 °C'de muhafaza edildi. pET28-a ve pGEX-2T vektörleri tarafından *E. coli* BL21 hücrelerinde ifade edilen yem AC145-1 ve av PIF 6 proteinlerinden 200 µl alınarak bir ependorf tüpünde karıştırıldı ve

rotatorda (SB3, Stuart®) 12 rpm'de +4 °C'de 3 saat döndürülerek inkübasyona bırakıldı. Yem AC145-1 ve av PIF 8 içinde aynı şekilde inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra, protein saflaştırması GST kuyruğa göre glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) kullanılarak yapıldı. Glutathione sepharose 4B (rezin) iyice çalkalandıktan sonra 150 µl bio-spin kromotografi kolonuna (BioRad) konuldu. Rezinin içerdiği EtOH akıtıldıktan sonra rezin 7 ml 1 X PBS ile yıkandı. Kolonda kalan 120 µl rezin 120 µl 1 X PBS içinde çözüldü. Önceden karıştırılan protein lizatları, 240 µl olan rezinin üstüne ilave edildi. Protein örneklerinin ve rezinin karışması için kromotografi kolonlarının kapakları kapatılarak rotatorda 12 rpm'de +4 °C'de 30 dk yavaşça döndürülerek inkübe edildi. Kontrol amaçlı olarak inkübasyondan sonra kolonlardaki sıvı ependorf tüplere aktarıldı ve kolonlar 15 ml 1 X PBS ile yıkandı. PBS akıtıldıktan sonra kolona 100 µl toplama tamponu [1 ml son hacim içinde 50 µl 1M Tris HCl pH 8 ve 3,0733 mg glutathione reduced (Sigma, G4251)] ilave edildi ve 10 dk'lık inkübasyondan sonra sıvı ependorf tüplere akıtıldı. Akıtılan örnek %10'luk SDS-PAGE'de yürütüldü. Western blot hibridizasyonu için hazır hale getirildi.

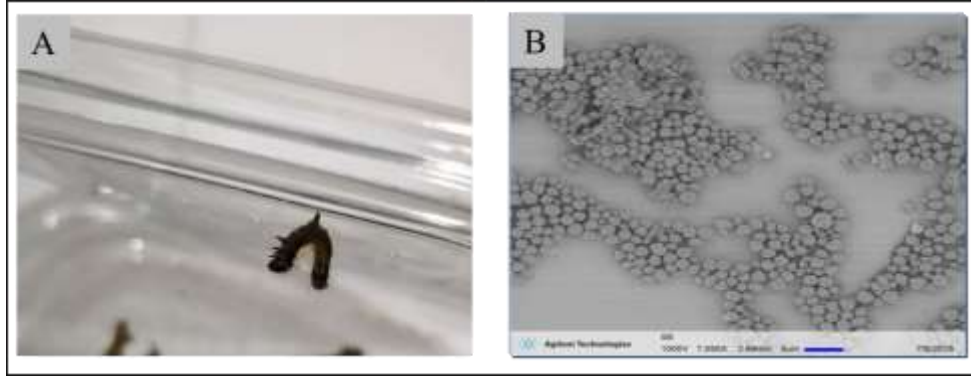
GST kuyruk ile saflaştırılan PIF-6 ve PTF-8 proteinleri ile birlikte AC145-1 proteinlerinin de saflaştığını görüntüleyebilmek için HA kuyruğuna özgü (HA-Tag Antikor, Thermo Fisher, 71-5500) antikorlarla Western blot hibridizasyon analizi yapıldı. Bunun için Bölüm 2.2.10'daki metotlar uygulandı. Sekonder antikor olarak alkalın fosfataz (AP) bağlı Anti-Rabbit IgG Antikor (Merck, AP132A) kullanıldı.

3. BULGULAR

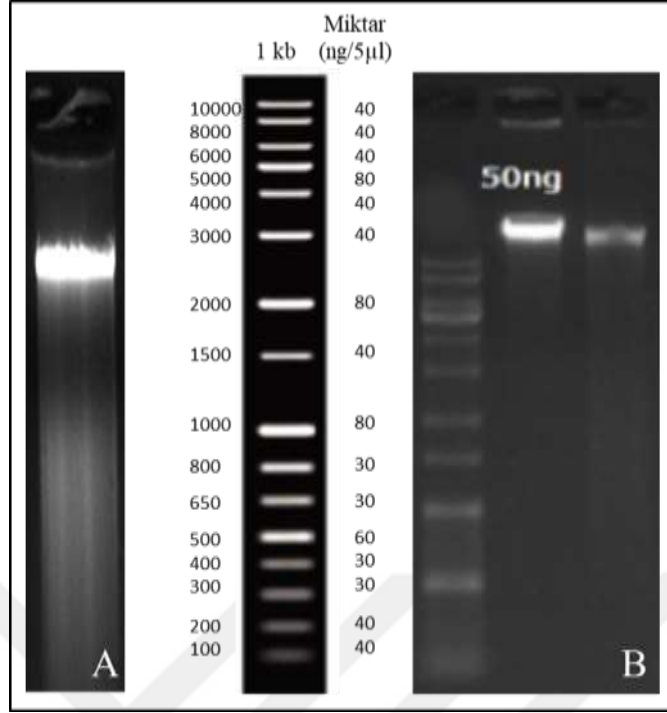
3.1. ManeNPV-T2 Genom Analizi ile İlgili Çalışmalar

3.1.1. Virüsün Çoğaltılması ve Konsantrasyon Tayini

ManeNPV-T2 virüsü, arazi çalışmaları sonucunda toplanan *M. neustria* 3. evre larvalarında çoğaltıldı. Virüslerle enfekte olmuş, sıvılaşarak ölmüş (Şekil 5A) ve ışık mikroskopuyla OB'leri içerdiği tespit edilmiş larvalar toplanarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Sukroz gradienti ile saflaştırılan OB'lerin taramalı elektron mikroskopuyla tespiti yapıldı (Şekil 5B). Daha sonra, OB stoğundan alınarak toma lamında OB'lerin konsantrasyonu 3.2×10^9 OB/ml olarak hesaplandı. OB stoğundan izole edilen DNA'lar kullanılmak üzere $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Dizileme firmasına gönderilecek DNA örnekleri agaroz jelde görüntülendi (Şekil 6A). Dizilemeye geçmeden önce, ilgili firma tarafından DNA kalitesi tekrar jele yüklenerek kontrol edildi (Şekil 6B). DNA konsantrasyonunun doğruluğunun anlaşılması için miktarı bilinen (50 ng) DNA, firma tarafından kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 5. Çoğaltılan OB'lerin makroskobik ve mikroskobik kontrolü. A: ManeNPV-T2 tarafından enfekte edilen *M. neustria* larvaları. B: Enfekte larvalardan izole edilen ManeNPV-T2 PIB'lerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü



Şekil 6. Dizileme analizi için kullanılan DNA. A: İzole edilen DNA görüntüsü. B: MacroGen firmasının kontrolü

Tarafımızdan nanodropta ölçülen DNA'nın temizlik oranı OD260/OD280'de 1.85 ve konsantrasyonu da 40.1 ng/µl olarak belirlendi. DNA'nın MacroGen firması tarafından fluorometre ile ölçülen miktarı ise 35 ng/µl olarak belirlendi (Tablo 9). TruSeq DNA PCR-Free kitinin (Illumina®) kullanımı için gerekli olan konsantrasyon > 20 ng/µl, toplam hacim >100 µl ve toplam miktar > 2 µg olmalıdır. Tablo 9'daki değerler, gönderdiğimiz DNA'nın shotgun kütüphanesinin TruSeq DNA PCR-Free kitiyle oluşturulmasına uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 9. ManeNPV-T2 DNA'sının firma tarafından belirlenen sonuçları

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/ µl)	Hacim (µl)	Toplam miktar (µl)	Sonuç
ManeNPV	35.764	120	4.292	Geçti

3.1.2. ManeNPV-T2 Genomunun Ham Veri İstatistikleri

Genomun toplam baz sayısı belirlendi, okumalar yapıldı ve % G+C, % Q20 ve % Q30 değerleri hesaplandı. ManeNPV-T2 DNA'sı kullanılarak, 19.470.538 okuma yapıldı. Bu toplam okumadaki baz sayısı 2.0 giga baz çiftidir. Ham verilerin G+C içeriği % 38.24 ve Q30 değeri % 92.52'dir (Tablo 10).

Tablo 10. ManeNPV-T2 genomuna ait işlenmemiş veriler

Örnek adı	Toplam okunan baz (bp)*	Toplam okuma sayısı**	% GC	% AT	% Q20	% Q30
ManeNPV-T2	1,966,524,338	19,470,538	38.24	61.76	95.38	92.52

*Toplam okunan baz: Dizilenmiş bazların toplam sayısı.

**Toplam okuma: Okumaların toplam sayısı. İllumina iki yönlü okumaların toplam sayısıdır.

3.1.3. ManeNPV-T2 Genomunun Dizilenmesinin Kalite Kontrolü

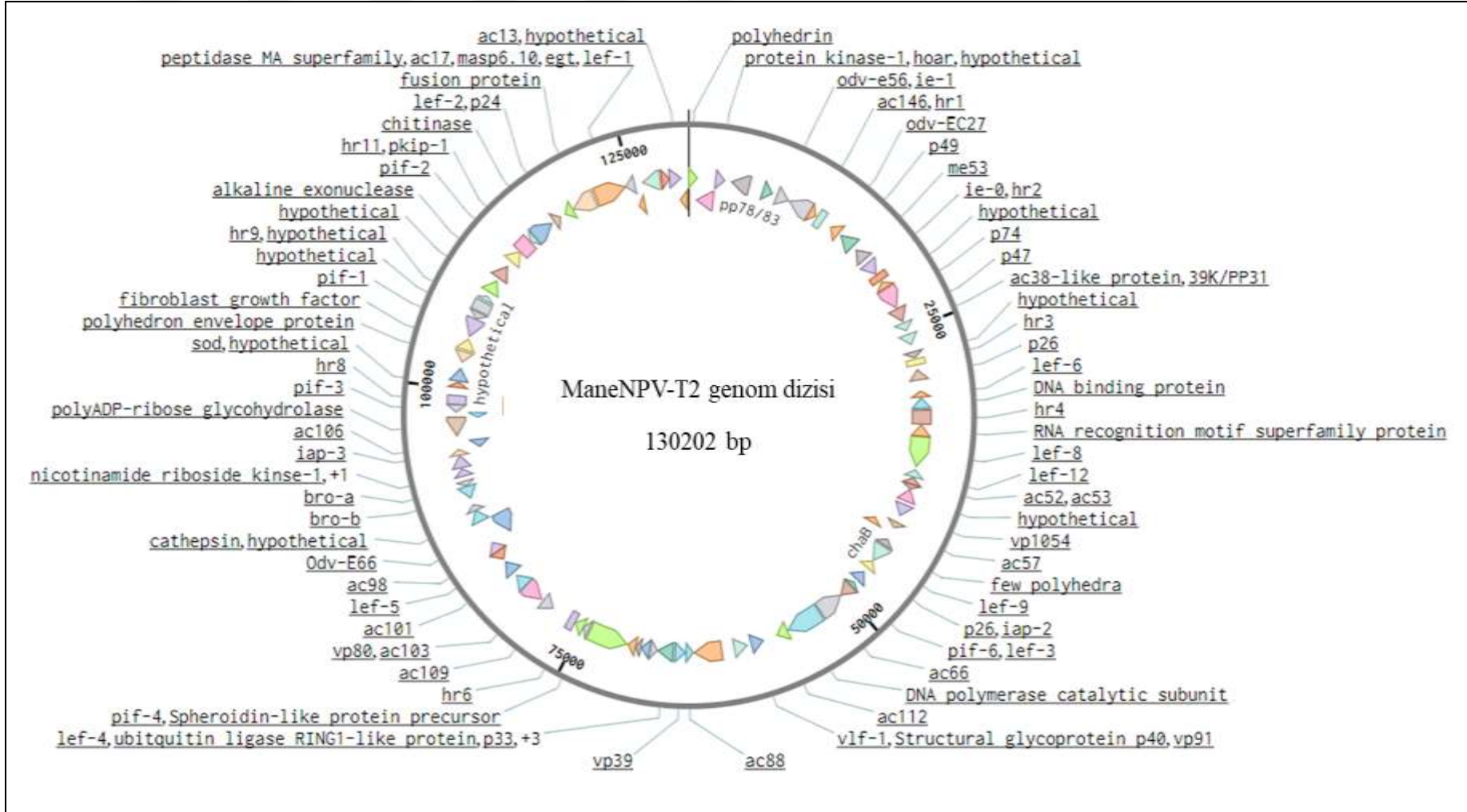
Macrogen firmasına gönderilen DNA'nın dizilenmeye uygun olduğu tespit edildikten sonra dizilemeye geçildi. Genom 101 bazlık parçalara ayrıldı ve diğer dizi analizlerine geçmeden önce 101 baz şeklinde okunan dizilerin kaliteleri kontrol edildi. Okunan dizilerin birleştirilmesi firma tarafından yapıldı. FastQC, dizilenen 101 bazlık sekansların ham hallerinin baz kalite kontrollerini yapmak için kullanıldı (Şekil 7). Uçlarına adaptör takılarak filtrelenmiş verilerin doğruluğu aynı zamanda Phred kalite puanlamasına göre de kontrol edildi (Şekil 7).

Tablo 11. Phred kalite kontrol puanlarının hata oranları

Phred skor kalitesi	Gelen okumalardaki hata ihtimalleri	Gelen okumaların doğruluk oranları	Karakterler
10	10'da 1	%90	!"#\$%&'()*+,-./123456789:;h=i?@ABCDEFGHIJ
20	100'de 1	%99	!"#\$%&'()*+,-./123456789:;h=i?@ABCDEFGHIJ
30	1000'de 1	%99.9	!"#\$%&'()*+,-./123456789:;h=i?@ABCDEFGHIJ
40	10.000'de 1	%99.99	!"#\$%&'()*+,-./123456789:;h=i?@ABCDEFGHIJ

3.1.4. ManeNPV-T2 Genomunun Özellikleri

Okunan kısa dizilerin toplanması sonucunda tek parça DNA (kontig) oluşturuldu. ManeNPV-T2 dizileme verilerinin birleştirilmesi sonucunda, genomun G+C içeriğinin Tablo 10 ile uyumlu olarak % 38,2 ve genom büyüklüğünün de 130.202 bp olduğu belirlendi. Dizinin bilim dünyasında kabul görmesi için NCBI (National Center for Biotechnology Information: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) GenBank'a kaydedilmesi ve kaydedilen dizinin yetkililer tarafından onaylanması gerekmektedir. ManeNPV-T2'nin genom dizi sırası, NCBI sistemine girildi ve merkez tarafından verilen KY968317 erişim numarasıyla genom dizilemesi tescillendi. Dizinin ilk nükleotidi, bakülovirüs genomları için gelenek olduğu gibi, polh (polihedrin) translasyon başlatma kodununun birinci adenini olarak belirlendi (Vlak ve Smith, 1982; Ijkel vd., 1999). Birbirinin üzerine hiç çakışmayan ya da küçük çakışmaları olan 150 bp ve daha uzun gen bölgesini kodlayan kısımlar potansiyel açık okuma zincirleri (ORF) olarak tanımlandı. Buna göre, ManeNPV-T2 genomunun varsayılan 131 ORF içerdiği belirlendi. Tanımlanan ORF'ler, Şekil 9'da gösterilen dairesel genom haritasındaki oklarla belirtilmiştir.



Şekil 9. ManeNPV-T2 genomunun dairesel haritası. Oklar ORF'lerin transkripsiyon konumunu, boyutunu ve yönünü göstermektedir. ORF numaraları ve gen adları dairenin etrafında gösterilmektedir.

ORF'ler, genom boyunca DNA'nın her iki şeridi üzerinde neredeyse eşit olarak dağılmıştır. Yani, 62 ORF saat yönünde ve 69 ORF saat yönünün tersi istikametindedir. ManeNPV-T2 ORF'lerinin Alfabakülovirüs Grup I (AcMNPV), Grup II (TniNPV, HearNPV ve Urbanus proteus nucleopolyhedrovirus, UrprNPV) ve Betabakülovirüs (Cydia pomonella granülovirüs, CpGV) ORF'leri ile karşılaştırılması Tablo 12'de verilmiştir. ManeNPV-T2'nin 131 ORF'sinden 104'ü diğer bakülovirüs ORF'lerine benzemektedir ve bunların diğer bakülovirüslerde homologları bulunmaktadır. Geriye kalan 27 ORF'nin işlevi bilinmemektedir ve bu nedenle, bu ORF'ler hipotetik olarak adlandırıldı. ManeNPV-T2 genomu, şimdiye kadar her bakülovirüs genomunda tanımlanmış olan tüm kor genleri, alfa ve beta bakülovirüslerin genomlarında tanımlanan 26 ORF'yi içermektedir (Tablo 12).



Tablo 12. ManeNPV-T2 genomunda tanımlanan ORF'ler. ORF uzunlukları nükleotitler (nt) ve aminoasitler (aa) olarak verilmektedir. ManeNPV-T2 ve AcMNPV, TniSNPV, HearNPV, UrprNPV ve CpGV'nin ORF numaraları ve parantez içerisinde aminoasit benzerlik oranları gösterilmektedir. Pozisyonadaki oklar ORF'nin yönünü belirtmektedir.

ORF'nin Sırası	ORF'nin Adı	Pozisyon	Uzunluk (nt)	Uzunluk (aa)	ORF No (% aa benzerliği)				
					AcMNPV	TniSNPV	HearNPV	UrprNPV	CpGV
					NC_001623	NC_007383	KJ701033.1	NC_029997.2	NC_002816
1	<i>polh</i>	1 → 741	741	247	8 (88)	1 (91)	1 (90)	1 (90)	1 (57)
2	<i>pp78/83</i>	738←-2372	1635	545	9 (31)	2 (71)	2 (22)	2 (27)	
3	<i>pk-1</i>	2392→3204	813	271	10 (45)	3 (48)	3 (45)	3 (49)	3 (36)
4		3612←-3812	201	67					
5	<i>hoar</i>	3825←-5447	1623	541		4 (29)	4 (23)	4 (22)	
6		6028→6255	228	76					
7		6725→7594	870	290					
8	<i>odv-e56</i>	8040→9146	1107	369	148 (54)	8 (56)	14 (51)	16 (54)	18 (44)
9	<i>ie-1</i>	9279←-11276	1998	666	147 (26)	16 (32)	13 (37)	15 (27)	7 (25)
10	<i>ac146</i>	11291→11929	639	213	145(26)		12 (35)	14 (33)	9 (33)
	<i>hr1 region</i>	12097-12697	601						
11		12782→12958	177	59					
12	<i>ac145</i>	13312←- 13590	279	93	145 (51)	14 (54)	11 (58)	13 (51)	9 (35)
13	<i>odv-EC27</i>	13599←- 14465	867	289	144 (46)	13 (53)	10 (48)	12 (49)	97 (25)
14	<i>odv-e18</i>	14499←- 14753	255	85	143 (78)	12 (68)	9 (58)	11 (62)	14 (60)
15	<i>p49</i>	14764←- 16158	1395	465	142 (45)		8 (57)	10 (52)	15 (34)
16		16328→ 16600	273	91					
17	<i>me53</i>	16619←- 17707	1089	363	139 (26)	9 (34)	15 (36)	8 (26)	143 (20)

Tablo 12'nin devamı

18	<i>ie-0</i>	18139→ 19353	1215	405	141 (27)		6 (33)	9 (33)	
	hr2 region	19448-20032	585						
19		20208← 20813	606	202				64 (25)	
20	<i>p74</i>	20893→ 22836	1944	648	138 (58)	17 (59)	18 (55)	7 (58)	60 (39)
21	<i>p47</i>	22928→ 24127	1200	400	40 (52)	31 (32)	33 (61)	17 (56)	68 (31)
22	<i>ac38-like protein</i>	24278→ 24988	711	237	38 (55)	28 (57)	31 (55)	31 (54)	69 (41)
23	<i>lef-11</i>	25135→ 25404	270	90	37 (29)	27 (44)	30 (41)	30 (37)	58 (26)
24	<i>39K/PP31</i>	25361→ 26281	921	307	36 (36)	26 (32)	29 (26)	29 (34)	57 (27)
25	<i>orf133-like protein</i>	26314→ 26604	291	97					
26	<i>ubiquitin</i>	26631← 26876	246	82	35 (77)	25 (80)	25 (79)	27 (83)	54 (80)
27		26952→ 27494	543	181	34 (32)	24 (58)	26 (50)	26 (55)	
	hr3 region	27613-28124	512						
28	<i>p10</i>	28158← 28439	282	94	137 (26)	18 (53)	19 (42)	25 (59)	
29	<i>p26</i>	28550← 29443	894	298	136 (30)	19 (42)	20 (39)	24 (37)	
30		29582→ 29836	255	85	29 (36)	20 (55)	21 (50)	22 (45)	
31		29874← 30275	402	134					
32	<i>lef-6</i>	30444← 30950	507	169	28 (49)	21 (54)	22 (43)	21 (45)	80 (32)
33	<i>DNA binding protein</i>	31025← 31936	912	304	25 (33)	22 (30)	23 (32)	20 (35)	81 (20)
	hr4 region	32096-33315	1220						
34	<i>RNA recognition motif superfamily protein (bjdp)</i>	33388← 34359	972	324			37 (26)	33 (32)	
35	<i>lef-8</i>	34424→ 37060	2637	879	50 (62)	33 (68)	36 (68)	32 (62)	131 (48)
36		37090← 37317	228	76	43 (27)	32 (48)	35 (43)		

Tablo 12'nin devamı

37	<i>lef-12</i>	37343← 37996	654	218	41 (33)		34 (34)	19 (30)	
38	<i>ac52</i>	38071← 38640	570	190	52 (25)	37 (28)	40 (27)	35 (31)	
39	<i>ac53</i>	38666→ 39082	417	139	53 (47)	38 (66)	41 (60)	36 (59)	
40		39109← 40209	1101	367		38 (34)	42 (22)	38 (30)	
41		40248← 40472	225	75		40 (38)	44 (36)	41 (39)	
42	<i>vp1054</i>	40529→ 41575	1047	349	54 (45)	42 (55)	45 (48)	43 (47)	138 (28)
43	<i>ac55</i>	41764→ 42000	237	79	55 (56)	43 (52)	46 (38)		
44	<i>ac57</i>	42239→ 42757	519	173	57 (46)	45 (51)	48 (46)		
45	<i>chaB</i>	42742← 43311	570	190	59 (55)	46 (70)	49 (48)		
46	<i>chaB</i>	43372← 43659	288	96	60 (52)	47 (51)	50 (56)		
47	<i>few polyhedra</i>	43914← 44513	600	200	61 (60)	48 (74)	51 (70)	46 (66)	118 (38)
48	<i>lef-9</i>	44654→ 46144	1491	497	62 (68)	49 (73)	53 (71)	47 (68)	117 (54)
49	<i>p26</i>	46271← 46978	708	236	136 (31)	59 (42)	20 (27)	49 (34)	
50	<i>ac145</i>	47087← 47452	366	122	145 (37)		11 (30)		9 (25)
51	<i>iap-2</i>	47454← 48371	918	306	71 (23)	58 (37)	61 (36)	50 (32)	
	<i>hr5 region</i>	48560-48647	88						
52	<i>pif-6</i>	48723← 49133	411	137	68 (40)	57 (56)	63 (57)	51 (50)	114 (27)
53	<i>lef-3</i>	49141→ 50316	1176	392	67 (25)	56 (33)	64 (28)	52 (28)	
54	<i>ac66</i>	50388← 52658	2271	757	66 (40)	55 (35)	65 (32)	53 (36)	
55	<i>DNA polymerase catalytic subunit</i>	52795→ 55962	3168	1056	65 (45)	54 (51)	66 (50)	54 (46)	111 (35)
56	<i>ac112</i>	56066→ 57070	1005	335	112 (33)				
57	<i>ac75</i>	57105← 57494	390	130	75 (24)	53 (51)	68 (39)	55 (47)	108 (25)
58	<i>ac76</i>	58064← 58318	255	85	76 (39)	52 (72)	69 (62)	60 (59)	107 (33)
59	<i>vlf-1</i>	58381← 59469	1089	363	77 (76)	70 (78)	70 (75)	61 (73)	106 (34)
60	<i>ac78</i>	59501← 59848	348	116	78 (35)	71 (34)	71 (45)	62 (31)	

Tablo 12'nin devamı

61	<i>structural glycoprotein p40</i>	59871← 61031	1161	387	80 (57)	72 (62)	72 (69)	65 (60)	104 (36)
62	<i>ac81</i>	60979←61320	342	114	81 (61)		73 (58)	66 (59)	103 (44)
63		61423→ 61581	159	53					
64	<i>ac82</i>	61550← 61825	276	92	82 (40)				
65		61668→ 61988	321	107					
66	<i>vp91</i>	62163→ 64643	2481	827	83 (41)	76 (42)	74 (45)	68 (41)	101 (27)
67	<i>ac88</i>	64718← 65350	633	211	88(24)		76 (24)	69 (23)	
68	<i>vp39</i>	65419← 66303	885	295	89 (40)	77 (45)	78 (45)	70 (52)	
69	<i>lef-4</i>	66494→67885	1392	464	90 (46)	78 (56)	77 (50)	71 (48)	95 (35)
70	<i>ubiquitin ligase RING1-like protein</i>	67927←68550	624	208		38 (23)			
71	<i>p33</i>	68610→69368	759	253	92 (52)	79 (63)	79 (62)	73 (50)	93 (35)
72	<i>ac93-like protein</i>	69421→69864	444	148	93 (52)	80 (70)	80 (63)	74 (64)	92 (36)
73	<i>odv-e25</i>	69894→70580	687	229	94 (47)	81 (72)	81 (66)	75 (57)	91 (51)
74	<i>helicase</i>	70677←74174	3498	1166	95 (43)	82 (53)	84 (50)	76 (47)	90 (28)
75	<i>pif-4</i>	74314→74832	519	173	96 (47)	83 (55)	83 (55)	77 (53)	89 (36)
76	<i>spheroidin-like protein precursor</i>	74854→75630	777	259	64 (45)	64 (44)	56 (46)		13 (48)
	<i>hr6 region</i>	75702-76312	611						
77		76404→76604	201	67					
78		76886→77050	165	55					
	<i>hr7 region</i>	77320-77574	255			95 (44)			
79	<i>ac108</i>	77723←78004	282	94	108 (39)		94 (47)	87 (36)	
80	<i>ac109</i>	78010←79092	1083	361	109 (52)	94 (57)	93 (64)	86 (36)	55 (33)

Tablo 12'nin devamı

81	<i>ac110</i>	79105←79275	171	57	110 (33)	93 (55)	92 (50)	85 (44)	
82	<i>vp80</i>	79300←81123	1824	608	104 (26)	92 (32)	91 (27)	84 (25)	
83	<i>ac103</i>	81165→82331	1167	389	103 (45)	91 (56)	90 (53)	83 (49)	83(34)
84	<i>ac102</i>	82300→82719	420	140	102 (29)	90 (49)		82 (38)	
85	<i>ac101</i>	82739→83863	1125	375	101 (41)	89 (52)	88 (46)	81 (46)	85 (27)
86	<i>p6.9</i>	83962→84186	225	75					
87	<i>lef-5</i>	84189←85031	843	281	100 (62)	87 (63)	85 (52)	79 (60)	87 (45)
88	<i>ac98</i>	85050→85937	888	296	98 (46)	86 (55)	86 (52)	78 (43)	88 (40)
89	<i>odv-e66</i>	85934←87988	2055	685	46 (36)	96 (39)	95 (42)	48 (30)	37 (39)
90	<i>cathepsin</i>	88077→89099	1023	341	127 (47)	60 (48)	54 (47)		11 (55)
91		89108→89653	546	182					
92		89696←90046	351	117				102 (28)	
93	<i>bro-b</i>	90279←91355	1077	359			58 (61)	57 (54)	
94	<i>bro-a</i>	91420←91845	426	142	2 (85)		57 (49)		
95	<i>nicotinamide riboside kinase- 1</i>	92298→92933	636	212		101 (32)			16 (45)
96	<i>nicotinamide riboside kinase- 1</i>	93053→94123	1071	357	33 (29)	101 (29)			
97	<i>iap-3</i>	94154→94660	507	169	27 (25)	35 (27)	102 (31)	39 (29)	17 (45)
98	<i>ac106</i>	94657←95364	708	236	106 (59)	102 (65)	100 (58)	88 (56)	52 (43)
99		95398→95742	345	115					
100	<i>polyADP-ribose glycohydrolase</i>	95854←97476	1623	541			99 (26)	89 (26)	
101		97473←97910	438	146					
102	<i>pif-3</i>	97922←98560	639	213	115 (52)	105 (42)	97 (41)	90 (41)	35 (41)
	hr8 region	98599-99372	774						

Tablo 12'nin devamı

103	<i>protein phosphatase-1</i>	99401←99643	243	81					
104	<i>orf66-like protein</i>	99674←99991	318	106		106 (30)		92 (32)	
105	<i>sod</i>	10008→100563	477	159	31 (77)	109 (77)	105 (82)	91 (66)	59 (59)
106		100646→101761	1116	372					
107		101986→102321	336	112			108 (33)		
108	<i>polyhedron envelope protein</i>	102331←103263	933	311	131 (28)	113 (55)	121 (47)	98 (47)	23 (39)
109	<i>fibroblast growth factor</i>	103452→104417	966	322	32 (34)	122 (31)	112 (46)	95 (24)	140 (29)
110		104428←104661	234	78			111 (38)	107 (43)	
111	<i>pif-1</i>	104673←106274	1602	534	119 (50)	123 (48)	110 (47)	106 (49)	75 (37)
112		106334←106900	567	189					
	hr9 region	107016-107927	910						
113		108117→108527	411	137			123 (30)		
114	<i>ac19-like protein</i>	108554←108937	384	128	19 (33)		114 (26)	96 (35)	
115		108936→110093	1158	386		117 (37)		97 (34)	
116	<i>alkaline exonuclease</i>	110418→111680	1263	421	133 (37)	119 (42)	113 (41)	94 (39)	125 (36)
	hr10 region	112086-112239	154						
117	<i>pif-2</i>	112240→113394	1155	385	22 (64)	141 (63)	133 (71)	104 (67)	48 (52)
	hr11 region	113401-114636	1236						
118	<i>pkip-1</i>	114672←115184	513	171		139 (34)	131 (39)	103 (32)	
119	<i>chitinase</i>	115232→117139	1908	636	126 (61)	61 (61)	39 (59)	111 (25)	10 (63)
120	<i>masp6.3</i>	117160→117426	267	89			118 (44)		
121	<i>lef-2</i>	117437→118102	666	222	6 (40)	128 (41)	117 (41)	102 (39)	41 (26)
122	<i>ac130</i>	118265←118543	279	93	130 (34)	125 (39)		99 (27)	

Tablo 12'nin devamı

123	<i>p24</i>	118595←119353	759	253	129(34)	126 (55)	119 (49)	100 (54)	71 (31)
124	<i>fusion protein</i>	119451←121505	2055	685		143 (45)	134 (41)	110 (47)	31 (26)
125	<i>peptidase MA superfamily</i>	121705→124455	2751	917		136 (31)	130 (29)	111 (26)	
126	<i>ac17</i>	124519←125319	801	267	17 (31)		129 (27)	112 (29)	
127	<i>masp6.10</i>	125300←125872	573	191		135 (30)			
128	<i>egt</i>	126061←127629	1569	523	15 (47)	133 (56)	127 (48)	114 (45)	141 (40)
129	<i>lef-1</i>	127768→128469	702	234	14 (39)	130 (51)	125 (54)	116 (42)	74 (40)
130	<i>ac13</i>	128474→129487	1014	338	13 (27)	129 (46)	124 (30)	119 (45)	
131		129364←130041	678	226					

3.1.5. ManeNPV-T2 Genomunun Gen İçeriği

Diğer bakülovirüslerde olduğu gibi ManeNPV-T2 genomunun da replikasyon, transkripsiyon, yapısal, konak böceği etki eden yardımcı, oral enfektiviteden sorumlu, apoptozis engelleyici ve görevi belli olmayan gen gruplarını içerdiği belirlendi (Tablo 13).

DNA replikasyonundan sorumlu genlerden *lef-1* (*orf128*), *lef-2* (*orf120*), *lef-3* (*orf53*), *dnapol* (*orf55*), *helikaz* (*orf74*), *ie-1* (*orf9*), *me53* (*orf17*), *lef-11* (*orf23*) ve *ssdbp* (*orf33*) ManeNPV-T2 genomunda da tespit edildi. *Helikaz-2*, *dna-ligaz*, *dutpaz*, *RNaz reduktaz-1*, *RNaz reduktaz-2*, *pcna*, *lef-7*, *ie-2* ve *pe38* genlerinin ise ManeNPV-T2 genomunda bulunmadığı belirlendi.

Diğer bakülovirüslerde bildirilen, *lef-10* hariç, transkripsiyona özgü tüm genler, ManeNPV-T2 genomunda da bulundu. Bu genler *p47* (*orf21*), *lef-8* (*orf35*), *lef-9* (*orf48*), *vlf-1* (*orf59*), *lef-4* (*orf69*), *lef-5* (*orf87*), *pp31/39k* (*orf24*), *lef-6* (*orf32*) *lef-12* (*orf37*) ve *ie-0* (*orf18*)'dır.

Yapısal genlerden 25 tanesi ManeNPV-T2 genomunda belirlendi. Bu genler, *vp1054* (*orf42*), *p40* (*orf61*), *38k* (*orf88*), *vp91/p95* (*orf66*), *vp39* (*orf68*), *odv-e27* (*orf13*), *polh* (*orf1*), *odv-e66* (*orf89*), *fp25k* (*orf47*), *odv-e25* (*orf73*), *odv-e18* (*orf14*), *p48/p45* (*orf83*), *pk-1* (*orf3*), *p6.9* (*orf86*), *p87* (*orf79*), *p24* (*orf123*), *vp80* (*orf80*), *kalyx* (*orf108*), *dezmozoplakin* (ORF54), *chaB* (*orf45*, *orf46*), *p49* (*orf15*), *p10* (*orf28*), *1629-kapsid* (*orf2*), *p33* (*orf71*), *f protein* (*orf124*)'dir. Yapısal olan ve diğer bakülovirüslerde bulunan *vef-1*, *vef-2*, *vef-3*, *gp50* ve *gp64* genleri ise ManeNPV-T2 genomunda bulunmadı.

Bütün bakülovirüslerde konak böceği etki eden çeşitli yardımcı genler bulunmaktadır. Bilinen bu yardımcı genlerden *alk-exo* (*orf116*), *egt* (*orf128*), *sod* (*orf105*), *kitinaz* (*orf119*), *katapsin* (*orf90*), *ubikuitin* (*orf26*) ve *fgf* (*orf109*)'nin ManeNPV-T2 genomunda da olduğu belirlendi. Yardımcı genlerden *ctl-1*, *ctl-2*, *ptl-1*, *ptl-2* ve *arif-1* genlerinin ise ManeNPV-T2 genomunda bulunmadığı tespit edildi.

ManeNPV-T2 genomunda oral enfektiviteden sorumlu şu ana kadar bildirilen sekiz genin olduğu belirlendi. Bunlar, *pif-1* (*orf111*), *pif-2* (*orf117*), *pif-0/p74* (*orf20*), *pif-3* (*orf102*), *pif-4* (*orf75*), *pif-5* (*ac149*), *pif-6* (*orf52*), *pif-7* (*orf81*) ve *pif-8* (*orf66*)'dir. Bunlara ek olarak, oral enfektivitelere rol oynadığı düşünülen *ac145* geninin de ManeNPV-T2 genomunda iki homologu (*orf12*, *orf50*) olduğu tespit edildi. *ac145* geninin yanı sıra, diğer bazı genler de ManeNPV-T2 genomunda çoklu homologlar halinde bulunmaktadır. Bunlar, *chaB* (*orf45*, *orf46*), *vp80* (*orf79*, *orf82*) ve *nikotinamid ribozid kinaz 1* (*orf95*, *orf96*)'dir.

Anti-apoptoz genleri, programlanmış hücre ölümünü ortadan kaldırmak ve üretken virüs replikasyonunu sağlamak için virüsler tarafından kodlanır. Şimdiye kadar altı gen, *iap-1*, *iap-2*, *iap-3*, *iap-4*, *iap-5* ve *p35* bakülovirüs enfeksiyonu sırasında apoptoz inhibitörleri olarak belirlendi. Bunlar arasından sadece *iap-2* (*orf51*) ve *iap-3* (*orf97*)'ün ManeNPV-T2 genomunda bulunduğu tespit edildi.

Bakülovirüs tekrarlanan genler (Baculovirus repeated open reading frames; BRO'lar) birçok bakülovirüste bulunur ve bunların proteinleri nükleik asitleri bağlayabilir. ManeNPV-T2 genomunda, sırasıyla 142 ve 359 aa boyutlarında iki *bro* geni (*bro-a/orf94* ve *bro-b/orf93*) tanımlandı.

Bu genler dışında bakülovirüslerde bulunan ancak görevi tam olarak bilinmeyen 43 genin ManeNPV-T2 genomunda bulunduğu belirlendi. Bu genler, *ac81* (*orf62*), *ac109* (*orf80*), *ac13* (*orf130*), *ac38* (*orf22*), *ac53* (*orf39*), *ac75* (*orf57*), *ac76* (*orf58*), *ac78* (*orf60*), *telokin* (*orf64*), *p18* (*orf72*), *ac106* (*orf98*), *ac110* (*orf81*), *ac145* (*orf12,orf50*), *ac146* (*orf10*), *ac17* (*orf126*), *ac19* (*orf114*), *ac55* (*orf43*), *ac57* (*orf44*), *ac107* (*orf98*), *ac52* (*orf38*), *ac58* (*orf45,46*), *ac112* (*orf56*), *ac52* (*orf38*), *hoar* (*orf5*), *ORF133-benzeri protein* (*orf25*), *p26* (*orf49*), *ac25* (*orf33*), *RNA tanıma protein* (*orf34*), *ac66* (*orf54*), *ac88* (*orf67*), *ubikuitin ligaz RING-1*(*orf70*), *ac64* (*orf76*), *ac101*(*orf85*), *ac108* (*orf79*), *nikotinamid ribozid kinaz-1* (*orf95,orf96*), *parg* (*orf100*), *protein fosfataz-1* (*orf102*), *ORF66-benzeri protein* (*orf104*), *ac131* (*orf108*), *ac32* (*orf109*), *ac133* (*orf116*), *ac130* (*orf122*) ve *peptidazma superfamily* (*orf125*)'dir.

Ayrıca, ManeNPV-T2 genomunda 27 adet hipotetik gen olduğu belirlendi. Bu genlerin bulunduğu ORF'ler *orf4*, *orf6*, *orf7*, *orf11*, *orf16*, *orf19*, *orf27*, *orf30*, *orf31*, *orf36*, *orf40*, *orf41*, *orf63*, *orf65*, *orf77*, *orf78*, *orf91*, *orf92*, *orf99*, *orf101*, *orf106*, *orf107*, *orf110*, *orf112*, *orf113*, *orf115* ve *orf131* olarak belirlendi. Bunlara ilave olarak daha önce *Malacosoma* sp. nucleopolyderovirüs (KU563146.1)'de bulunan ve *masp6.3* (*orf120*) ve *masp6.10* (*orf127*) olarak adlandırılan iki genin de ManeNPV-T2'de olduğu tespit edilmiştir.

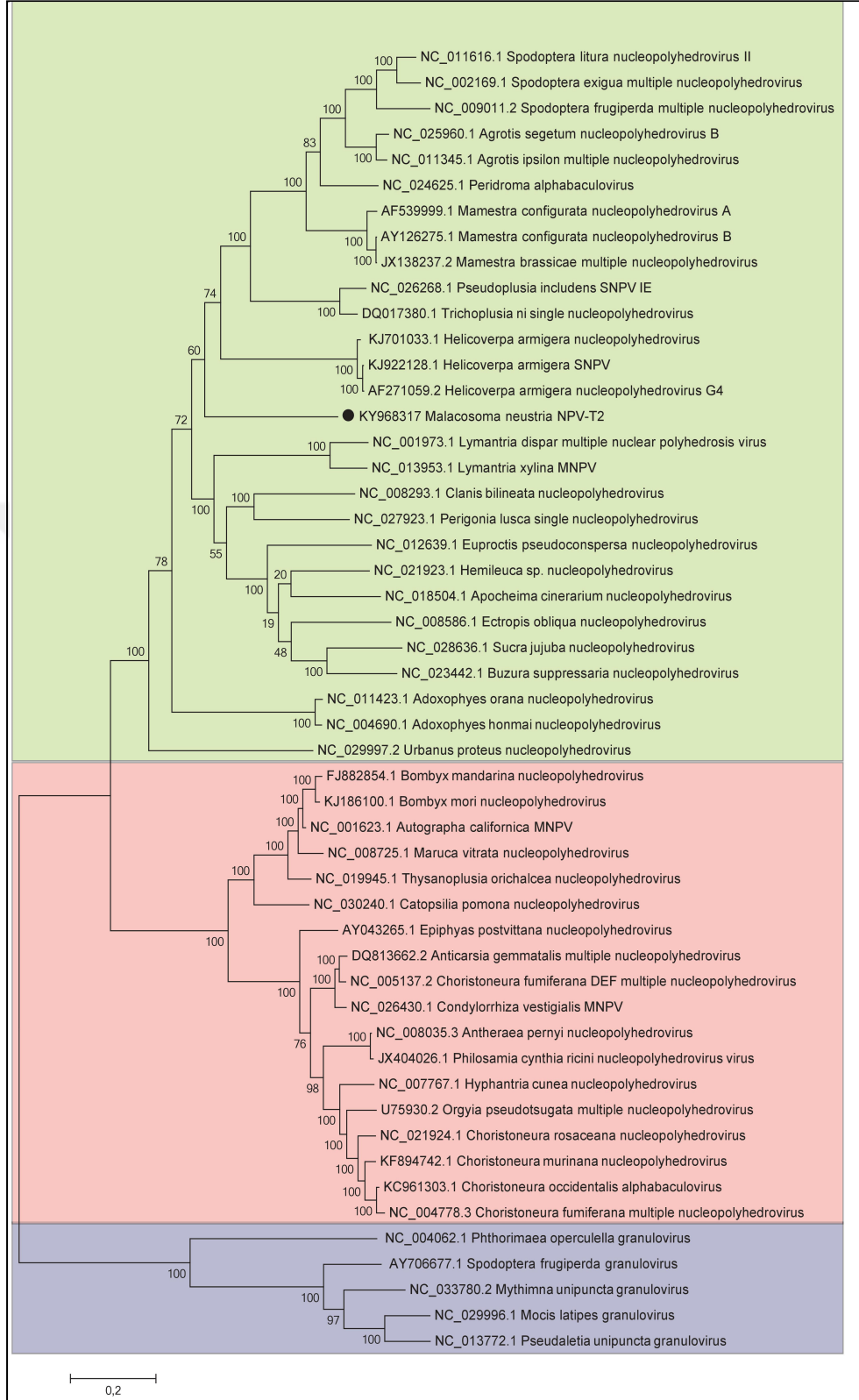
Tablo 13. ManeNPV-T2 genomunda bulunan genler ve fonksiyonları

Gen fonksiyonu	ManeNPV-T2'de bulunan genler	ManeNPV-T2'de bulunmayan genler
Replikasyon	<i>lef-2</i> (ORF120), <i>lef-1</i> (ORF128), <i>dnapol</i> (ORF55), <i>helikaz</i> (ORF74), <i>ssdbp</i> (ORF33), <i>lef-3</i> (ORF53), <i>me53</i> (ORF17), <i>ie-1</i> (ORF9), <i>lef-11</i> (ORF23)	<i>helikaz-2</i> , <i>dna-ligaz</i> , <i>dutpaz</i> , <i>RNaz reduktaz-1</i> , <i>RNaz reduktaz-2</i> , <i>pcna</i> , <i>lef-7</i> , <i>ie-2</i> , <i>pe38</i>
Transkripsiyon	<i>p47</i> (ORF21), <i>lef-8</i> (ORF-35), <i>lef-9</i> (ORF48), <i>vlf-1</i> (ORF59), <i>lef-4</i> (ORF-69), <i>lef-5</i> (ORF87), <i>pp31/39k</i> (ORF24) , <i>lef-6</i> (ORF32), <i>lef-12</i> (ORF37), <i>ie-0</i> (ORF18)	<i>lef-10</i>
Yapısal genler	<i>vp1054</i> (ORF42), <i>p40</i> (ORF61), <i>vp91/p95</i> (ORF66), <i>vp39</i> (ORF68), <i>odv-e27</i> (ORF13), <i>polh</i> (ORF1), <i>odv-e66</i> (ORF89), <i>fp25k</i> (ORF47), <i>odv-e25</i> (ORF73), <i>odv-e18</i> (ORF14), <i>pk-1</i> (ORF3), <i>p6.9</i> (ORF86), <i>p33</i> (ORF71), <i>38k</i> (ORF88), <i>dezmoplakin</i> (ORF54), <i>p48/p45</i> (ORF83), <i>chaB</i> (ORF45,ORF46), <i>vp80</i> (ORF80), <i>p87</i> (ORF79), <i>p24</i> (ORF123), <i>kalyx</i> (ORF108), <i>p10</i> (ORF28), <i>1629-kapsid</i> (ORF2), <i>f protein</i> (ORF124), <i>p49</i> (ORF15)	<i>vef-1</i> , <i>vef-2</i> , <i>vef-3</i> , <i>gp50</i> , <i>gp64</i>
Yardımcı genler	<i>alk-exo</i> (ORF116), <i>ubikuitin</i> (ORF26), <i>fgf</i> (ORF109), <i>egt</i> (ORF128), <i>sod</i> (ORF105), <i>kitinaz</i> (ORF119), <i>katepsin</i> (ORF90)	<i>ptp-2</i> , <i>ctl-1</i> , <i>ptp-1</i> , <i>arif-1</i> , <i>ctl-2</i>
Oral enfektiviteden sorumlu genler	<i>pif-1</i> (ORF111), <i>pif-2</i> (ORF117), <i>p74</i> (ORF20), <i>pif-3</i> (ORF102), <i>pif-4</i> (ORF75), <i>pif-6</i> (ORF52), <i>pif-7</i> (ORF81), <i>pif-8</i> (ORF66), <i>odv-e56(pif-5)</i> (ORF8)	
Apoptozis inhibitör genleri	<i>iap-2</i> (ORF51), <i>iap-3</i> (ORF97)	<i>iap-1</i> , <i>iap-4</i> , <i>iap-5</i> , <i>p35</i> (ac135)
Görevi belli olmayan genler	<i>ac81</i> (ORF62), <i>ac109</i> (ORF80), <i>ac13</i> (ORF130), <i>ac38</i> (ORF22), <i>ac53</i> (ORF39), <i>ac75</i> (ORF57), <i>ac76</i> (ORF58), <i>ac78</i> (ORF60), <i>telokin</i> (ORF64), <i>p18</i> (ORF72), <i>ac106</i> (ORF98), <i>ac110</i> (ORF81), <i>ac145</i> (ORF12,ORF50), <i>ac146</i> (ORF10), <i>ac17</i> (ORF126), <i>ac19</i> (ORF114), <i>ac55</i> (ORF43), <i>ac57</i> (ORF44), <i>ac107</i> (ORF98), <i>ac52</i> (ORF38), <i>ac58</i> (ORF45,46), <i>ac112</i> (ORF56), <i>ac52</i> (ORF38), <i>hoar</i> (ORF5), <i>ORF133-benzeri protein</i> (ORF25), <i>p26</i> (ORF49), <i>ac25</i> (ORF33), <i>RNA tanıma protein</i> (ORF34), <i>ac66</i> (ORF54), <i>ac88</i> (ORF67), <i>ubikuitin ligaz RING-1</i> (ORF70), <i>ac64</i> (ORF76), <i>vp80</i> (ORF80), <i>ac101</i> (ORF85), <i>bro-b</i> (ORF93), <i>ac108</i> (ORF79), <i>bro-a</i> (ORF94), <i>nikotinamid ribozid kinaz-1</i> (ORF95,ORF96), <i>parg</i> (ORF100), <i>protein fosfataz-1</i> (ORF102), <i>ORF66-benzeri protein</i> (ORF104), <i>ac131</i> (ORF108), <i>ac32</i> (ORF109), <i>ac133</i> (ORF116), <i>ac130</i> (ORF122), <i>peptidaz ma superfamily</i> (ORF125)	<i>ac4</i> , <i>ac5</i> , <i>ac7</i> , <i>ac11</i> , <i>ac12</i> , <i>ac18</i> , <i>ac29</i> , <i>ac33</i> , <i>ac39</i> , <i>ac45</i> , <i>ac63</i> , <i>ac70</i> , <i>ac84</i> , <i>ac85</i> , <i>ac87</i> , <i>ac97</i> , <i>ac113</i> , <i>ac116</i> , <i>ac118</i> , <i>ac121</i> , <i>ac140</i> , <i>ac149</i> , <i>ac150</i> , <i>ac152</i> , <i>ac154</i> , <i>ac111</i> , <i>ac34</i> , <i>ac30</i> , <i>ac26</i> , <i>ac43</i> , <i>ac44</i> , <i>ac72</i> , <i>ac73</i> , <i>ac74</i> , <i>ac91</i> , <i>ac108</i> , <i>ac114</i> , <i>ac117</i> , <i>ac120</i> , <i>ac122</i> , <i>ac124</i> , <i>ac132</i> , <i>ac146</i>
Diğerleri	<i>hipotetik</i> (ORF4, ORF6, ORF7, ORF11, ORF16, ORF19, ORF27, ORF30, ORF31, ORF36, ORF40, ORF41, ORF63, ORF65, ORF77, ORF78, ORF91, ORF92, ORF99, ORF101, ORF106, ORF107, ORF110, ORF112, ORF113, ORF115, ORF131), <i>masp6.3</i> (ORF120), <i>masp6.10</i> (ORF127)	

ManeNPV-T2 genomunda genomun %5.37'sini kaplayan 11 adet homolog tekrar bölgesi (homologous repeated sequences, hrs) tespit edildi. Bütün bu tekrarların tamamının merkezinde *NdeI* (CATATG) restriksiyon enzim kesim bölgesi bulunmaktadır. Bu kesim bölgesinin sağ ve solundaki sekansların birbirinin komplementeri olduğu ve TTTTCATATGAAA dizisini içerdiği belirlendi. Tekrarların kusurlu palindromik diziler olduğu bulundu. Tüm tekrarların farklı ara bölgelerle ayrıldığı tespit edildi (Tablo 14).

Tablo 14. Homolog bölgelerin (hrs) palindromik tekrarları

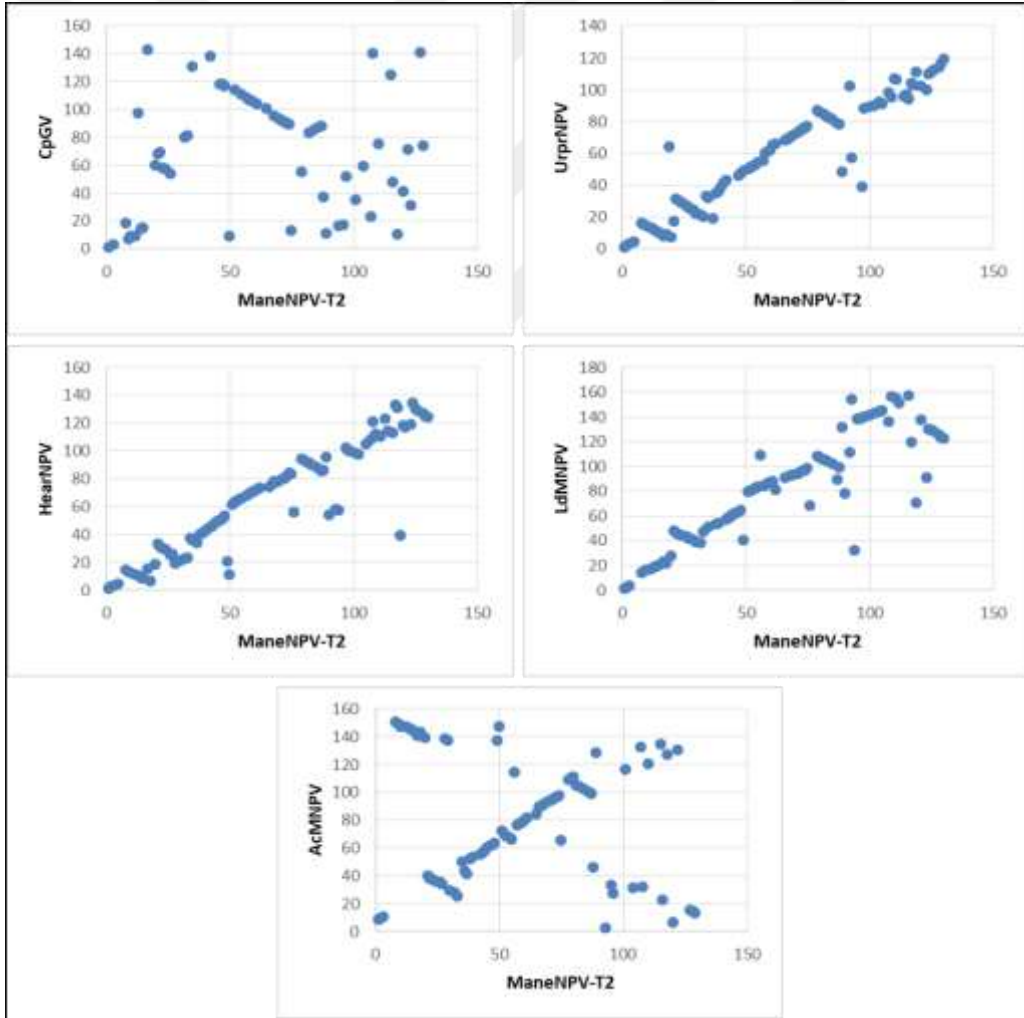
hr1 bölgesi	
hr1_rpt1.seq	AACGTTCAACGAAAAGAATCCGTTGATCTTTGTTTACACTTTT←CATATGAAAATGGAAGCAA
hr1_rpt2.seq	AAAGTTACACGAAAAAACCCGTCATCTTTGCTTACGCTTTTATATGAAAATGGAATCAA
hr1_rpt3.seq	AACGTTTCGATGAAAAGAATCCACGATCTTTGCTTACGCTTTTATATGAAAATGGAAGCAA
hr1_rpt4.seq	AAAGTTAAACAAAAAGAATCCACGATCTTTGCTTACGCTTTTATATGAAAATGGAAGCAA
hr1_rpt5.seq	AATGTACAACGAAAAGAATCCATGATCTTTGCTTACGCTTTTATATGAAAATGGAAGCAA
	** ** * **** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
hr1_rpt1.seq	AGATGGCGTGATCTTTTCGTTGAACGTT
hr1_rpt2.seq	AGATGACGGTTCTTTTCAATTAACCTT
hr1_rpt3.seq	AGATCACGAATCTTTTCTTTAACTTT
hr1_rpt4.seq	AGATCGTGGATTCTTTTCGTTGAACCTT
hr1_rpt5.seq	AGATCATGGATCTTTTCGTTAACTTT
	**** * ***** * ** *
hr2 bölgesi	
hr2_rpt1.seq	TTAAGTTCAACGAAAAGATGTCGTTGATCTTTGCTTCCATTTT←CATATGAAAAGCGTAAGCA
hr2_rpt2.seq	AAAAGTTAAACGAAAAGAATCCACGATCTTTGCTTCCATTTTATATGAAAAGCGTAAGCA
hr2_rpt3.seq	AAAAGTTAAACGAAAAGAATCCATGATCTTTGCTTACGCTTTTATATGAAAATGGAAGCA
hr2_rpt4.seq	ATTTGTTAAACGAAAAGAATCCATGATCTTTGCTTACGCTTTTATATGAAAATGGAAGCA
hr2_rpt5.seq	AAAAATTAACGAAAAATCTCGTTGATCTTCCGTTCCATTTTATATGAAAAGTGAAGCA
	** **** * ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
hr2_rpt1.seq	AATTTTCATGGATTCTTTTCGTTAACTTTT
hr2_rpt2.seq	AAGATCATGGATTCTTTTCGTTAACTTTT
hr2_rpt3.seq	AAGATCACGACATCTTTTAGTTAACTTTT
hr2_rpt4.seq	AAGATCATGGATTCTTTTCGTTAACTTTT
hr2_rpt5.seq	AACATTACGAATCTTTTCGTTAACTTTT
	** * * * ***** ** * ** *
hr3 bölgesi	
hr3_rpt1.seq	AAACTAAATTTTACAAAACGTTCAACGAAAAGATACCGGCATCTTTGCTTACGCTTT←CAT
hr3_rpt2.seq	AATTTGAAACATTTGAAAAGTTTAAACGAAAATATAACGACATCTTTGCTTCCATTTT←CAT
hr3_rpt3.seq	ATATATTAGTCGACTAAAAGTTAATTAAGATCACGTCATCTTTGCTTCTATTTT←CAT
hr3_rpt4.seq	ATNTATTAGTCGACTAAAAGTTAATTAAGATCACGTCATCTTTGCTTCTATTTT←CAT
	* * * **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
hr3_rpt1.seq	→ ATGAAAAGGAAGCAAAGATCACGGATTCTTTTCGTTGAACGTTTTATTTAGTATATTTT
hr3_rpt2.seq	ATGAAAAGTGAAGCAAAGATCACGTATTTTTTCGTTGAACGTTTTCTTTTAAATAAT
hr3_rpt3.seq	ATGAAAAGTGAAGCAAAGATCACGGATTCTTTTGTAACTTTTGTAAATAATTTT
hr3_rpt4.seq	ATGAAAAGTGAAGCAAAGATCACGGATTCTTTTGTAACTTTTGTAAATAATTTT
	***** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
hr4 bölgesi	
hr4_rpt1.seq	ATCTTTGCTTCCATTTT←CATATGAAAAGCGTAAGCAAAGAT
hr4_rpt2.seq	AACCTTGCTTCCATTTT←CATATGAAAAGTGAAGCAAAGTT
hr4_rpt3.seq	ATCTTTGCTTACACTTTTATATGAAAATGGAAGCAAAGAT
hr4_rpt4.seq	ATCTTTGCTTACACTTTTATATGAAAATGGAAGCAAAGAT
hr4_rpt5.seq	ATCTTTGCTTACACTTTTATATGAAAATGGAAGCAAAGAT
hr4_rpt6.seq	ATCTTTGCTTACACTTTT←CATATGAAAATGGAAGCAAAGAT
hr4_rpt7.seq	ATCTTTGCTTCCATTTT←CATATGAAAAGCGTAAGCAAAGAT
hr4_rpt8.seq	ATCTTTAATTATGTTTTAATATGAAAATGAAATGGCGGGA
	* **** * ** ***** ** * ** *



Şekil 10. Bakülovirüs kor genlerinin aminoasit sekanslarına dayanan filogenetik ağaç. ManeNPV-T2'nin konumu siyah nokta ile gösterildi. Yeşil, pembe ve mor kısımlar sırasıyla Alfabakülovirüs Grup II, Grup I ve dış grup olan Betabakülovirüs izolatlarını temsil etmektedir.

3.1.7. ManeNPV-T2 Genomunun Gen Dağılım Analizi (Gene parity-plot)

ManeNPV-T2'nin genom organizasyonu diğer bakülovirüs (HearNPV, TniSNPV, UrprNPV, AcMNPV, CpGV) genomları ile karşılaştırıldı. Gene parity-plot analizi kullanılarak ORF'lerin dağılım grafikleri çizildi. Bu grafikler, ManeNPV-T2'nin gen düzenlemesinin TniSNPV, HearNPV ve UrprNPV'nin gen sıralarıyla büyük ölçüde benzer olduğunu gösterdi (Şekil 11). Bununla birlikte, ManeNPV-T2'nin gen düzenlemesinin Alfabakülovirüs Grup I'de yer alan AcMNPV genomundan oldukça farklı olduğu görüldü. Ayrıca, diğer bir grup olan betabakülovirüsler arasında yer alan CpGV genom düzeninden de önemli ölçüde farklıdır.

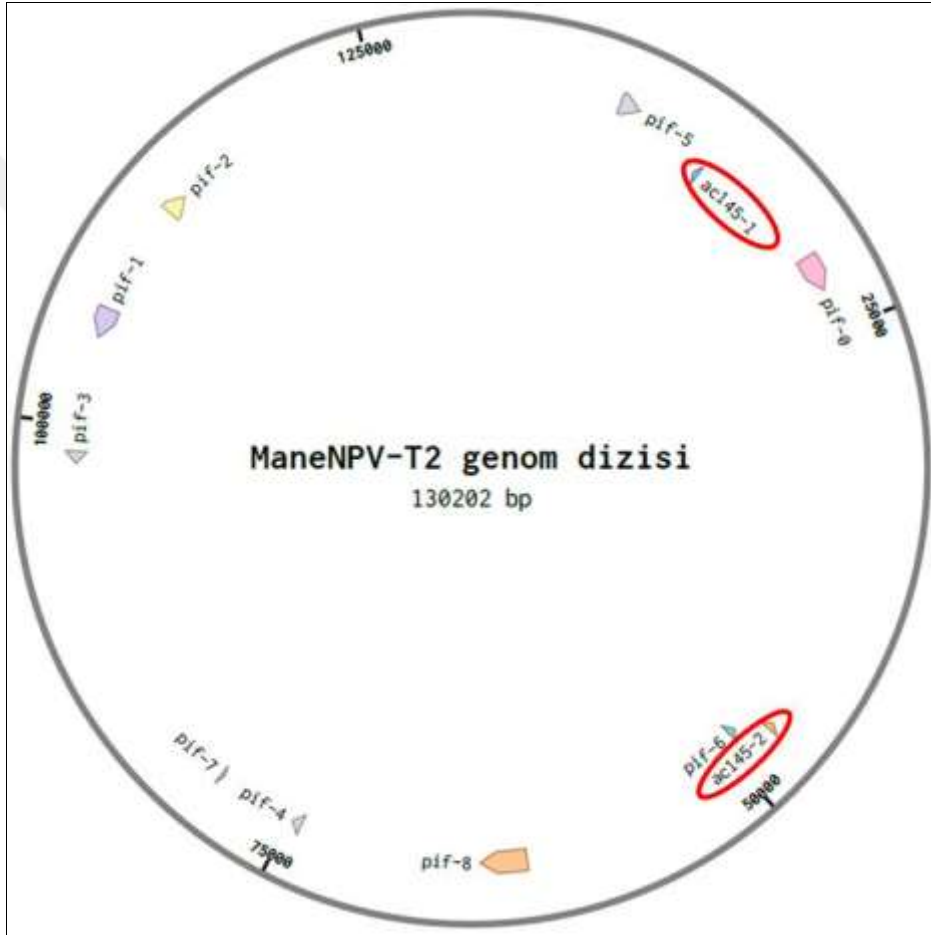


Şekil 11. ManeNPV-T2'nin AcMNPV, TniSNPV, HearNPV, UrprNPV ve CpGV genomları ile karşılaştırmalı gen dağılım analizi. Genlerin varlığı ve göreceli konumu (mavi noktalar) çift yönlü olarak karşılaştırıldı.

3.2. *ac145* Genlerinin Maya İki-Hibrid Sisteminde Etkileşim Deneyleri

3.2.1. ManeNPV-T2'ye Ait Oral Enfektivite Genleri

Oral enfektiviteden sorumlu olan *pif 0-8* genlerinin ve *ac145* genlerinin ManeNPV-T2 genomundaki yerleri genom haritası üzerinde belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. ManeNPV-T2'ye ait oral enfektiviteden sorumlu genler ve muhtemel oral enfektivite genleri

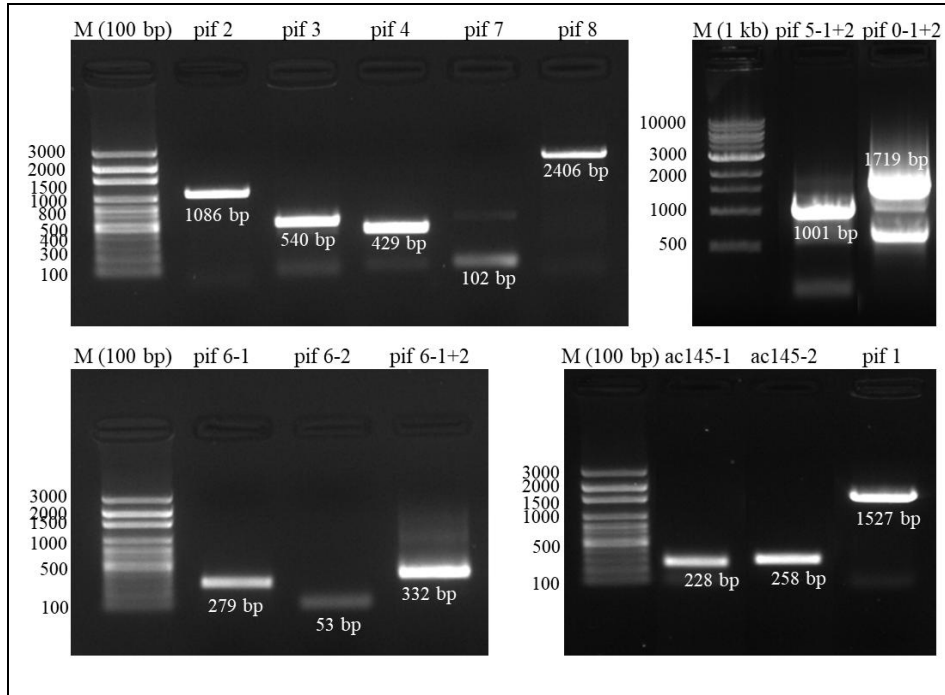
3.2.2. Av ve Yem Vektörleri için Primerlerin Tasarımı

ManeNPV-T2 genomuna ait oral enfektiviteden sorumlu proteinlerin PIF0, PIF1, PIF2, PIF3, PIF4, PIF5, PIF6, PIF7 ve PIF8'in transmembran domaini içerdiği belirlendi.

AC145-1'in sinyal peptid bölgesine, AC145-2'nin ise transmembran domainine sahip olduğu tespit edildi. AC145-1'de sinyal peptid bölgesi 1. ile 16. aminoasit sırasında bulunmaktadır. AC145-2'de transmembran domaini 13. ile 35. aminoasitler arasında bulunmaktadır. Transmembran domainleri PIF0'da 426-448 aa, 575-597 aa ve 607-629 aa'ler, PIF1'de 2-24 aa'ler, PIF2'de 2-21 aa'ler, PIF3'de 10-32 aa'ler, PIF4'de 7-29 aa'ler, PIF5'de 318-340 aa'ler, PIF6'da 95-117 aa'ler, PIF7'de 4-22 aa'ler, PIF8'de 2-22 aa'ler arasında bulunmaktadır. Bu aa'lere karşılık gelen nükleotidler çıkarılarak primerler tasarlandı. İçinde transmembran motifi içeren PIF0, PIF5 ve PIF6'dan bu bölgeler çıkarıldıktan sonra füzyon PCR ile bu genler tek parça halinde birleştirildi.

3.2.3. Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

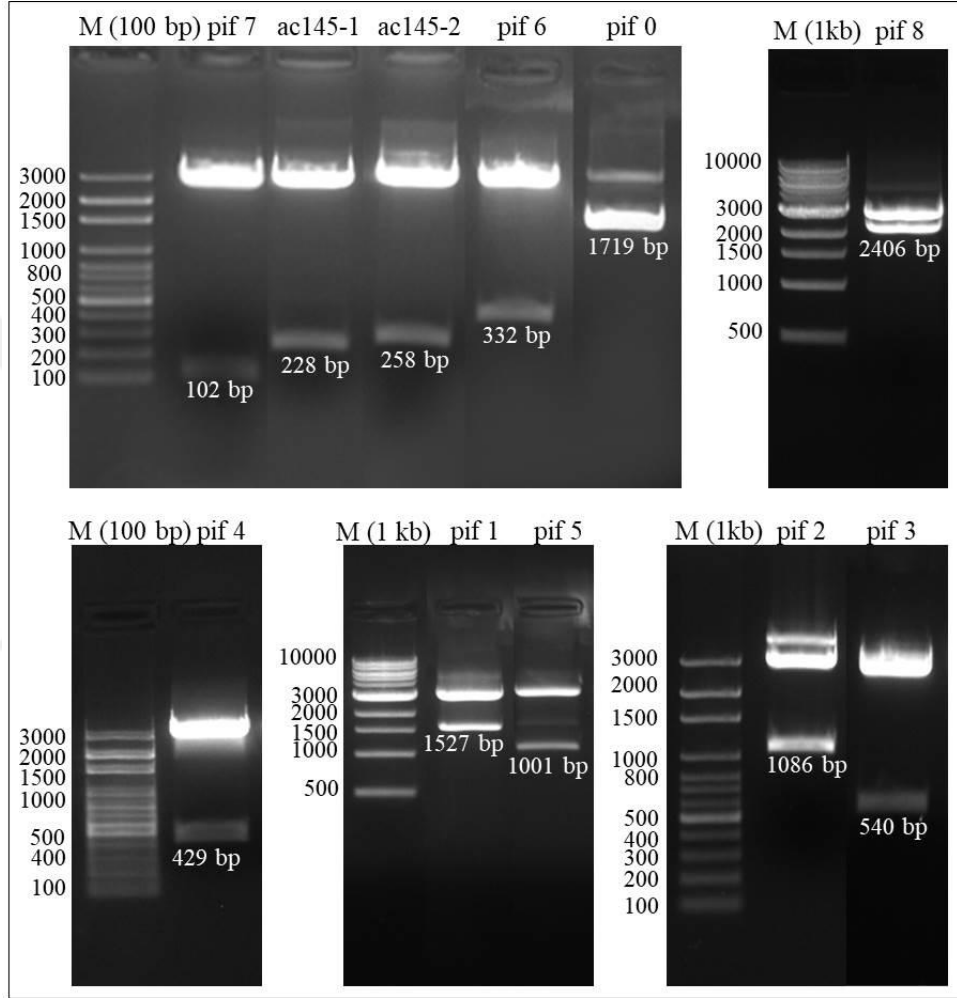
ManeNPV-T2'de bulunan *ac145-1*, *ac145-2*, *pif 0*, *pif 1*, *pif 2*, *pif 3*, *pif 4*, *pif 5*, *pif 6*, *pif 7* ve *pif 8* genleri PCR ile çoğaltıldı. Çıkarılan sinyal peptid ve transmembran bölgelerinden sonra genlerin büyüklükleri sırasıyla 228 bp, 258 bp, 1719 bp, 1527 bp, 1086 bp, 540 bp, 429 bp, 1001 bp, 332 bp, 102 bp, 2406 bp olarak hesaplandı ve agaroz jel üzerinde bu büyüklüklere uyumlu bantlar gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. ManeNPV-T2'ye ait 11 ORF'nin PCR jel görüntüleri. M: Markır.

3.2.4. Genlerin Transfer Vektörüne Klonlanmaları

PCR sonucunda oluşan gen ürünlerinin ara vektör olan pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörüne klonlandığı Tablo 8’de belirtilen restriksiyon endonükleaz enzimleriyle doğrulandı (Şekil 14).

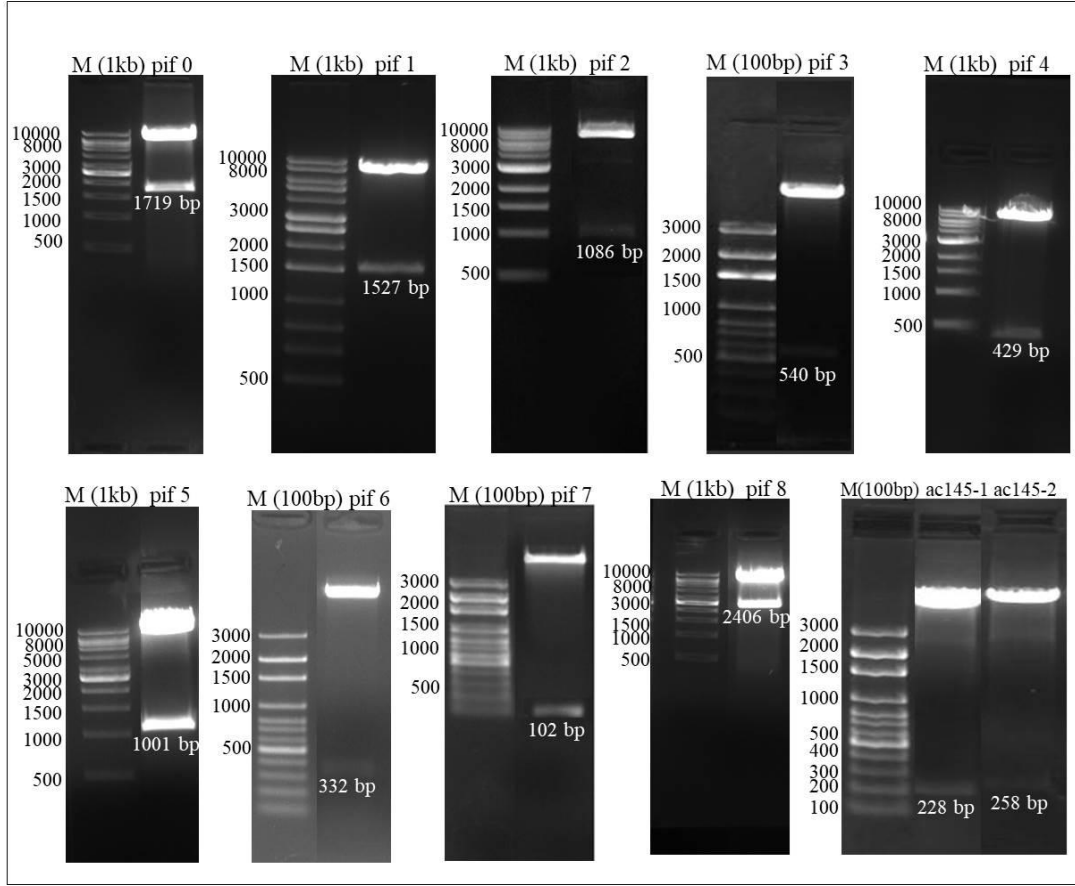


Şekil 14. Genlerin pGEM-T Easy ara vektörüne klonlandığının doğrulanması. *EcoRI* Restriksiyon enzimi ile kesim yapılarak klonlamalar doğrulandı. M: Markır.

3.2.5. Genlerin Av Vektörlerine Klonlanmaları

pGEM-T Easy ara vektöründe bulunan 11 gen, uygun kesim bölgeleri kullanılarak bu vektörlerden çıkarıldı ve pGAD-T7 vektörüne klonlandı. Klonlamaların doğruluğu uygun

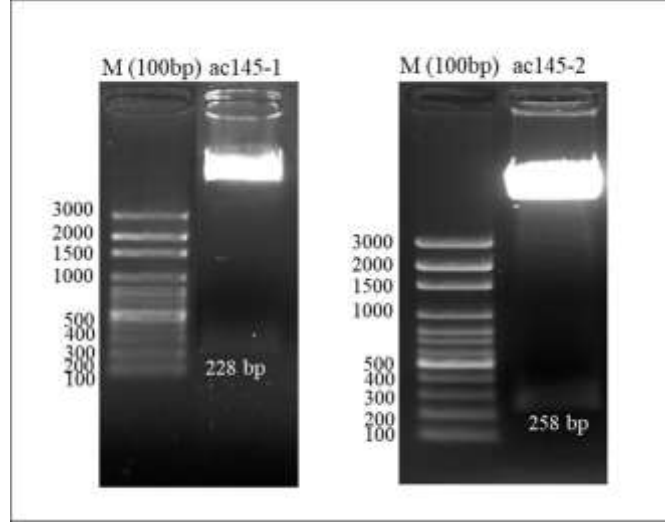
restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilerek gösterildi (Şekil 15). Genlerin klonlandığı pGAD-T7 vektörünün boyutu 7988 bp olarak jelde görüldü (Şekil 15).



Şekil 15. Genlerin pGAD-T7 vektörüne klonlandığının doğrulanması

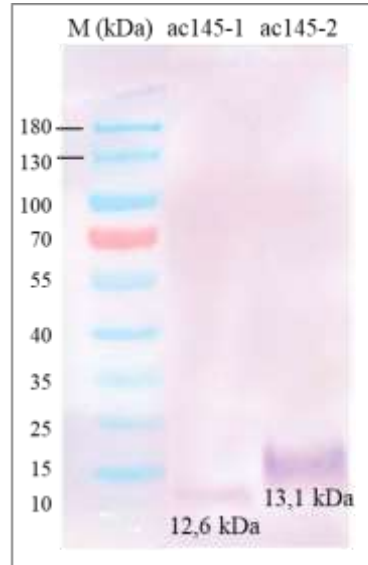
3.2.6. *ac145* genlerinin *Yem* Vektörüne Klonlanması ve Maya Hücrelerinde İfade Edilmesi

ManeNPV-T2 genomunda iki homoloğu bulunan *ac145* genlerinin *yem* vektörüne klonlandığı *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleriyle doğrulandı (Şekil 16). Genlerin klonlandığı pGBK-T7 vektörünün boyutu 7300 bp olarak jelde görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. *ac145-1* ve *ac145-2* genlerinin pGBK-T7 vektörüne klonlanması

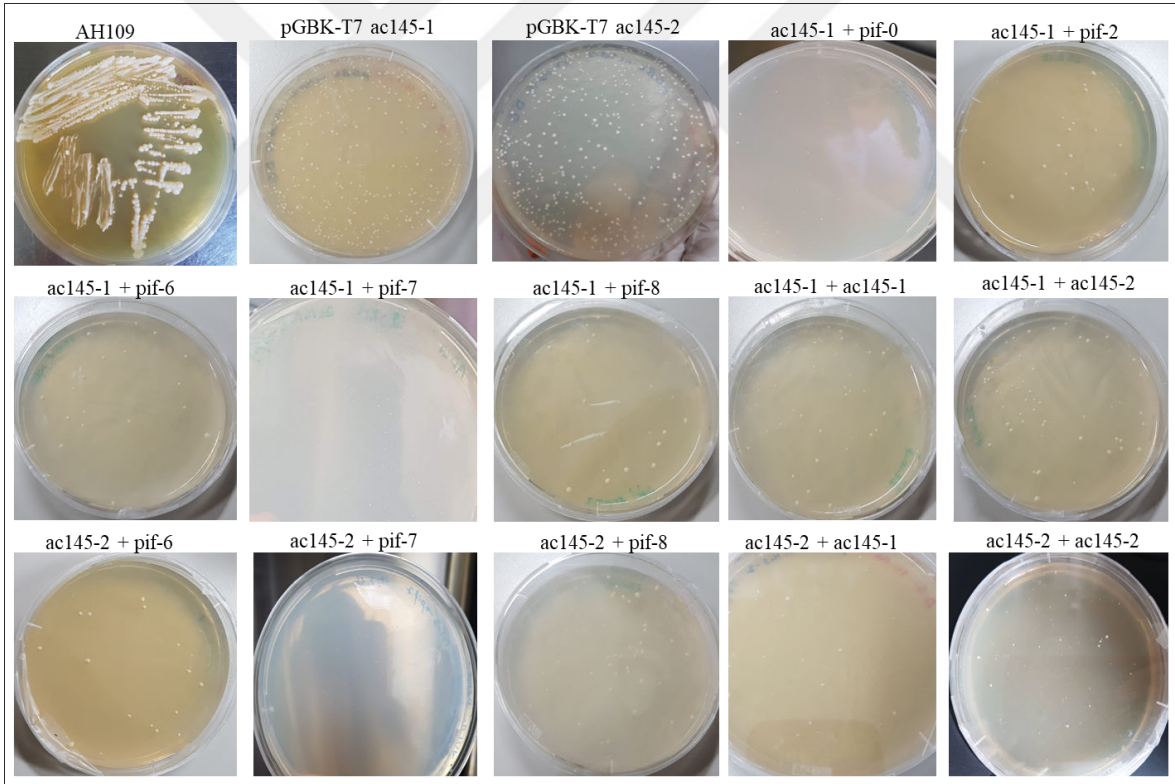
Geni içerdiği belirlenen vektörlerin maya hücrelerinde transformasyonundan sonra protein ekspresyonu yapıldı. Protein ekspresyonundan elde edilen proteinler, c-Myc antikoru ile Western blot hibridizasyon analizine tabi tutuldu. AC145-1 proteininin 12.6 kDa ağırlığındaki ve AC145-2 proteinin de 13.1 kDa ağırlığındaki bantları görülerek, bu proteinlerin maya hücrelerinde ifade edildiği belirlendi (Şekil 17).



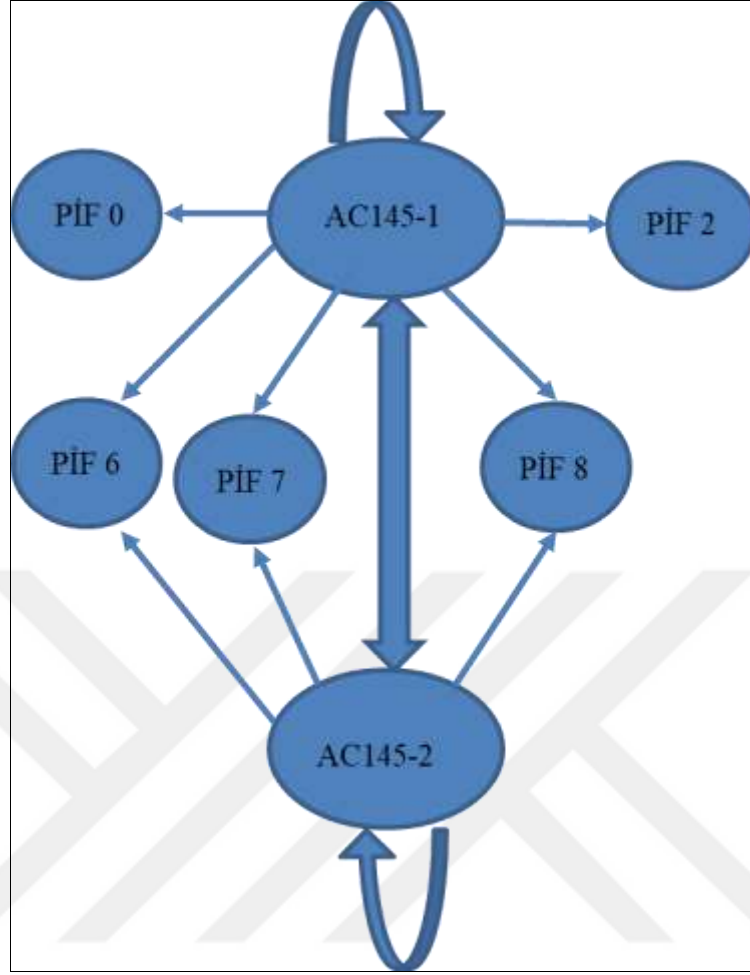
Şekil 17. AC145-1 ve AC145-2 proteinlerinin Western blot hibridizasyon sonucu

3.2.7. *ac145* Genlerinin Oral Enfektiviteden Sorumlu Genlerle Maya İki-Hibrid Sisteminde Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Boş kompotent yapılan AH109 maya hücresi ve pGBK-T7 AC145-1 ve pGBK-T7 AC145-2 vektörlerini içeren kompotent AH109 hücresine transform edilmiş hali şekilde gösterildi (Şekil 18, ilk sıra ilk üç petri). pGBK-T7 AC145-1 proteininin, pGAD-T7 vektöründe bulunan AC145-1, AC145-2, PIF 0, PIF 1, PIF 2, PIF 3, PIF 4, PIF 5, PIF 6, PIF 7, PIF 8 ile etkileşim analizlerinin sonucunda, yalnızca PIF 0, PIF 2, PIF 6, PIF 7, PIF 8, AC145-1 ve AC145-2 ile pozitif etkileşim gözlemlendi (Şekil 18, ilk sıra 4 ve 5. petri ve ikinci sıra). pGBK-T7 AC145-2 proteininin ise bu proteinlerden yalnızca PIF 6, PIF 7, PIF 8, AC145-1 ve AC145-2 ile etkileşimde olduğu tespit edildi (Şekil 18, üçüncü sıra). Etkileşim belirlenen petriyer fotoğraflandı (Şekil 18). Aynı zamanda, etkileşimler şematik olarak Şekil 19’da gösterildi.



Şekil 18. Maya iki-hibrid sisteminde kullanılan kompotent hücreler (AH109, pGBK-T7 *ac145-1*, pGBK-T7 *ac145-2*) ve belirlenen etkileşimler. Belirlenen etkileşimler pGBK-T7 gen + pGAD-T7 gen isimleri yazılarak isimlendirildi.

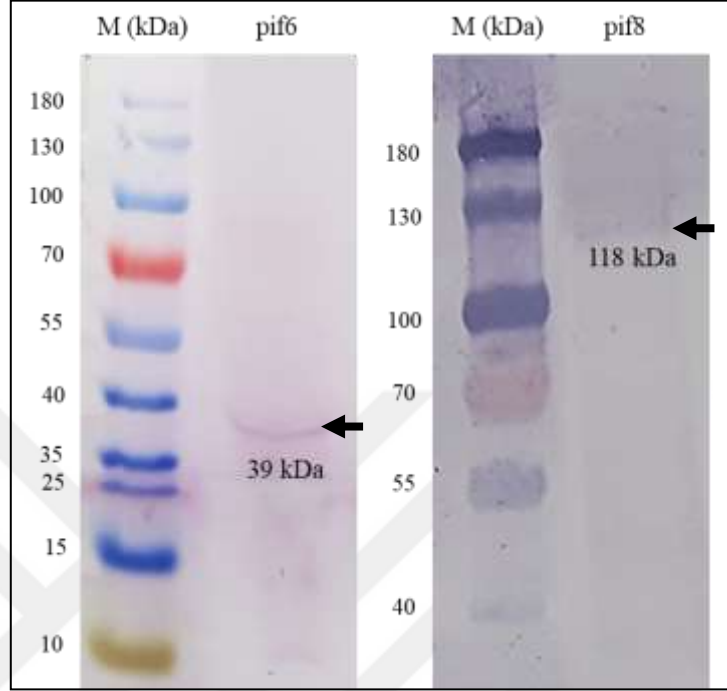


Şekil 19. Maya iki-hibrid sistemi kullanılarak AC145-1 ve AC145-2 proteinlerinin birbirleriyle ve oral enfektivite proteinleriyle belirlenen protein etkileşimlerinin şemantik gösterimi

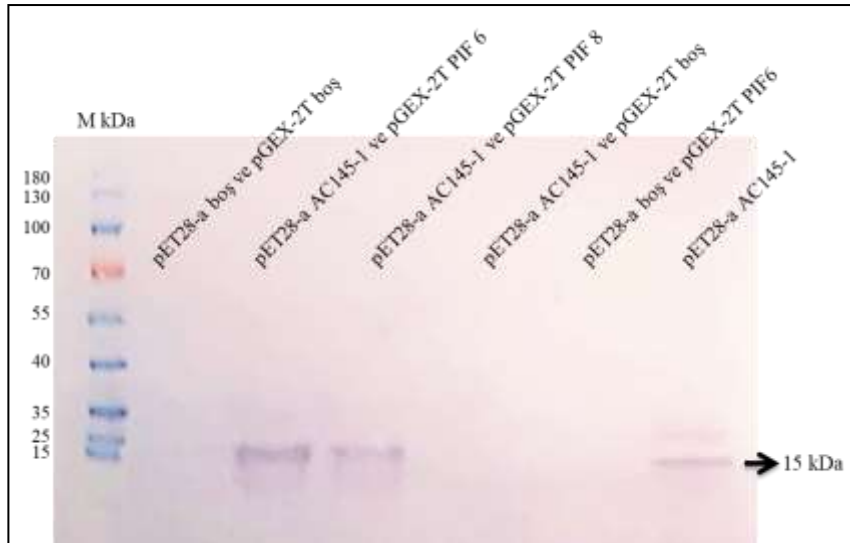
3.2.8. Pull-Down Analizi ile Doğrulama

Tespit edilen genetik etkileşimleri doğrulamak amacıyla biyokimyasal bir yöntem olan pull down analizi kullanıldı. Doğrulama için pGEX-2T vektörüne *pif 6* ve *pif 8* genleri klonlandı. pGEX-2T PIF 6'nın büyüklüğü 39 kDa, pGEX-2T PIF 8'in büyüklüğü de 118 kDa olarak jelde görüntüledi (Şekil 20). pET28-a AC145-1'in büyüklüğü ise 15 kDa olarak jelde tespit edildi (Şekil 21). Etkileşimler yapıldı. Negatif kontrol olarak pET28-a boş ve pGEX-2T boş eşleşmesi, pET28-a AC145-1 ve pGEX-2T boş eşleşmesi, pGEX-2T PIF 6 ve pET28-a boş eşleşmesi şeklindeki kombinasyonlar kullanıldı ve jelde bant görüntülenmedi. Pozitif kontrol olarak pET28-a AC145-1 proteini kullanıldı. Etkileşim için de pET28-a AC145-1 ve pGEX-2T PIF 6 eşleşmesi, pET28-a AC145-1 ve pGEX-2T

PIF 8 eşleşmesi kullanıldı ve etkileşim sonucunda, pozitif kontrolde de olan 15 kDa büyüklüğünde bantlar gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 20. pGEX-2T PIF 6 ve PIF 8'in büyüklüğü



Şekil 21. Pull-down analizi ile AC145-1'in PIF 6 ve PIF 8 ile etkileşiminin doğrulanması

4. TARTIŞMA

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin ortaya çıkması ve az maliyetle yüksek verim alınması, geleneksel Sanger yönteminden yeni nesil dizileme teknolojilerine hızlı bir geçişe neden olmuştur. Yeni nesil dizileme, Sanger yöntemini temel almayan ve dizilerin tek seferde milyonlarca üretimini sağlayan yüksek verimlilikte bir yöntemdir (Schuster, 2008; Hall, 2007). En yaygın NGS platformları Roche 454 pirodizileme (454 Life Science), Illumina HiSeq (Solexa) dizileme ve SOLiD dizileme (ABI Biosystems). Bu platformlar içerisinde Illumina HiSeq (Solexa) dizileme yöntemi hata oranının düşük olması nedeniyle, son zamanlarda bakülovirüs genomlarının dizilenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bakülovirüslerin, çok çeşitli konukçuları enfekte ettiği ve doğada birçok böcek popülasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bakülovirüsler, günümüzde çevre dostu biyolojik mücadele etmenleri olarak böcek popülasyonlarının kontrolünde kullanılmaktadır. Ek olarak, böcek hücrelerinde rekombinant proteinlerin üretimi için etkili bakülovirüs ifade sistemleri ve gen terapisi için umut verici vektörler olarak kullanılmaktadır (Possee, 1997; Summers, 2006).

Bugüne kadar, farklı böcek türlerinden 600'ün üzerinde bakülovirüsün izole edildiği bildirilmiştir. Bu virüslerin 80'inin komple genom dizi analizleri yapılmış ve genom haritaları çıkarılmıştır (URL-1, 2018). Bakülovirüslerin genom organizasyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir. Fakat bu zamana kadar yapılan bakülovirüs genom dizilemelerine yönelik yürütülen çalışmalarda ManeNPV'nin genom dizilemesi yapılmamıştır. Bu tez ile birlikte ilk defa ManeNPV genom organizasyonu belirlenmiştir.

Bakülovirüs genomları, 81.7-178.7 kbp arasında değişen, dairesel ve çift iplikli DNA'dan oluşur (Lauzon vd., 2004; Hayakawa vd., 1999). ManeNPV-T2 genomunun dizilenmesi sonucunda genom büyüklüğü, 130.202 bp olarak belirlendi. Ayrıca ManeNPV'nin restriksiyon endonükleaz analizi ile genomunun belirlendiği çalışmada, genomun büyüklüğü 139 kbp olarak belirtilmiştir (Kikhno vd. 2002).

Diğer dizilenmiş bakülovirüs genomlarına kıyasla, ManeNPV-T2 genomunun büyüklüğü, Tablo 15'te gösterildiği gibi, Grup II NPV'lerden *Agrotis segetum* NPV-B, *Helicoverpa armigera* NPV, *Spodoptera litura* NPV ve *Trichoplusia ni* SNPV'den daha

küçüktür. Tablo 15’de gösterilen Grup I NPV’lerin ise hepsinden küçük genom boyutuna sahiptir.

ManeNPV-T2 genomunun AT içeriği açısından zengin olduğu ve G+C içeriğinin de %38.2 olduğu belirlendi. Bu oran genom dizi analizi yapılan Grup I Alfabakülovirüslerden *Anticarsia gemmatalis* NPV, *AcMNPV*, *Hyphantria cunea* NPV ve *Orgyia pseudotsugata* MNPV virüslerinin G+C içeriğinden daha düşüktür. ManeNPV-T2 genomun G+C içeriği Grup II Alfabakülovirüslerden *Agrotis segetum* NPV-B, *Spodoptera litura* NPV ve *Trichoplusia ni* SNPV’nin G+C içeriğinden de düşükken, *Adoxophyes honmai* NPV, *Adoxophyes orana* NPV, *Buzura suppressaria* NPV ve *Urbanus proteus* NPV’nin G+C içeriğinden daha yüksek bir orana sahiptir (Tablo 15). Tablo 15’de belirtildiği gibi genom büyüklüğü ve G+C içeriği olarak HearNPV genomuna en yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 15. Bazı Alfabakülovirüslerin genom boyutları ve %G+C oranları

Virüs	Erişim no.	Uzunluk (bp)	G+C (%)	Referans
Cins: <i>Alphabaculovirus</i> (Grup I)				
<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV	NC_008520	132239	44.5	de Castro Oliveira vd., 2006
<i>Autographa californica</i> MNPV	NC_001623	133894	40.7	Ayres vd., 1994
<i>Hyphantria cunea</i> NPV	NC_007767	132959	45.5	Ikeda vd., 2006
<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	NC_001875	131995	55.1	Ahrens vd., 1997
Cins: <i>Alphabaculovirus</i> (Grup II)				
<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	NC_004690	113220	35.6	Nakai vd., 2003
<i>Adoxophyes orana</i> NPV	NC_011423	111724	35	Hilton ve Winstanley, 2008
<i>Agrotis segetum</i> NPV B	NC_025960	148981	45.7	Wennmann vd., 2015
<i>Buzura suppressaria</i> NPV	NC_023442	120420	36.8	Zhu vd., 2014
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	NC_003094	130759	38.9	Zhang vd., 2005
<i>Spodoptera litura</i> NPV	NC_003102	139342	42.8	Pang vd., 2001
<i>Trichoplusia ni</i> SNPV	NC_007383	134394	39	Willis vd., 2005
<i>Urbanus proteus</i> NPV	KR011717	105555	34.7	Santos vd., 2018

ManeNPV-T2, AcMNPV, TniSNPV, HearNPV, UrprNPV ve CpGV ile sırasıyla 86, 91, 100, 94 ve 60 ORF'yi paylaşmaktadır (Tablo 12). ManeNPV-T2'de bulunan ve fonksiyonu bilinmeyen (hipotetik) 27 ORF'den 14'ünün diğer bakülovirüs genomlarında da homologları olduğu belirlendi. Diğer 7 ORF'nin ise (7, 16, 64, 91, 99, 106, 112) sadece *Malacosoma sp.* NPV'lerin (KU563146.1) yapılan kısmi dizilemelerinde olduğu belirlendi. Hipotetik proteinler, varlığı önceden tahmin edilen, ancak *in vivo* olarak ifade edildiği deneysel kanıtın bulunmadığı proteinlerdir. Çeşitli genomların, dizilişi ve fonksiyonlarının kolayca belirlenemediği çok sayıda tahmini açık okuma çerçevesi içerdiği bilinmektedir. Korunmamış veya korunmuş hipotetik proteinler olan bu proteinler, her yeni dizilenmiş genomda kodlanmış proteinlerin %20 ile %40'ını oluşturur (Zarebinski vd., 1998).

Geriye kalan altı ORF'nin (ORF'ler 4, 6, 11, 63, 77, 78) ise veri tabanlarında (GenBank / DDBJ / EMBL) tanınabilir homologlara sahip olmadığı belirlendi ve şu andan itibaren ManeNPV-T2'ye özgü olarak kabul edildi. Fakat günümüzde bakülovirüslerde 90-180 arasında ORF bulunduğu kabul edilmektedir ve genom bankasında tanılabılır homologlara sahip olmayan ORF'lerin konaktan geldiği düşünülmektedir. Birlikte evrilirken virüs ve konak arasında genetik materyal değişimi olduğu tahmin edilmektedir. Birlikte evrilme, yani doğal seleksiyonla etkilenen türlerde karşılıklı evrim, patojenler ve konukçuları arasındaki tarihsel ilişkilerde önemli bir faktördür (Thompson, 1999; Woolhouse vd., 2002).

ManeNPV-T2 genomunda DNA replikasyonundan sorumlu 9 adet gen bulunmaktadır (Tablo 13). DNA replikasyonundan sorumlu olduğu bilinen ve birçok bakülovirüs genomunda bulunmadığı gibi ManeNPV-T2 genomunda da bulunmayan *helikaz-2* (LdORF50), *dna-ligaz* (LdORF22), *dUTPaz* (LdORF116), *RNaz redüktaz-1* (LdORF148) ve *RNaz redüktaz-2* (LdORF147) genleri LdMNPV (NC_001973) genomunda mevcuttur. Aynı zamanda *pcna* (Anpe48), *lef-7* (Anpe116), *ie-2* (Anpe141) ve *pe38* (Anpe144) genleri de ManeNPV-T2 genomunda mevcut değildir fakat AnpeNPV (NC_008035) genomunda bulunur.

Bakülovirüs transkripsiyonu birçok gen tarafından düzenlenir ve bu genlerden 10 tanesi ManeNPV-T2 genomunda mevcuttur (Tablo 13). ManeNPV-T2 genomunda bulunmayan *lef-10* (LdORF56) geni LdMNPV ve *Clanis bilineata* NPV (CibiNPV) (Zhu vd., 2009), *Orgyia leucostigma* NPV (OrleNPV) (Thumbi vd., 2011) ve *Sucra jujuba* NPV (SujuNPV) (Liu vd., 2014) genomlarında da bulunmamaktadır. NPV genomunda bulunmaktadır. LEF-10'un, bakülovirüs geç gen transkripsiyonundan sorumlu olduğu

düşünülmektedir ve homologları, tüm Grup I ve çoğu Grup II NPV ve GV genomlarında bulunur (Xu vd., 2016; Rohrmann, 2013). *Bombyx mori* nükleopolihedrovirüs'ünde (BmNPV) *lef-10*'un viral DNA replikasyonu ve gen ekspresyonu için gerekli olduğu bulunmuştur (Yu vd., 2013).

ManeNPV-T2'de bulunan *iap* (*iap-2*, *iap-3*) genleri, TniSNPV ve CpGV'nin *iap* genleriyle yüksek oranda benzerlik göstermektedir. ManeNPV-T2 IAP-2 ve IAP-3, IAP'lerde ortak olan, C-terminalinde çinko RING-parmağı alanlarına sahiptir (Crook vd., 1993). Aynı zamanda her ikisinde de tek kopya halinde bakülovirüs *iap* tekrar (BIR) dizisi vardır. CfMNPV'de *iap-3*'ün iki kopya BIR dizisi olmasına rağmen, *iap-1*'in bir tane BIR dizisi bulunmaktadır (Birnbaum vd., 1994).

Lepidopteran bakülovirüslerin genomları bazı yardımcı genler de içerir. Bu genler viral replikasyon için gerekli değildir, fakat doğada virüsün bazı seçici avantajlara sahip olmasını sağlar (Theilmann ve Stewart, 1992). Bu yardımcı genlerin birkaçının homologları ManeNPV-T2 genomunda da bulunmaktadır. ManeNPV-T2'deki bu genlerin çoğu, TniSNPV'deki homologları ile yüksek homoloji göstermiştir.

Bakülovirüs-tekrarlanan ORF'lerin (*bro*) varlığı bakülovirüs genomlarında yaygın olarak görülen özelliktir (Kuzio vd., 1999). Bu genlerden ekspres edilen proteinler, nükleik asitleri bağlayabilirler (Zemskov vd., 2000). ManeNPV-T2 genomunda sırasıyla 142 ve 359 aa boyutlarında iki *bro* geni (*bro-a* ve *bro-b*) tanımlanmıştır. ManeNPV-T2 genomundaki *bro-a*, BmNPV'nin *bro* (ORF2) geninin aminoasit dizisiyle %79 benzerlik gösterir. Bununla birlikte, *bro-b* geni LdMNPV *bro-b* geninin aminoasit dizisiyle %68 benzerlik gösterir.

Enfeksiyöz bakülovirüslerin, çıplak viral DNA'larının duyarlı böcek hücrelerine transfeksiyonu ile üretilebileceği ve enfeksiyonun başlatılması için gerekli olan erken genlerin transkripsiyonunun, konakçı hücre RNA polimerazı yoluyla gerçekleştirildiği uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle, viral yapısal proteinler, viral genomun korunması ve enfeksiyonun başlatılması için gerekli olmakla birlikte, transkripsiyon veya DNA replikasyonu gibi işlevler için çok gerekli değildir (Rohrmann, 2013). Bu yapısal genlerden 26 tanesi ManeNPV-T2 genomunda bulunmaktadır (Tablo 13). Bunlardan biri de F proteindir. Grup II NPV'lerden HearNPV ve SeMNPV gibi virüsler, Grup I NPV'lerden AcMNPV'de bulunan GP64 benzeri bir proteinden yoksundur. Ancak F olarak adlandırılan bir zarf füzyon proteinine sahiptir. Grup II Alfabakülovirüslerde bulunduğu tespit edilen bu genin ManeNPV-T2 genomunda bulunması da, bu virüsün

Grup II'ye ait bir virüs olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yapısal genlerden olan *vef-1* (Agse75), *vef-2* (Agse76) ve *vef-3* (Agse128), AgseNPV (NC_007921) genomunda bulunmakta fakat ManeNPV-T2 genomunda bulunmamaktadır.

ManeNPV-T2 genomunda birden fazla homologu olan bazı ORF'ler bulunmaktadır. Bunlardan biri, DNA bağlanma proteinini kodladığı düşünülen *chaB* (ORF45, ORF46) genidir. Bu gen tüm Lepidopteran NPV'lerde, örneğin HearNPV (Ha51, Ha52) ve AcMNPV (ORF59, ORF60)'deki gibi bakteriyel ChaB proteinine homolog bir çift komşu ORF içerir. Betabakülovirüslerden, AgseGV ve XcGV genomunda tek homolog halinde bulunmaktadır. ChaB proteinleri, dizi hizalamalarına göre iki ana gruba ayrılır. Grup I, bakteri ve Archaea'da bulunan ChaB proteinlerinden oluşurken, Grup II, bakülovirüslerde bulunan ChaB ile ilişkili proteinleri içerir. Alfabakülovirüs Grup II'ye ait ChaB dizileri sebebiyle bu proteinlerin, DNA bağlanma proteinleri olduğu varsayılmaktadır. Aynı zamanda, virüs enfeksiyonunda bakülovirüs ChaB homologlarının biyolojik önemini belirlemek için daha fazla çalışma gerekmektedir (Zheng vd., 2011).

ManeNPV-T2 genomunda çoklu kopya halinde bulunan diğer bir gen ise nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) sentezinde rol oynayan *nikotinamid ribozid kinaz I* (*nrk1*) (ORF95, ORF96)'dir. ManeNPV-T2 ORF96'sı blastP kullanılarak diğer dizilerle karşılaştırıldığında, Grup II Alfabakülovirüslerden BusuNPV ve SujuNPV gibi bakülovirüslerin NRK1 dizileri ile eşleştiği görülmüştür. Bu durum, bu ORF'nin bir bakülovirüs *nrk1* homologunu kodladığını düşündürmektedir. Ayrıca ORF95 de blastP sonucunda Betabakülovirüslerden CpGV'nin NRK1 proteini ile benzerlik göstermiştir. ORF95 ve ORF96 aminoasit dizileri arasında anlamlı bir dizi benzerliği yoktur. Alfabakülovirüs *nrk1* ORF'leri, yaklaşık 360 aminoasitlik polipeptidleri kodlarken, ORF95 tarafından kodlanan dizi sadece 212 aminoasittir. Hücresel NRK1, NAD⁺'ın biyosentezinde rol oynar, fakat bakülovirüs NRK1 homologlarının işlevi belirsizdir (Ratajczak vd., 2016). OpbuNPV genomunda da bu özelliklere sahip 2 *nrk1* (ORF58, ORF95) gen bölgesi bulunmaktadır. Fakat, ORF'ler ManeNPV-T2 genomundaki gibi birbirinin ardısına gelmemektedir (Harrison vd., 2017).

Lepidopteran bakülovirüslerinin homolog tekrar dizileri (*hrs*), bir genomda farklı konumlara yerleşmiş; transkripsiyon arttırıcıları olarak rol oynadığı düşünülen ve replikasyonun kaynağı olarak görülebilen kusurlu bir palindrom ile tekrarlanan dizilerdir (Hilton ve Winstanley, 2007). Bununla birlikte, her bir *hrs* veya ikili *hrs* kombinasyonlarının silinmesinin hücre kültüründe virüs replikasyonunu etkilemediği

görülmüştür (Carstens ve Wu, 2007). Hrs'ler oldukça değişkendir ve her ne kadar aynı genom içinde birbirine çok benzer olsalar da farklı virüsler arasında çok sınırlı benzerlik gösterebilirler. Lepidopteran bakülovirüs genomlarında, 2-17 hrs tekrarı bulunması yaygındır (Wang vd., 2016). ManeNPV-T2 genomunda toplam 52 tekrarlı 11 farklı tekrar bölgesi vardır ve hrs bölgelerinin merkezlerinde *NdeI* restriksiyon kesim bölgesi bulunmaktadır. Merkezdeki böyle bir restriksiyon endonükleaz bölgesi, bazı bakülovirüslerde bulunan hrs bölgeleri için tipik bir özelliktir (Castro vd., 2009; Pearson vd., 1992). Kusurlu palindromları içeren en büyük intergenik bölge, ManeNPV-T2'de ORF117 ve ORF118 arasında bulundu. Bu bölge 1236 bp boyutundadır ve yüksek AT dizisi içeriğine (yaklaşık %75) sahiptir. Hr11 olarak isimlendirilen bu bölgede 9 kusurlu palindrom tespit edildi.

ManeNPV-T2 genomunda bazı bakülovirüslerde belirlenen çeşitli değişken fonksiyonlu genler ve bilinmeyen fonksiyona sahip bazı korunmuş bakülovirüs ORF'leri de bulunmuştur. Bu genler, Tablo 13'de verilmiştir ve ayrıca bakülovirüs tip türü olan AcMNPV'de bulunan ve fonksiyonu tam olarak bilinmeyen 43 genin ManeNPV-T2 genomunda bulunmadığı tespit edilmiştir.

Kor gen aminoasit dizilerinin peşpeşe sıralanmasının ardından çizilen filogenetik ağaçta ManeNPV-T2 Alfabakülovirüsler içerisinde tekli olarak dallanmıştır. Bu dala yakın olan dallanmalar üzerinde HearNPV, Mamestra sp. NPV'ler, Agrotis sp. NPV'ler ve TniNPV bulunmaktadır. Bunun sonucunda, ManeNPV-T2'de bulunan 38 kor gen homologlarının Grup II NPV'lerdeki kor genlerin homologlarıyla yakın ilişkili olduğu ve ManeNPV-T2'nin Grup II NPV'lere ait olduğu sonucuna varılmıştır.

ManeNPV-T2'nin gen düzenlemesi, büyük ölçüde TniNPV, HearNPV ve UrprNPV'ninki ile aynıdır. Buna karşın, gen düzenlemesi AcMNPV ve CpGV'ninkilerden önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Gene parity-plot analizlerinin grafiklerine bakıldığında TniNPV'de 5 ORF'nin (ORF69, 75, 89, 96, 118), HearNPV'de 6 ORF'nin (ORF49, 50, 76, 90, 93, 119), UrprNPV'de 5 ORF'nin (ORF19, 89, 92, 93, 97) lineer doğrultudan uzaklaştığı görülmektedir. Aynı zamanda genomun sonundaki genlerin dağınık bir kümelenme oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun dışında lineer doğrultuya paralel oluşan gen gruplarından 79 ile 85 arasındaki ORF'ler TniNPV, HearNPV, UrprNPV genomlarıyla karşılaştırıldığında bu ORF'lerin lineer doğrultuya paralel bir kümelenme oluşturduğu fark edilmiştir. Bu, ManeNPV-T2 genomunun gen

kümelenmesinin yakın ilişkili olsa da gen dağılımının bu 3 genomdan farklı olduğunu göstermektedir.

Oral enfektiviteden sorumlu genler, ODV zarfının temel yapısal proteinini kodlar. Bu nedenle, bu genler kor genlerdir ve bunların tamamı (*pif0-pif8*) ManeNPV-T2 genomunda da bulunmaktadır. Bazı PIF'ler Nudivirüsler, Bracovirüsler, Hytrosavirüsler ve Nimavirüsler gibi diğer omurgasız DNA virüslerinde de bulunur (Wang vd., 2010). Bu yüksek korunma seviyesi, PIF'lerin çok eskiden beri virüs giriş yoluna aracılık ettiğini göstermektedir. PIF'ler, moleküler ağırlıklarında ve birincil sekanslarında önemli farklılıklar gösteren bir ODV zarf proteinleri grubudur. Ancak, bazı ortak özellikleri paylaşırlar ve iç nükleer membran sıralama motifi (INM-SM) PIF'lerin N veya C terminallerinde bulunur. Aynı zamanda, yaklaşık 18 aminoasitlik hidrofobik bir transmembran (TM) alanı içermektedirler. Buna ilave olarak, çoğu PIF'ler korunmuş sistein içerir. Bu sisteinlerin potansiyel bir önemi, moleküller arası disülfid bağları oluşturmaktır. Böylece PIF kompleksi oluşturmak veya PIF proteinlerinin ayrı ayrı katlanmasına yardımcı olmak için PIF'ler arasındaki etkileşimi kolaylaştırır (Zhang vd., 2014). Bu PIF'lerin özelliklerine bakıldığında *ac145-1* ve *ac145-2* genlerine ait proteinlerinin de korunmuş sistein içerdikleri tespit edildi. Aynı zamanda, AC145-1'de sinyal peptid bölgesi bulunurken, AC145-2'de TM domaini bulunmaktadır. Bu genlerin ürünleri olan proteinlerin oral enfektivite faktörü olabileceğini belirten bir çalışma yapılmıştır (Lapointe vd., 2004). *ac145*'in silinmesi, *T. ni* için yabani tip (wt) AcMNPV'ye kıyasla enfektivitede altı kat azalmaya neden olurken, aynı durum *H. virescens* için enfektivitede bir düşüş meydana getirmemiştir. Çoklu kopya halinde bulunan diğer bir gen de *ac145* (ORF12, ORF50)'dir. *ac145*'in homologlarının Lepidopteran NPV'leri ve GV'leri ve Hymenopteran NPV'lerinin genomunda bulunduğu, fakat Dipteran NPV genomlarında bulunmadığı belirtilmiştir (Rohrmann, 2013). Bu genin oral enfektiviteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir ve çoklu kopya halinde bulunduğu başka bir genom yoktur. Buradan yola çıkarak *ac145* geninin hem genomda çoklu kopya halinde bulunması, hem de oral enfektivite faktörü olabileceği düşünülmesi nedeniyle bu genin oral enfektiviteden sorumlu genlerle etkileşimleri araştırıldı.

Canlı hücrelerde protein-protein etkileşimlerinin ve makromoleküler kompleks oluşumunun izlenmesi, oral enfektivite dinamiklerini ve mekanizmasını anlamak için son derece yararlıdır. Günümüzde, canlı hücrelerdeki maya iki-hibrid (Y2H) sistemi, floresan rezonans enerji transferi (FRET) ve bimoleküler floresan tamamlama (BiFC) testi gibi

protein etkileşimlerini incelemek için çeşitli yöntemler mevcuttur (Fan vd., 2008). Y2H sisteminde, iki protein, DNA bağlanma alanı (BD) ve aktivasyon alanı (AD) ile ayrı ayrı kaynaştırılır. Bunlar, bu iki protein arasında etkileşim olduğunda dört bağımsız raportör genin transkripsiyonunu aktifleştirir. Bu sayede protein etkileşimi belirlenir. Oral enfektiviteden sorumlu genlerin aralarındaki etkileşimler maya iki-hibrid sisteminde belirlenmiştir (Zheng vd., 2017). Bu tez kapsamında AC145-1'in oral enfeksiyondan sorumlu proteinlerle etkileşimi araştırıldı ve bunun sonucunda AC145-1'in PIF0, PIF2, PIF6, PIF7 ve PIF8 ile ac145-2'nin ise PIF6, PIF7 ve PIF8 ile etkileşimde olduğu bulundu. Bu etkileşimler doğrultusunda AC145 proteininin de oral enfeksiyon faktörlerinin oluşturduğu komplekste yer alabileceği düşünülmektedir. Oral enfektivite faktörlerinin birbirlerine bağlanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda bakülovirüslerin biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar artmakta ve aynı zamanda tıp alanında aşı üretimlerinde kullanımı yaygınlaşmaktadır. Ayrıca gen yapı ve organizasyonları bakımından ökaryotik hücrelere benzemesi, bakülovirüsleri biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında da önemli çalışma materyalleri haline getirmiştir. Bu virüslerin gen yapı ve genom organizasyonlarının bilinmesi bakülovirüslerin biyoteknolojide kullanılabilirliklerini de arttırmaktadır. Virüslere ait genlerin silinmesi, susturulması, gen aktarımlarıyla rekombinant virüslerin oluşturulması, yeni gen terapi ve gen ekspresyon vektörlerinin inşa edilmesi gibi son derece önemli biyoteknolojik sahalarda kullanılmalarını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle komple genomu bilinen bir mikroorganizmanın tıp, genetik, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji alanlarında kullanılma potansiyeli artmaktadır. Belirtilen hususlara hizmet etmek amacıyla, bu doktora tezinde ilk defa Türkiye'den izole edilen bir Malacosoma neustria nükleopolihedrovirüs (ManeNPV-T2)'ün komple genom organizasyonu belirlenmiştir. Günümüzde dünya literatüründe de komple genom dizi analizi ve genom organizasyonu belirlenen ilk ManeNPV izolatıdır. Aynı zamanda oral enfeksiyondan sorumlu olduğu düşünülen *ac145* genlerinin proteinleri oral enfeksiyondan sorumlu genlere ait proteinlerle etkileşimleri araştırılarak, oral enfektivite kompleksinde bulunup bulunmadığına dair literatürde eksik olan bilgilerin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu yapılanlarla birlikte bu tez çalışması, ülkemizde ve dünya da ManeNPV'nin genom organizasyonunun belirlenerek, virüsün biyoteknolojik sahalarda kullanılabilirliğini arttırması açısından önem arz etmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu doktora tezi kapsamında, *Malacosoma neustria* larvalarından izole edilen yerel ManeNPV-T2'nin komple genom dizi analizi yapıldı, genom organizasyonu belirlendi ve potansiyel oral enfektivite genlerinin (*ac145-1*, *ac145-2*) protein etkileşimleri araştırıldı. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler aşağıda sıralanmıştır:

1. ManeNPV-T2'nin komple genom organizasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalar sonucunda;
 - a) ManeNPV-T2 genomunun büyüklüğü 130.202 bp olarak belirlendi ve varsayılan 131 ORF'yi içerdiği tespit edildi. Virüs genomunun G+C içeriği %38.2 olarak belirlendi.
 - b) Genomda 27 adet ORF'nin hipotetik olduğu ve bunlardan 6 (ORF'ler 4, 6, 11, 63, 77, 78) tanesinin yalnızca ManeNPV-T2 genomunda bulunduğu belirlendi.
 - c) ManeNPV-T2 genomunun Grup II Alfabakülovirüslerin genom içeriğinde olan F proteinine sahip olduğu belirlendi. ManeNPV-T2 38 kor genin aminoasit dizilerinin birleştirilmesi ile çizilen filogenetik ağaçta Grup II Alfabakülovirüslerin bulunduğu kısımda dallanma gösterdi. F proteininin bulunması ve 38 kor genin aminoasit sırasına göre çizilen filogenetik ağaçtaki sınıflandırmaya göre ManeNPV-T2'nin Alfabakülovirüslerin II. grubuna ait olduğu sonucuna varıldı.
 - d) Gen dağılım analizleri sonucunda, Grup I Alfabakülovirüsler için referans alınan AcMNPV ve Betabakülovirüs için referans alınan CpGV ile ManeNPV-T2'nin gen dağılımının çok farklı olduğu belirlendi. ManeNPV-T2'nin gen dağılımının Grup II Alfabakülovirüs için referans alınan TniNPV, HaNPV ve UrprNPV'ye çok benzer olduğu belirlendi.
 - e) Bakülovirüslerde transkripsiyon arttırıcı olarak düşünülen hrs bölgelerinden, ManeNPV-T2 genomunda toplam 52 tekrarlı ve merkezinde *NdeI* kesim bölgesi bulunan 11 adet tekrar bölgesi belirlendi.
 - f) Viral enfektiviteyi arttırdığı ya da DNA replikasyonunda görev alabileceği düşünülen *bro* genlerinden, ManeNPV-T2 genomunda 2 adet olduğu belirlendi.

- g) ManeNPV-T2 genomunda çoklu kopyalar halinde potansiyel oral enfektivite faktörü olan *ac145* (orf12, orf50) , DNA bağlanma proteini olduğu düşünülen *chaB* (orf45, orf46), ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) sentezinde rol oynayan *nikotinamid ribozid kinaz 1* (orf95, orf96) genlerinin bulunduğu tespit edildi.
2. Potansiyel oral enfektivite faktörü olduğu düşünülen *ac145* geninin ürünü proteinlerin oral enfeksiyondan sorumlu proteinlerle maya iki-hibrid sisteminde protein etkileşimleri belirlendi. Buna göre:
- AC145-1 proteininin PIF0, PIF2, PIF6, PIF7, PIF8 proteinleriyle ve kendisiyle etkileşimde olduğu belirlendi.
 - AC145-2 proteininin PIF6, PIF7, PIF8 proteinleriyle ve kendisiyle etkileşimde olduğu belirlendi.
 - AC145 proteinlerinin TM motifi ve korunmuş sistein içermesi açısından oral enfektivite faktörlerine benzerlik göstermesi ve aynı zamanda oral etkileşim faktörleriyle protein-protein etkileşimlerinin bulunması, bu genlerin de oral enfektivite protein kompleksinde yer alabileceğini düşündürmektedir.

Bu sonuçlar doğrultusunda bu tez çalışmasıyla,

- Türkiye’den izole edilen bir virüsün ilk kez komple genom organizasyonu belirlendi.
- Literatürde birçok bakülovirüsün komple genom organizasyonu belli olmasına rağmen, ManeNPV genomunun dizilenmesi ilk kez bu tez kapsamında gerçekleştirildi.
- Virüsün filogenetik gen karşılaştırmaları ve gen içeriği dikkate alınarak Alfabakülovirüs Grup II sınıfına ait olduğu tespit edildi.
- Potansiyel enfektivite faktörü olduğu düşünülen AC145 proteininin oral enfektiviteden sorumlu proteinlerle etkileşimleri belirlenerek bu genin oral enfektivite kompleksinde yer alabileceği hipotezi ortaya kondu.
- Tez konusunu oluşturan virüsün genom özellikleri literatüre kazandırılarak bilim dünyasının hizmetine sunuldu.

6. ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma, ManeNPV-T2'nin genom organizasyonunun belirlenmesi ve potansiyel oral enfektiviteden sorumlu olduğu düşünülen AC145 proteinlerinin, oral enfektiviteden sorumlu olduğu bilinen PIF proteinleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi ile önemli sonuçlara varılmış olmanın yanı sıra, yeni araştırmalara öncülük edebilecek bir takım soru ve önerilerin ortaya çıkmasına imkan sağlamıştır. Bu öneriler aşağıda sıralanmıştır:

1. Genom organizasyonu belirlenen ManeNPV-T2'nin genomunda bulunan hipotetik ve sadece bu virüse özgü olduğu belirlenen ORF'lerin fonksiyonlarının belirlenmesi çalışmaları yapılabilir.
2. Diğer bakülovirüs genomlarından farklı bir diziyeye sahip olan hrs bölgelerinin fonksiyonlarının belirlenmesi çalışmaları yapılabilir.
3. *ac145* genlerinin transkripsiyonel analizleri yapılarak genlerin sınıflandırılması çalışmaları gerçekleştirilebilir.
4. Aynı zamanda *ac145* genlerinin fonksiyonel analizinin yapılabilmesine yönelik, hem tek tek hem de birlikte genomdan silinerek rekombinant virüs oluşturulması ve bu virüsün yaban tip virüs ile karşılaştırmalı biyotest çalışmaları yapılabilir.
5. AC145 proteininin oral enfektiviteden sorumlu proteinlerin oluşturduğu kompleksin içinde olup olmadığı ve kompleksin neresinde yer alabileceğine yönelik çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- 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, 399, 381-399.
- Aravind, L., Walker, D.R. ve Koonin, E.V., 1999. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems, Nucleic Acids Res., 27, 1223-1242.
- Arvy, L., 1953. Sur la présence probable d'un virus du genre Paillotella Steinhaus dans les leucocytes de *Malacosoma neustria* L. (Lépidoptère, Lasiocampidae), Rev. Hematol., 8, 204-12 (in French).
- Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. ve Possee, R.D., 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virüs, Virology, 202, 586-605.
- Beljelarskaya, S.H., 2002. A baculovirus expression system for insect cells, Mol. Biol., 36, 281-292.
- Berggard, T., Linse, S. ve James, P., 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions, Proteomics, 7, 2833-2842.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J. ve Miller, L.K., 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs, J. Virol., 68, 2521-2528.
- Blissard, G.W. ve Rohrman, G.F., 1990. Baculovirus diversity and molecular biology, Ann. Rev. Entomol., 35, 127-155.
- Blissard, G.W. ve Theilman, D.A., 2018. Baculovirus entry and egress from insect cells, Annu. Rev. Virol., 5, 113-139.
- Blissard, G.W. ve Wenz, J.R., 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion, J. Virol., 66, 6829-6835.
- Blissard, G.W., Black, B., Crook, N., Keddie, B.A. ve Possee, R., 2000. Family Baculoviridae. Editörler: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B. ve Estes M.K., *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, San Diego, Academic, 195-202.
- Boogaard, B., van Oers, M.M. ve van Lent, J.W.M., 2018. An Advanced View on Baculovirus per Os Infectivity Factors, Insects, 9, 83.
- Boughton, A.J., Harrison, R.L., Lewis, L.C. ve Bonning, B.C., 1999. Characterization of a nucleopolyhedrovirus from black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), J. Invertebr. Pathol., 74, 289-294 .

- Braun, P. ve Gingras, A.C., 2012. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks, Proteomics, 12, 1478-1498.
- Braunagel, S.C., Russell, W.K., Rosas-Acosta, G., Russell, D.H. ve Summers, M.D., 2003. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 9797-9802.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. ve Schlattner, U., 2009. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology, Int. J. Mol. Sci., 10, 2763-2788.
- Carstens, E.B. ve Ball, L.A., 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2008). Arch Virol., 154, 1181-1188.
- Carstens, E.B. ve Wu, Y., 2007. No single homologous repeat region is essential for DNA replication of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol., 88, 114-122.
- Castro, M.E., Ribeiro, Z.M., Santos, A.C., Souza, M.L., Machado, E.B., Sousa, N.J. ve Moscardi, F., 2009. Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil, J. Invertebr. Pathol., 102, 149-154.
- Cheley, S., Kosik, K.S., Paskevich, P., Bakalis, S. ve Bayley, H., 1992. Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells, J. Cell Sci., 102, 739-752.
- Chen, X., IJkel, W.F., Tarchini, R., Sun, X., Sandbrink, H., Wang, H., Peters, S., Zuidema, D., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M. ve Hu, Z., 2001. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome, J. Gen. Virol., 82, 241-257.
- Chen, Y.R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J.Z., Zhang, S. ve Blissard, G.W., 2013. The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells, J. Virol., 87, 6391-6405.
- Chisholm, G.E. ve Henner, D.J., 1988. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene, J. Virol., 62, 3193-3200.
- Clem, R.J., 2007. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses, Curr. Drug Targets, 8, 1069-1074.
- Clem, R.J., Fechheimer, M. ve Miller, L.K., 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells, Science, 254, 1388-1390.
- Cory, J.S. ve Myers, J.H., 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 34, 239-72.

- Crook, N.E., Clem, R.J. ve Miller, L.K., 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif, J. Virol., 67, 2168-2174.
- Daimon T., Katsuma, S., Kang, W. ve Shimada, T., 2006. Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog, BmChi-h, Biochem. Biophys. Res. Commun., 345, 825-833.
- Dall, D., Luque, T. ve O'Reilly, D.R., 2001. Insect-virus relationships: sifting by informatics, Bioessays, 23, 184-193.
- Danismazoglu, M., Nalcacioglu, R., Muratoglu, H. ve Demirbag, Z., 2018. The protein-protein interactions between *Amsacta moorei* entomopoxvirus (AMEV) protein kinases (PKs) and all viral proteins, Virus Res., 248, 31-38.
- de Castro Oliveira, J.V., Wolff, J.L.C., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B.M., de Castro, M.E., de Souza, M.L., Moscardi, F., Maruniak, J.E. ve Zanotto, P.M., 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol., 87, 3233-3250.
- Demir, İ., Gürel, N., Nalçacıoğlu, R., İnce, İ.A. ve Demirbağ, Z., 2009. Productive replication of *Malacosoma neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) in Md203 cell line, Turk. J. Biol., 33, 239-248.
- Demir, İ., Nalcacioglu, R., Mohammed Gholizad, L. ve Demirbag, Z., 2013. Characterization of a new isolate of *Malacosoma Neustria* nucleopolyhedrovirus (ManeNPV) from Turkey, Turk. J. Biol., 37, 385-391.
- Demir, İ., Nalcacioglu, R., Mohammed Gholizad, L. ve Demirbag, Z., 2014. A highly effective nucleopolyhedrovirus against *Malacosoma* spp. (Lepidoptera: Lasiocampidae) from Turkey: isolation, characterization, phylogeny, and virulence, Turk. J. Agric. For., 38, 462-470.
- Deng, F., Wang, R., Fang, M., Jiang, Y., Xushi, X., Yang, H., Chen, X., Arif, B.M., Guo, L., Wang, H. ve Hu, Z., 2007. Proteomics analysis of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100, J. Virol., 81, 9377-9385.
- Detvisitsakun, C., Cain, E.L. ve Passarelli, A.L., 2007. The *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor accelerates host mortality, Virology, 365, 70-78.
- Dong, S., Wang, M., Qiu, Z., Deng, F., Vlak, J.M., Hu, Z. ve Wang, H., 2010. *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus efficiently infects Sf9 cells and transduces mammalian cells via direct fusion with the plasma membrane at low pH, J. Virol., 84, 5351-5359.
- Drezen, J.M., Gauthier, J., Josse, T., Bezier, A., Herniou, E. ve Huguet, E., 2017. Foreign DNA acquisition by invertebrate genomes, J. Invertebr. Pathol., 147, 157-168.

- Du, Q., Lehavi, D., Faktor, O., Qi, Y. ve Chejanovsky, N., 1999. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus, J. Virol., 73, 1278-85.
- El-Salamouny, S., Lang, M., Jutzi, M., Huber, J. ve Jehle, J.A., 2003. Comparative study on the susceptibility of cutworms (Lepidoptera: Noctuidae) to *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus and *Agrotis ipsilon* nucleopolyhedrovirus, J. Invertebr. Pathol., 84, 75-82.
- Escasa, S.R., Lauzon, H.A., Mathur, A.C., Krell, P.J. ve Arif, B.M., 2006. Sequence analysis of the *Choristoneura occidentalis* granulovirus genome, J. Gen. Virol., 87, 1917-1933.
- Esteban, D.J., Da Silva, M. ve Upton, C., 2005. New bioinformatics tools for viral genome analyses at Viral Bioinformatics – Canada, Pharmacogenomics, 6, 271-80.
- Estojak, J., Brent, R. ve Golemis, E.A., 1995. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements, Mol. Cell. Biol., 15, 5820-5829.
- Evans, J.T., Leisy, D.J. ve Rohrmann, G.F., 1997. Characterization of the interaction between the baculovirus replication factors, LEF-1 and LEF-2, J. Virol., 71, 3114-3119.
- Fan, J.Y., Cui, Z.Q., Wei, H.P., Zhang, Z.P., Zhou, Y.F., Wang, Y.P. ve Zhang, X.E., 2008. Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 367, 47-53.
- Fang, M., Nie, Y. ve Theilmann, D.A., 2009a. Deletion of the AcMNPV core gene ac109 results in budded virions that are non-infectious, Virology, 389, 66-74.
- Fang, M., Nie, Y., Harris, S., Erlandson, M.A. ve Theilmann, D.A., 2009b. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene ac96 encodes a per os infectivity factor (pif-4). J. Virol., 83, 12569-12578.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G.V. ve Wilson, J.A., 1997. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo, J. Gen. Virol., 78, 12, 3091-3100.
- Ferrelli, M.L., Berretta, M.F., Baleich, M.N., Ghiringhelli, P.D., Sciocco-Cap, A. ve Romanowski, V., 2012. The Baculoviral genome, Maria Laura Garcia, M.L. ve Romanowski, V., *Viral Genomes - Molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions*, Publisher InTech, 1-32.
- Fields, S. ve Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions, Nature, 340, 245-246.

- Flexner, J.L. ve Belnavis, D.L., 2000. Microbial Insecticides, Rechcigl, J.E. ve Rechcigl, N.A., Biological and Biotechnological Control of Insect Pest, Lewis Publishers, Boca Raton, 392.
- Flipsen, J.T.M., 1995. Systemic infection of *Spodoptera exigua* larvae using a marked *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virüs recombinant, Pathogenesis Induced by (Recombinant) Baculovirus in Insects, PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Friedel, C. ve Haas, J., 2011. Virus-host interactomes and global models of virus-infected cells, Trends Microbiology, 19, 501-508.
- Fuchs, Y.L., 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.
- Fukamizo, T., Sato, H., Mizuhara, M., Ohnuma, T., Gotoh, T., Hiwatashi, K. ve Takahashi, S., 2011. Chitinase from *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus: Rapid Purification from Sf-9 Medium and Mode of Action, Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 1763-1769.
- Garavaglia, M.J., Miele, S.A.B., Iserte, J.A., Belaich, M.N. ve Ghiringhelli, P.D., 2012 The *ac53*, *ac78*, *ac101*, and *ac103* genes are newly discovered core genes in the family *Baculoviridae*. J. Virol., 86, 12069-12079.
- Ge, J., Wei, Z., Huang, Y., Yin, J., Zhou, Z. ve Zhong, J., 2007. AcMNPV ORF38 protein has the activity of ADP-ribose pyrophosphatase and is important for virus replication, Virology, 361, 204-211.
- Gencer, D., Yanar, O., Yesilyurt, A., Nalcacioglu, R. ve Demir, I., yayınlanmamış veri. Identification of a new nucleopolyhedrovirus isolate from *Malacosoma Neustria* in Turkey and its pathogenicity on different host.
- Gershenson, S.M., 1955. The nature of intranuclear inclusions of polyhedral diseases of insects, CR Acad. Sci. URSS, 104, 925-928.
- Gombart, A.F., Blissard, G.W. ve Rohrmann, G.F., 1989. Characterization of the genetic organization of the HindIII-M region of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* reveals major differences among baculoviruses, J. Gen. Virol., 70, 1815-1828.
- Gomi, S., Zhou, C.E., Yih, W., Majima, K. ve Maeda, S., 1997. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV, Virology, 230, 35-47.
- Granados, R.R. ve Lawler, K.A., 1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection, Virology, 108, 297.

- Granados, R.R., 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus, Virology, 90, 170.
- Grigoriev, A., 2003. On the number of protein–protein interactions in the yeast proteome, Nucleic Acids Res., 31, 4157–4161.
- Gross, C.H., Russell, R.L.Q. ve Rohrmann, G.F., 1994. The *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure, J. Gen. Virol., 75, 1115-1123.
- Gruła, 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.
- Guarente, L., 1993. Strategies for the identification of interacting proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1639-1641.
- Guarino, L.A. ve Summers, M.D., 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene, J. Virol., 57, 563-571.
- Guarino, L.A., Dong, W. ve Jin, J., 2002. In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5, J. Virol., 76, 12663-12675.
- Guarino, L.A., Dong, W., Xu, B., Broussar, D.R., Davis, R.W. ve Jarvis, D.L., 1992. The baculovirus phosphoprotein pp31 is associated with the virogenic stroma, J. Virol., 66, 7113-7120.
- Guy, M.P. ve Friesen, P.D., 2008. Reactive-site cleavage residues confer target specificity to baculovirus P49, a dimeric member of the P35 family of caspase inhibitors, J. Virol., 82, 7504-14.
- Haas, A.L., Katzung, D.J., Reback, P.M. ve Guarino, L.A., 1996. Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*, Biochemistry, 35, 5385-5394.
- Hall, N., 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology, J. Exp. Biol., 210, 1518-1525.
- Harrison, R.L. ve Bonning, B.C., 2000. Genetic engineering of biocontrol agents for insects, Rechcigl, J.E. ve Rechcigl, N.A., *Biological and Biotechnological Control of Insect Pest*, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Harrison, R.L., Sparks, W.O. ve Bonning, B.C., 2010. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus odv-e56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by *rachiplusia* ou multiple nucleopolyhedrovirus odv-e56, J. Gen. Virol., 91, 1173-1182.

- Harrison, R.L. ve Hoover, K., 2012. Baculoviruses and other occluded insect viruses. Editörler: Vega, F.E. ve Kaya, H.K., Insect Pathology, Academic Press, Boston, MA, USA, 73-131.
- Harrison, R.L., Rowley, D.L., Mowery, J.D., Bauchan, G.R. ve Burand, J.P., 2017. The *Operophtera brumata* Nucleopolyhedrovirus (OpbuNPV) Represents an Early, Divergent Lineage within Genus *Alphabaculovirus*, Viruses, 9, 307.
- Harwood, S.H., Li, L., Ho, P.S., Preston, A.K. ve Rohrmann, G.F., 1998. AcMNPV late expression factor-5 interacts with itself and contains a zinc ribbon domain that is required for maximal late transcription activity and is homologous to elongation factor TFIIS, Virology, 250, 118-134.
- Hawtin, R.E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C.J., Gooday, G.W., King, L.A., Kuzio, J.A. ve Possee, R.D., 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes, Virology, 238, 243-253.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.I., Goto, C. ve Maeda, S., 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome, Virology, 262, 277-297.
- Hegedus, D., Baldwin, D., O'Grady, M., Braun, L., Gleddie, S., Sharpe, A., Lydiate, D. ve Erlandson, M., 2003. Midgut Proteases From *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae: Characterization, cDNA Cloning, and Expressed Sequence Tag Analysis, Arch. Insect Biochem. Physiol., 53, 30-47.
- Herniou, E.A. ve Jehle, J.A., 2007. Baculovirus phylogeny and evolution, Curr. Drug Targets, 8, 1043-1050.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A., Cory, J.S. ve O'Reilly, D.R., 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses, Annu. Rev. Entomol., 48, 211-234.
- Hilton, S. ve Winstanley, D., 2007. Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulovirus genome, J. Gen. Virol., 88, 1496-1504.
- Hilton, S. ve Winstanley, D., 2008. Genomic sequence and biological characterization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana*, J. Gen. Virol., 89, 2898-2908.
- Hong, T., Braunagel, S.C. ve Summers, M.D., 1994. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: A structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virüs, Virology, 204, 210-224.
- Hood, L. ve Rowen, L., 2013. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine, Genome Med., 5, 79.

- Horton, H.M. ve Burand, J.P., 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion, J. Virol., 67, 1860.
- Hou, D., Zhang, L., Deng, F., Fang, W., Wang, R., Liu, X., Guo, L., Rayner, S., Chen, X., Wang, H. ve Hu, Z., 2013. Comparative Proteomics Reveal Fundamental Structural and Functional Differences between the Two Progeny Phenotypes of a Baculovirus, J. Virol., 87, 829-839.
- Hu, Z.H., Arif, B.M., Jin, F., Martens, J.W., Chen, X.W., Sun, J.S., Zuidema, D., Goldbach, R.W. ve Vlak, J.M., 1998. Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome, J. Gen. Virol., 79, 2841-2851.
- Huh, N.E. ve Weaver, R.F., 1990. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, J. Gen. Virol., 71, 195-201.
- Huijskens, I., Li, L., Willis, L.G. ve Theilmann, D.A., 2004. Role of AcMNPV IE0 in baculovirus very late gene activation, Virology, 323, 120-130.
- IJkel, W.F.J., van Strien, E.A., Heldens, J.G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W. ve Vlak, J.M., 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome, J. Gen. Virol., 80, 3289-3304.
- Ikeda, M., Shikata, M., Shirata, N., Chaeychomsri, S. ve Kobayashi, M., 2006. Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome, J. Gen. Virol., 87, 2549-2562.
- Imai N., Kang, W., Iwabuchi, K., Sato, K. ve Maeda, S., 2000. Analysis of interaction between molecules of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus IE-2 using a yeast two-hybrid system, Acta Virol., 44, 199-202.
- Iyer L.M., Balaji, S., Koonin, E.V. ve Aravind, L., 2006. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses, Virus Res., 117, 156-84.
- Jankevica, J., Cudare, Z. ve Ose, V., 1998. New isolate of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus in Latvia, J. Invertebr. Pathol., 71, 283-285.
- Javed, M.A., Biswas, S., Willis, L.G., Harris, S., Pritchard, C., van Oers, M.M., Donly, B.C., Erlandson, M.A., Hegedus, D.D. ve Theilmann, D.A. 2017. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus AC83 is a per os infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes, J. Virol., 91, 2115-2116.
- Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M. ve Vlak, J.M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision, Arch. Virol., 151, 1257-1266.

- Jiang, S.S., Chang, I.S., Huang, L.W., Chen, P.C., Wen, C.C., Liu, S.C., Chien, L.C., Lin, C.Y., Hsiung, C.A. ve Juang, J.L., 2006. Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virüs, J. Virol., 80, 8989-8999.
- Johnson, A. ve O'Donnell, M., 2005. Cellular DNA Replicases: Components and Dynamics at the Replication Fork, Ann. Rev. Biochem., 74, 283-315.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. ve Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, Nucleic Acids Res., 30, 3059-3066.
- Ke, J., Wang, J., Deng, R. ve Wang, X., 2008. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac66 is required for the efficient egress of nucleocapsids from the nucleus, general synthesis of preoccluded virions and occlusion body formation, Virology, 374, 421-431.
- Keddie, A.B. ve Erlandson, M.A., 1995. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*, J. Invertebr. Pathol., 65, 43-47.
- Kelly, D.C., Brown, D.A., Ayres, M.D., Allen, C.J. ve Walker, I.O., 1983. Properties of the Major Nucleocapsid Protein of *Heliothis zea* Singly Enveloped Nuclear Polyhedrosis Virus, J. Gen. Virol., 64, 399-408.
- Kikhno, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G. ve Ferber, M.L., 2002. Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol., 83, 3013-3022.
- Kikhno, I.M. ve Strokovskaya, L.I., 1997. Physical mapping of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus genome, Biopolimery i Kletka, 13, 218-221.
- Kool, M., Goldbach, R.W. ve Vlak, J.M., 1994. A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, J. Gen. Virol., 75, 3345-3352.
- Kovacevic, Z., 1926. Der Ringelspinner und der Schwammspinner und ihre Parasiten, Anz Schädlingsk, 2, 93-94 (in German).
- Kovacs, G.R., Guarino, L.A. ve Summers, M.D., 1991. Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus, J. Virol., 65, 5281-5288.
- Krell, P.J., 2008. Baculoviruses: General Features in encyclopedia of Virology, Academic Press, Oxford.
- 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.

- Lapointe, R., Popham, H.J.R. ve Straschil, U., 2004. Characterization of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus proteins, Ac145 and Ac150, which affect oral infectivity in a hostdependent manner, J. Virol., 78, 6439-6448.
- Lauzon, H.A., Lucarotti, C.J., Krell, P.J., Feng, Q., Retnakaran, A. ve Arif, B.M., 2004. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome, Society, 78, 7023-7035.
- Lepore, L.S., Roelvink, P.R. ve Granados, R.R., 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease, J. Invertebr. Pathol., 68, 131-140.
- Li, L., Harwood, S.H. ve Rohrmann, G.F., 1999. Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression, Virology, 255, 9-19.
- Lin, G. ve Blissard, G.W., 2002. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus *lef-6*-null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription, J. Virol., 76, 5503-5514.
- Liu, X., Yin, F., Zhu, Z., Hou, D., Wang, J., Zhang, L., Wang, M., Wang, H., Hu, Z. ve Deng, F. Genomic sequencing and analysis of *Suca jujuba* nucleopolyhedrovirus, PLoS ONE, 9, e110023.
- Liu, J., Zhu, L., Zhang, S., Deng, Z., Huang, Z., Yuan, M., Wu, W. ve Yang, K., 2016. The *autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *ac110* gene encodes a new per os infectivity factor, Virus Res., 221, 30-37.
- Long, C.M., Rohrmann, G.F. ve Merrill, G.F., 2009. The conserved baculovirus protein p33 (Ac92) is a flavin adenine dinucleotide-linked sulfhydryl oxidase, Virology, 388, 231-235.
- Lu, A. ve Carstens, E.B., 1991. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, Virology, 181, 1, 47-336.
- Lu, A. ve Carstens, E.B., 1993. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, Virology, 195, 710-718.
- Lu, A. ve Miller, L.K., 1995a. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication, J. Virol., 69, 975-982.
- Lu, A. ve Miller L.K., 1995b. Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines, J. Virol., 69, 6265-6272.
- Lu, A. ve Miller, L.K., 1994. Identification of three late expression factor genes within the 33.8- to 43.4-map-unit region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, J. Virol., 68, 6710-6718.

- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D.R. ve Winstanley, D., 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome, J. Gen. Virol., 82, 2531-2547.
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Orsomando, G., Raffaelli, N. ve Ruggieri, S., 2004. Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man, Cell Mol. Life. Sci., 61, 19-34.
- 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. PubMed
- Means, J.C. ve Passarelli, A.L., 2010. Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 9825-9830.
- Merrington, C.L., Kitts, P.A., King, L.A. ve Possee, R.D., 1996. An *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus lef-2 mutant: consequences for DNA replication and very late gene expression, Virology, 217, 338-348.
- Mikhailov, V., 2000. Helix-destabilizing properties of the baculovirus single-stranded DNA-binding protein (LEF-3), Virology, 270, 180-189.
- Mikhailov, V., Okano, K. ve Rohrmann, G., 2003. Baculovirus Alkaline Nuclease Possesses a 5'→3' Exonuclease Activity and Associates with the DNA-Binding Protein LEF-3, J. Virol., 77, 2436-2444.
- Mikhailov, V., Okano, K. ve Rohrmann, G., 2004. Specificity of the Endonuclease Activity of the Baculovirus Alkaline Nuclease for Single-stranded DNA, J. Biol. Chem., 279, 14734-14745.
- Mikhailov, V.S., Okano, K. ve Rohrmann, G.F., 2005. The Redox State of the Baculovirus Single-stranded DNA-binding Protein LEF-3 Regulates Its DNA Binding, Unwinding, and Annealing Activities, J. Biol. Chem., 280, 29444-29453.
- Mikhailov, V.S., Vanarsdall, A.L. ve Rohrmann, G.F., 2007. Isolation and characterization of the DNA-binding protein (DBP) of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, Virology, 370, 415-429.
- Milks, M.L., Washburn, J.O., Willis, L.G., Volkman, L.E. ve Theilmann, D.A., 2003. Deletion of pe38 attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in *Heliothis virescens*, Virology, 310, 224-234.
- Miller, L.K. ve Lu, A., 1997. The molecular basis of baculovirus host range, Miller, L.K., *The Baculoviruses*, Plenum Press, New York, 217-236.
- Minion, F.C., Coons, L.B. ve Broome, J.R., 1979. Characterization of the polyhedral envelope of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis virescens*, J. Invertebr. Pathol., 34, 303-307.

- Mishra, G., Chadha, P. ve Das, R.H., 2008. Serine/threonine kinase (pk-1) is a component of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) very late gene transcription complex and it phosphorylates a 102kDa polypeptide of the complex, Virus Res., 137, 147-149.
- Miwa, M., Tanaka, M., Matsushima, T. ve Sugimura, T., 1974. Purification and properties of glycohydrolase from calf thymus splitting ribose-ribose linkages of polyadenosine diphosphate ribose). J. Biol. Chem., 249, 3475-82.
- Monsma, S.A., Oomens, A.G.P. ve Blissard, G.W., 1996. The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission and infection, J. Virol., 70, 4607.
- Nakai, M., Goto, C., Kang, W., Shikata, M., Luque, T. ve Kunimi, Y., 2003. Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*, Virology, 316, 171-183.
- Ngounou Wetie, A.G., Sokolowska, I., Woods, A.G., Roy, U., Deinhardt, K. ve Darie, C.C., 2014. Protein-protein interactions: switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches, Cell. Mol. Life. Sci., 71. 205-228.
- Nie, Y., Fang, M. ve Theilmann, D.A., 2011. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene ac92 (p33) is required for the efficient budded virus production, Virology, 409, 34-45.
- Nie, Y., Fang, M., Erlandson, M.A. ve Theilmann, D.A., 2012. Analysis of the *autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair lef3 and ac68 reveals that ac68 is a per os infectivity factor and that lef3 is critical but not essential, for virus replication, J. Virol., 86, 3985-3994.
- Nooren, I.M.A. ve Thornton, J.M., 2003. Diversity of protein-protein interactions, EMBO J., 22, 3486-3492.
- Ofran, Y. ve Rost, B., 2003. Analysing six types of protein-protein interfaces, J. Mol. Biol., 325, 377-387.
- Ohkawa, T., Washburn, J.O., Sitapara, R., Sid, E. ve Volkman, L.E., 2005. Specific binding of *autographa californica* m nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *heliiothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes ac119 and ac022 but not by ac115, J. Virol., 79, 15258-15264.
- Okano, K., Vanarsdall, A.L., Mikhailov, V.S. ve Rohrmann, G.F., 2006. Conserved molecular systems of the Baculoviridae, Virology, 344, 77-87.
- Oliveira, J.V., Wolff, J.L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B.M., de Castro, M.E., de Souza, M.L., Moscardi, F., Maruniak, J.E. ve Zanotto, P.M., 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus, J. Gen. Virol., 87, 3233-3250.

- Olszewski, J. ve Miller, L.K., 1997. Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation, J. Virol., 71, 5040-5050.
- Ooi, B.G., Rankin, C. ve Miller, L.K., 1989. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene, J. Mol. Biol., 210, 721-736
- Oomens, A.G. ve Blissard, G.W., 1999. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, Virology, 254, 297-314.
- Oomens, A.G., Monsma, S. A. ve Blissard, G.W., 1995. The baculovirus GP64 envelope fusion protein: Synthesis, oligomerization, and processing, Virology, 209, 592-603.
- O'Reilly, D.R. ve Miller, L.K., 1990. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDPglucosyltransferase gene, J. Virol., 64, 1321-1328.
- Pang, Y., Yu, J., Wang, L., Hu, X., Bao, W., Li, G., Chen, C., Han, H., Hu, S. ve Yang, H., 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome, Virology, 287, 391-404.
- Passarelli, A.L., 2011. Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections, Virology, 411, 383-392.
- Passarelli, A.L., Todd, J.W. ve Miller, L.K., 1994. A baculovirus gene involved in late expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerase, J. Virol., 68, 4673-4678.
- Pearson, M., Bjornson, R., Pearson, G. ve Rohrmann, G., 1992. The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins, Science, 257, 1382-1384.
- Pearson, M.N. ve Rohrmann, G.F., 1995. *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins. J. Virol., 69:213-221.
- Pearson, M.N. ve Rohrmann, G.F., 1997. Splicing is required for transactivation by the immediate early gene 1 of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, Virology, 235, 153-165.
- Pearson, M.N. ve Rohrmann, G.F., 2002. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (insect retrovirus) families. J. Virol., 76, 5301-5304.
- Peng, K., van Lent, J.W., Boeren, S., Fang, M., Theilmann, D.A., Erlandson, M.A., Vlak, J.M. ve van Oers, M.M., 2012. Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex, J. Virol., 86, 4981-4988.

- Peng, K., Wu, M., Deng, F., Song, J., Dong, C., Wang, H. ve Hu, Z., 2010. Identification of protein–protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, Journal of General Virology, 91, 659-670.
- Perera, O., Green, T.B., Stevens, J.S.M., White, S. ve Becnel, J.J., 2007. Proteins associated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions, J. Virol., 81, 4585-4590.
- Perera, O., Valles, S.M., Green, T.B., White, S., Strond, C.A. ve Becnel, J.J., 2006. Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV), J. Invertebr. Pathol., 91, 35-42.
- Phizicky, E.M. ve Fields, S., 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis, Microbiol. Rev., 59, 94-123.
- Pijlman, G.P., Pruijssers, A.J. ve Vlak, J.M., 2003. Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects, J. Gen. Virol., 84, 2041-2049.
- Possee, R.D., 1997. Baculoviruses as expression vectors, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 569-572.
- Rao, V.S., Srinivas, K., Sujini, G.N. ve Kumar, G.N., 2014. Protein-protein interaction detection: methods and analysis, Int. J. Proteomics, 2014, 147648.
- Rapp, J.C., Wilson, J.A. ve Miller, L.K., 1998. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression, J. Virol., 72, 10197-10206.
- Ratajczak, J., Joffraud, M., Trammell, S.A., Ras, R., Canela, N., Boutant, M., Kulkarni, S.S., Rodrigues, M., Redpath, P., Migaud, M.E., Auwerx, J., Yanes, O., Brenner, C. ve Canto, C., 2016. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells, Nat. Commun., 7, 13103.
- Roberts, T.E. ve Faulkner, P., 1989. Fatty acid acylation of the 67K envelope glycoprotein of a baculovirus: *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virüs, Virology, 172, 377-381.
- Rohrmann, G., 2013. The AcMNPV genome: gene content, conservation, and function, Rohrmann G., *Baculovirus molecular biology*, National Library of Medicine (US), Bethesda.
- Rubinstein, R. ve Polson, A., 1983. Midgut and viral associated proteases of *Heliothis armigera*, Intervirology, 19, 16-25.
- Russell, R.L.Q. ve Rohrmann, G.F., 1993. A 25 kilodalton protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions, Virology, 195, 532-540.
- Sambrook, J. ve Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santos, E.R., Oliveira, L.B., Peterson, L., Sosa-Gomez, D.R., Riberio, B.M. ve Ardisson-Araujo, D.M.P., 2018. The complete genome sequence of the first hesperiid-infecting alphabaculovirus isolated from the leguminous pest *Urbanus proteus* (Lepidoptera: Hesperidae), Virus Res., 249, 76-84.
- Schuster, S.C., 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology, Nat. Methods, 5, 16-18.
- Slack, J. ve Arif, B.M., 2007. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function, Adv. Virus Res., 69, 99-165.
- Slack, J.M. ve Shapiro, M., 2004. Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus v-trex gene encodes a functional 3' to 5' exonuclease, J. Gen. Virol., 85, 2863-2871.
- Slack, J.M., Kuzio, J. ve Faulkner, P., 1995. Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virüs, J. Gen. Virol., 76, 1091-1098.
- Solovyev, V.V. ve Salamov, A.A., 1999. INFOGENE: a database of known gene structures and predicted genes and proteins in sequences of genome sequencing projects, Nucleic Acids Res., 27, 248-50.
- Sriram, S. ve Gopinathan, K.P., 1998. The potential role of a late gene expression factor, lef2, from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in very late gene transcription and DNA replication, Virology, 251, 108-122.
- Stewart T.M., Huijskens, I., Willis, L.G. ve Theilmann, D.A., 2005. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ie0-ie1 gene complex is essential for wild-type virus replication, but either IE0 or IE1 can support virus growth, J. Virol., 79, 4619-4629.
- Summers, M.D., 2006. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector system and viral pesticides, Adv. Virus Res., 68, 3-73.
- Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J.A., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S. ve Vlak, J.M., 2005. Baculoviridae, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses, *Academi Press, San Diago*, s. 177-185.
- Theilmann, D.A. ve Stewart, S., 1992. Tandemly repeated sequence at the 3' end of the IE-2 gene of the baculovirus *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus is an enhancer element, Virology, 187, 97-106.
- Theze, J., Takatsuka, J., Nakai, M., Arif, B. ve Herniou, E.A., 2015. Gene acquisition convergence between entomopoxviruses and baculoviruses, Viruses, 7, 1960-1974.
- Thiem, S.M. ve Miller, L.K., 1990. Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters, Gene, 91, 87-94.

- Thompson, J.N., 1999. What we know and do not know about coevolution: insect herbivores and plant as a test case, Olff, H., Brown, V.K. ve Drent, R.H., *Herbivores: between plants and predators*, Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom, 7-30.
- Thumbi, D.K., Eveleigh, R.J., Lucarotti, C.J., Lapointe, R., Graham, R.I., Pavlik, L., Lauzon, H.A. ve Arif, B.M., 2011. Complete sequence, analysis and organization of the *Orgyia leucostigma* nucleopolyhedrovirus genome, *Viruses*, 3, 2301-2327.
- Van Oers, M.M. ve Vlaskovits J.M., 2007. Baculovirus Genomics. *Current drug targets*, 8, 1051-1068.
- Vlaskovits, J.M. ve Keus, F.J.A., 1990. Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines, *Viral Vaccines, Advances in Biotechnological Processes*, Wiley-Liss, New York, 91-128.
- Vlaskovits, J.M. ve Smith, G.E., 1982. Orientation of the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a proposal, *J. Virol.*, 41, 1118-1121.
- Wang Y. ve Jehle J.A., 2009. Nudiviruses and other large, double-stranded circular DNA viruses of invertebrates: New insights on an old topic, *J. Invertebr. Pathol.*, 101, 187-193.
- Wang, J., Hou, D., Wang, Q., Kuang, W., Zhang, L., Li, J., Shen, S., Deng, F., Wan, H., Hu, Z. ve Wang, M., 2018. Genome analysis of a novel Group I alphabaculovirus obtained from *Oxyplax ochracea*, *PLoS One*, doi.org/10.1371/journal.pone.0192279 F.
- Wang, P. ve Granados, R.R., 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6977-6982.
- Wang, R., Deng, F., Hou, D., Zhao, Y., Guo, L., Wang, H. ve Hu, Z., 2010. Proteomics of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Budded Virions, *J. Virol.*, 84, 7233-7242.
- Wang, X., Liu, X., Makallawa, G.A., Li, J., Wang, H., Hu, Z. ve Wang, M., 2017. Per os infectivity factors: A complicated and evolutionarily conserved entry machinery of baculovirus, *Sci. China Life Sci.*, 60, 806-815.
- Wang, X.F., Zhang, B.Q., Xu, H.J., Cui, Y.J., Xu, Y.P., Zhang, M.J., Han, Y.S., Lee, Y.S., Bao, Y.Y. ve Zhang, C.X., 2011. ODV-associated proteins of the *Pieris rapae* granulovirus, *J. Proteome. Res.*, 10, 2817-2827.
- Wang, Y., Kleespies, R.G., Huger, A.M. ve Jehle, J.A., 2007. The genome of *Gryllus bimaculatus* nudivirus indicates an ancient diversification of baculovirus-related nonoccluded nudiviruses of insects, *J. Virol.*, 81, 5395-406.
- Wang, J., Zhu, Z., Zhang, L., Hou, D., Wang, M., Arif, B., Kou, Z., Wang, H., Deng, F. ve Hu, Z., 2016. Genome Sequencing and Analysis of *Catopsilia pomona*

- nucleopolyhedrovirus: A Distinct Species in Group I Alphabaculovirus, PLoS One, 11, e0155134.
- Washburn, J.O., Chan, E.Y., Volkman, L.E., Aumiller, J.J. ve Jarvis, D.L., 2003. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*, J. Virol., 77, 280-290.
- Wennmann, J.T., Gueli Alletti, G. ve Jehle, J.A., 2015. The genome sequence of *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus B (AgseNPVB) reveals a new baculovirus species within the *Agrotis* baculovirus complex, Virus Genes, 50, 260-276
- 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., 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.
- Williams, T., Bergoin, M. ve van Oers, M.M., 2017. Diversity of large DNA viruses of invertebrates, J. Invertebr. Pathol., 147, 4-22.
- Willis, L.G., Siepp, R., Stewart, T.M., Erlandson, M.A. ve Theilmann, D.A., 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene, Virology, 338, 209-226.
- Wood, H.A., 1980. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced proteins in tissue culture, Virology, 102, 21-27.
- Woolhouse, M.E.J., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B. ve Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the coevolution of pathogens and their hosts, Nat. Genet., 32, 569-577.
- Wu, C.A., Nelson, N.J., McGeoch, D.J. ve Challberg, M.D., 1988. Identification of Herpes Simplex Virus Type I genes required for origin-dependent DNA synthesis, J. Virol., 62, 435-443.
- Wu, W., Liang, H., Kan, J., Liu, C., Yuan, M., Liang, C., Yang, K. ve Pang, Y., 2008. *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus 38K Is a Novel Nucleocapsid Protein That Interacts with VP1054, VP39, VP80 and Itself, J. Virol., 82, 12356-64.
- Wu, X. ve Guarino, L.A., 2003. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus orf69 encodes an RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase, J. Virol., 77, 3430-3440.
- Xi Q., Wang, J., Deng, R. ve Wang, X., 2007. Characterization of AcMNPV with a deletion of me53 gene, Virus Genes, 34, 223-232.

- Xu, X., Zhou, X., Nan, H., Zhao, Y., Bai, Y., Ou, Y. ve Chen, H., 2016. Aggregation of AcMNPV LEF-10 and Its Impact on Viral Late Gene Expression, PLoS One, 11, e0154835.
- Yaman, M., 2002. Isolation and Characterization of Virus from *Malacosoma neustria* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and Its Use in Microbial Control, PhD, Karadeniz Technical University Graduate School of Natural and Applied Science.
- Yanagida, M., 2002. Functional proteomics; current achievements, J. Chromatogr. B, 771, 89-106.
- Yang, D.H., de Jong, J.G., Makhmoudova, A., Arif, B.M. ve Krell, P.J., 2004. Choristoneura fumiferana nucleopolyhedrovirus encodes a functional 3'-5' exonuclease, J. Gen. Virol., 85, 3569-3573.
- Yang, S. ve Miller, L.K., 1998. Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 (vlf-1) gene, Virology, 245, 99-109.
- Yoo, S. ve Guarino, L.A., 1994. The Autographa californica nuclear polyhedrosis virus ie2 gene encodes a transcriptional regulator, Virology, 202, 746-753.
- Yu, W., Du, C.Y., Quan, Y.P., Nie, Z.M., Chen, J., Lv, Z.B. ve Zhang, Y.Z., 2013. Characterization of late gene expression factor LEF-10 from Bombyx mori nucleopolyhedrovirus, Virus Res., 175, 45-51.
- Yuan, M., Huang, Z., Wei, D., Hu, Z., Yang, K. ve Pang, Y., 2011. Identification of Autographa californica nucleopolyhedrovirus ac93 as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids, J. Virol., 85, 11664-74.
- Zanotto, P.M.A., Kessing, B.D. ve Maruniak, J.E., 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations, J. Invertebr. Pathol., 62, 147-164.
- Zarembinski, T.I., Hung, L.W., Mueller-Dieckmann, H.J., Kim, K.K., Yokota, H., Kim, R. ve Kim, S.H., 1998. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: A test case of structural genomics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15189-15193.
- Zarins, I. ve Kalnina, L., 1971. Some aspects on activation of latent infection of nuclear polyhedrosis of the European tent caterpillar-*Malacosoma neustria* L, Latvian Agricultural Academy, Viruses of Plants and Insects, Dobeles, (in Russian), 42-48.
- Zemskov, E.A., Kang, W. ve Maeda, S., 2000. Evidence for nucleic acid binding ability and nucleosome association of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus BRO proteins, J. Virol., 74, 6784-6789.

- Zhang, C.X., Ma, X.C. ve Guo, Z.J., 2005. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, Virology, 333, 190-199.
- Zhang, A., 2009. Protein Interaction Networks-Computational Analysis, Cambridge University Press, New York, NY, USA.
- Zhang, J., Shen, Y. ve Wu, X., 2014. A minireview on per os infectivity factors of insect baculovirus, Sci. Sericult., 40, 730-736.
- Zheng, Q., Shen, Y., Kon, X., Zhang, J., Feng, M. ve Wu, X., 2017. Protein-protein interactions of the baculovirus per os infectivity factors (PIFs) in the PIF complex, J. Gen. Virol., 98, 853-861.
- Zheng, F., Huang, Y., Long, G., Sun, X. ve Wang, H., 2011. *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus ORF51 is a ChaB homologous gene involved in budded virus production and DNA replication, Virus Res., 155, 203-212.
- Zhu, S.Y., Yi, J.P., Shen, W.D., Wang, L.Q., He, H.G., Wang, Y., Li, B. ve Wang, W.B., 2009. Genomic sequence, organization and characteristics of a new nucleopolyhedrovirus isolated from *Clanis bilineata* larva, BMC Genomics, 10, 91-99.
- Zhu, S., Wang, W., Wang, Y., Yuan, M. ve Yang, K., 2013. The baculovirus core gene ac83 is required for nucleocapsid assembly and per os infectivity of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, J. Virol., 87, 10573-10586.
- Zhu, Z., Yin, F., Liu, X., Hou, D., Wang, J., Zhang, L., Arif, B., Wang, H., Deng, F. Ve Hu, Z., 2014. Genome sequence and analysis of *Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus: a group II *Alphabaculovirus*, PLoS One, 9, e86450.
- URL-1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10442>. 09 Aralık 2018

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Antalya’da doğdu. İlköğretimi Barbaros İlköğretim Okulu’nda bitirdi. Lise eğitimini Atatürk Lisesi’nde tamamladı. 2006-2007 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliğinde lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında mezun oldu. 2011-2013 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2012- 2013 yılında Almanya’da Jülius-Kühn Enstitüsünde yüksek lisans tez çalışmalarını gerçekleştirdi. 2014 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora öğrenimine başladı. Doktora eğitimi süresi boyunca BİDEB Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı (2211-A) ile TÜBİTAK tarafından destek aldı. İngilizce ve Almanca bilmektedir.

Makaleler:

- Gencer, D.**, Nalcacioglu, R., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Complete genome sequence analysis of Malacosoma neustria nucleopolyhedrovirus from Turkey, Virus Genes, 54(5): 706-718.
- Gencer, D.**, Bayramoglu, Z., Nalcacioglu, R., Kleespies, R.G., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Characterisation of three Alphabaculovirus isolates from the gypsy moth, *Lymantria dispar dispar* (Lepidoptera: Erebidae), in Turkey, Biocontrol Science and Technology, 28: 170-121.
- Bayramoglu, Z., **Gencer, D.**, Muratoglu, H., Efe, D., Nalcacioglu, R., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2018. Characterization of a nucleopolyhedrovirus variant of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Turkey, International Journal of Pest Management, 64: 119-127.
- Yücel, B., Gozuacik, C., **Gencer, D.**, Demir, I. ve Demirbag, Z., 2018. Determination of fungal pathogens of *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae): isolation, characterization, and susceptibility, Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28:39.