

# Baculovirus'lerin Biyolojisi ve Replikasyonu

İsmail DEMİR, Remziye NALÇACIOĞLU, Nurten GÜREL, Zihni DEMİRBAĞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Trabzon, Türkiye

**ÖZET:** Baculovirus'ler, çeşitli uygulama alanlarında son yıllarda önemli derecede ilgi çeken araştırma ve çalışma materyalleri haline gelmişlerdir. Yüksek konak seçiciliği sayesinde tarımda insektisid olarak kullanılmaktadırlar. Rekombinant Baculovirus'ler, güçlü *polh* ve *p10* geni promotorlerinin kontrolü altında ilgi duyulan genlere ait çeşitli proteinlerin ekspresyonunda biyoteknolojide kullanılmaktadırlar. Tıp sahasında gen terapisi konusunda gen terapi vektörleri olarak dikkat çekmektedirler. Çünkü Baculovirus'ler memeli hücrelerine girmekte ancak, ne replike olmakta ne de patojenik bir etki göstermektedirler. Aynı zamanda Baculovirus'ler gen yapı ve organizasyonları bakımından moleküler biyoloji çalışmalarında model olan ajanlardır. Baculovirus'ler pratikte yaygın bir şekilde kullanılmalarına rağmen, genom replikasyonları hala tam olarak anlaşılammıştır. Bu konuyla ilgili deneysel verilerin çoğunluğu son birkaç yıl içinde elde edilmiştir. İnsanlık Baculovirus'lerden elde edeceği nimetlerin henüz başındadır. Yukarıda bahsedilen özellikleriyle baculovirus'ler daha uzun yıllar bilim dünyasına hizmet edecektir. Bu eserin, bütün dünyada çok popüler olan Baculovirus'lere ülkemizdeki ilgi eksikliğinin giderilmesi hususunda büyük katkı sağlayacağına inanmaktayız. Bu nedenle, bu derlemede Baculovirus'lerin biyolojileri hakkında bilgiler verildikten sonra, baculovirus replikasyonu ayrıntılı bir şekilde açıklanmaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Baculovirus, Replikasyon, Virüs vektörleri

## Biology and Replication of Baculoviruses

**SUMMARY:** Baculoviruses have become a noteworthy research and study material for various applications in recent years. They are used as insecticides in agriculture because of their high host specificity. Recombinant baculoviruses are being used in biotechnology for the expression of related genes under the control of strong *polh* and *p10* genes promoters. They have attracted attention as gene therapy vectors in medicine. Baculoviruses can enter the mammalian cells; however, they neither replicate nor show any pathogenic effect. Also baculoviruses are model organisms for molecular biology studies of gene structure and organization. Although baculoviruses are used commonly, their genome replication is not understood. Most of the research data about this subject have been obtained during recent years. Human beings have just begun to benefit from the use of baculoviruses. Baculoviruses will serve science in the future as mentioned above. We believe that this review will contribute to the appreciation of the field in our country in regard to baculoviruses which are popular all over the world. For this reason, in this review after giving information about the biology of baculoviruses, replication of baculoviruses has been explained in detail.

**Key Words:** Baculovirus, Replication, Viral vectors

## GİRİŞ

Baculovirus'ler, geniş bir virüs grubu olup, özellikle böceklerde bulunur (57). Konakları sadece omurgasızlarla sınırlı olduğundan, ekolojik zararlı mücadele programlarında, önemli tarım ve orman zararlılarının kontrolü için biyolojik mücadele materyali olarak kullanılma potansiyellerine sahip faydalı ajanlardır (29, 36).

Genomları prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan daha küçük olmasına rağmen, baculovirus'ler, gen yapı ve düzeyleri bakımından bu organizmaların ve memelilerde enfeksiyon

yapan virüslerin genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadırlar (5).

Rekombinant baculovirus'ler, farklı ökaryotik genleri araştırmak ve biyoteknolojik uygulamalarını arttırmak için böcek hücre kültürlerinde üretilirler (39, 46, 66). Baculovirus ekspresyon vektör sistemi (BEVS) kullanılarak, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik, ökaryotik ve viral genlerin bu virüsler aracılığıyla ekspres edilmeleriyle birçok hastalığa karşı tedavi amacıyla kullanılan proteinlerin üretilmesi, besin ve ilaç hammadde eksikliğinin giderilmesi ve biyolojik mücadele için gerekli çeşitli toksinlerin üretilmesi sağlanmıştır (4, 10, 13, 56, 63).

Ayrıca, baculovirus'ler gen tedavi metodu ile çeşitli hastalıkların tedavisinde gen transfer vektörü olarak kullanılmaktadırlar (18).

Makale türü/Article type: **Derleme / Review**

Geliş tarihi/Submission date: 02 Temmuz/02 July 2007

Düzeltilme tarihi/Revision date: 22 Nisan/22 April 2008

Kabul tarihi/Accepted date: 26 Nisan/26 April 2008

Yazışma /Corresponding Author: İsmail Demir

Tel: 0 462 377 35 60 / 3731 Fax: 0 462 325 31 95

E-mail: idemir@ktu.edu.tr

Bu virüsler, böcek kaynaklı oldukları için insan bağışıklık sistemine cevap oluşturmama ve insanlarda patojen olmama gibi özellikleriyle diğer virüs vektörlerine göre gen tedavisinde kullanılmaları açısından avantajlara sahiptirler (33, 62).

Çoğunluğu böceklerden olmak üzere 800'dan fazla baculovirus Arthropodlardan izole edilmiştir (1, 15, 44). Bunlardan *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (AcMNPV) ve *Anagrapha falcifera* nükleopolihedrovirüs (AfMNPV) başta olmak üzere birçok baculovirus ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır (2, 11, 26, 42). Baculovirus'lerin konak spektrumuyla ilgili çalışmalar farklı böceklerde (47) ve hücre kültürlerinde (8, 12, 41) yapılmıştır. Bu çalışmalar, baculovirus'lerin farklı hücre suşlarında farklı replikasyon özellikleri sergilediklerini ve hücrelerin bu virüslere karşı farklı duyarlılık derecelerine sahip olduklarını göstermiştir (9).

Yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı, baculovirus'ler son yıllarda yoğun şekilde çalışılan araştırma materyalleri haline gelmişler ve önemli alanlarda da kullanılmaktadırlar (Tablo 1). Bu virüslerden zirai mücadele ajanı, gen ekspresyon vektörü, gen tedavi vektörü ve model organizma olarak en iyi şekilde yararlanabilmek için bunların gen replikasyon ve ekspresyon özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle, bu derleme eserde baculovirus'lerin biyolojileri hakkında bilgi verildikten sonra gen replikasyonları üzerinde ayrıntılı bir şekilde durulacaktır.

**Tablo 1.** Baculovirus'lerin kullanıldığı çalışma sahaları

Kullanılan saha	Kullanım şekli
<b>Biyolojik mücadele</b>	Tarım ve orman zararlısı çeşitli böceklerin mücadelesinde tek başlarına veya diğer ajanlarla birlikte biyolojik mücadele programlarında mikrobiyal mücadele ajanı olarak
<b>Moleküler biyoloji</b>	Gen yapı ve organizasyonları bakımından ökaryotik hücrelere benzedikleri için moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmalarında model olarak
<b>Gen ekspresyonu</b>	Tıbbi, endüstriyel ve zirai mücadele açısından önemli olan ilgi duyulan çeşitli gen ürünlerinin üretilmesi için biyoteknolojik çalışmalarda ekspresyon vektörü olarak
<b>Gen tedavisi</b>	Kusurlu genlerin normal genlerle yer değiştirilmesi, kusurlu gen işlevlerinin geri dönüşümünün sağlanması ve belirli genlerin regülasyonlarının uyarılması şeklinde hastalıkların tedavisinde gen tedavi vektörü olarak

## BACULOVIRUS'LERİN BİYOLOJİSİ

### Baculovirus'lerin Sistematigi

Baculovirus'ler, böceklerde sık sık öldürücü hastalıklara ve hastalık salgınlarına sebep olan büyük bir böcek virüsü grubudur. Bu virüse ait virionlar gömülü yapılar olarak adlandırılan proteinden meydana gelmiş yapılar içerisine gömülür. Baculovirus'ler, çoğunluğu Lepidoptera, Hymenoptera ve

Diptera ordolarına ait arthropodların larval dönemlerini enfekte eder (16).

İnküzyon yapılarına göre baculovirus'ler *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) ve *Granulavirus* (GV) olmak üzere iki genusa ayrılır (57) (Tablo 2). Polihedrin proteininden meydana gelen bir yapı içerisine gömülen NPV'ler de morfolojik olarak her virionda bulunan nükleokapsid sayısına göre iki gruba ayrılır. Multi-nükleopolihedrovirüs (MNPV)'ler her virionda birden fazla nükleokapsid ihtiva ederken, single-nükleopolihedrovirüs (SNPV)'ler her virionda bir nükleokapside sahiptir. Hem MNPV hem de SNPV'ler her gömülü yapı içerisinde çok sayıda virion ihtiva edebilirler. Granülün proteinden meydana gelen bir yapı içerisine gömülen GV üyeleri, morfolojik olarak NPV üyelerinden rahatlıkla ayrılabilir. NPV'ler yoğun bir kristal yapı halinde ve polihedron şeklinde iken, GV'ler bir granül görünümünde ve oval-silindirik yapıdadır. GV'ler her gömülü yapıda sadece tek bir virion ihtiva eder.

Son yıllarda, birkaç korunmuş gen (polihedrin/granülün, geç zorunlu faktör-2 ve DNA polimeraz) ve tüm genomun filogenetik analizlerine göre NPV'ler grup I ve grup II olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Buna göre, tomurcuklanan virüs (BV)'lerden zarf füzyon proteini olarak GP64'e sahip olanlar Grup I NPV'ler ve fonksiyonel olarak bu proteine homolog olan F proteini ihtiva edenler de Grup II NPV'ler olarak gruplandırıldı (26, 68).

**Tablo 2.** Baculovirus'lerin sistematigi

Familiya	Genus	
<i>Baculoviridae</i>	<i>Nucleopolyhedrovirus</i> (NPV)	Multi-nükleopolihedrovirüs (MNPV) örnek, <i>Autographa californica</i> MNPV (AcMNPV)
		Single-nükleopolihedrovirüs (SNPV) örnek, <i>Trichoplusia ni</i> SNPV (TnSNPV)
	<i>Granulavirus</i> (GV)	örnek, <i>Trichoplusia ni</i> GV (CdGV)

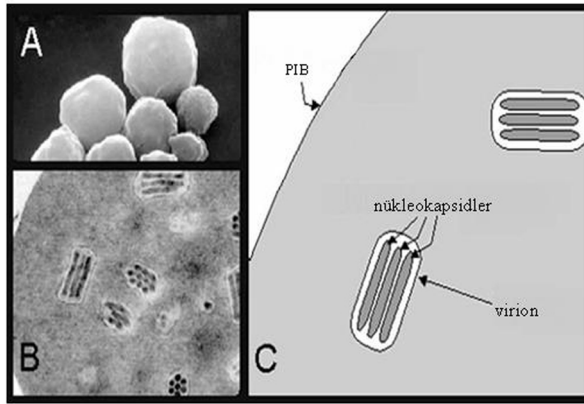
### Baculovirus'lerin DNA'sı

Baculovirus'ler, 25x250 nm büyüklükte ve 80-180 kbp kapalı, yuvarlak ve çift zincir, süpersarmal DNA ihtiva ederler (25, 57). Bazı nükleopolihedrovirüslerin DNA'ları tanımlanmış (21, 35) ve restriksiyon endonükleazlar kullanılarak, genetik haritaları elde edilmiştir (28, 52). Şimdiye kadar 35 baculovirus'e ait komple genom dizin analizleri tamamlanmıştır (37). Bu dizin analizleri karşılaştırıldığında birçok baculovirus izolatanının bir diğerinden küçük oranlarda farklı olduğu ve bu farkların da delesyon ve inversiyon mutantlarıyla meydana geldiği görülür.

Temelde baculovirus genomları benzer gen içeriklerine sahiptir. Genomda kodlanan genlere ilave olarak genoma yerleşmiş durumda homolog bölge (*hr*)'ler olarak bilinen birkaç küçük tekrar sıralar vardır. Genomda birden fazla olabilen bu bölgelerin erken gen transkripsiyonunu arttırdığı ve replikasyon orjini olarak davrandığı gösterilmiştir (3, 42).

### Baculovirus'lerin Yapısı

Baculovirus'lerin DNA'sı, P39 proteininden yapılmış bir kapsid ile çevrilidir (53). DNA ile kapsid nükleokapsid olarak adlandırılır. Nükleokapsid ise en dışta, zarf olarak adlandırılan membran yapısındaki bir örtü ile çevrilidir ve bu yapının tümüne de virion adı verilir (Şekil 1).

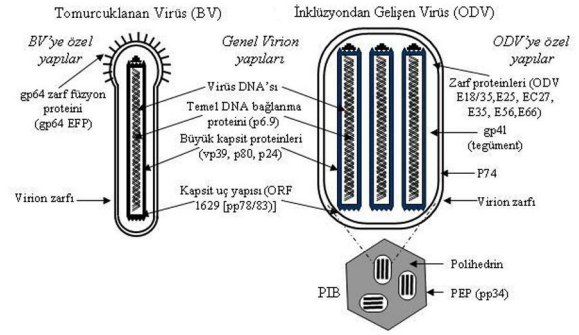


**Şekil 1.** Baculovirus partiküllerinin ultrayapısal görüntüsü, A: Polihedral inklüzyon yapı (PIB, doğada böcekten böceğe enfeksiyonun yayılmasını sağlayan yapı), B: Çok nükleokapsidli bir NPV'ye ait PIB'nin enine kesiti, C: PIB'nin enine kesit diyagramı (59).

Baculovirus nükleokapsidleri, 30-60 nm çapında ve 250-300 nm uzunluğunda olan çomak şeklinde yapılardır. GV'ler de yaklaşık 0.3 x 0.5 µm boyutlarında, oval-silindirik yapılar içerisine gömülür. NPV'lerin gömüldüğü formlar polihedral şekillidir ve yaklaşık 0.15-15 µm büyüklüğündedir.

Gömülü virüs formları, viral enfeksiyonun son saflarında üretilen ve proteinsi yapılar içerisine gömülen formlardır. NPV'lerde virionlar polihedrin proteinden (28 kDa) oluşan kristal benzeri yapılar içerisine gömülerek polihedral inklüzyon yapıları (PIB) oluşturular. Bu yapılar baculovirus'lerin başarılı bir şekilde zirai mücadele çalışmalarında kullanılmalarının nedenidir. PIB'ler, doğada virüs enfeksiyonlarını böcekten böceğe transfer eden, enfeksiyon özelliğine sahip ve virüslerin uzun süre çevrede zarar görmeksizin kalmasını sağlayan yapılardır.

Baculovirus'lerin ikinci tip morfolojileri ise böcek dokularında ve hücre kültürlerinde hücreleri enfekte eden formlarıdır. Bunlar hücrelerden zarf kazanarak tomurcuklanma ile salınan (BV) viral yapılardır. Virüsün tomurcuklanmasından önce hücre membranını viral GP64 proteinin membrana ilave edilmesiyle değiştirilir. Bu proteine, konak içerisinde virüsün etkili yayılmasında ihtiyaç olduğu gösterilmiştir (Şekil 2).



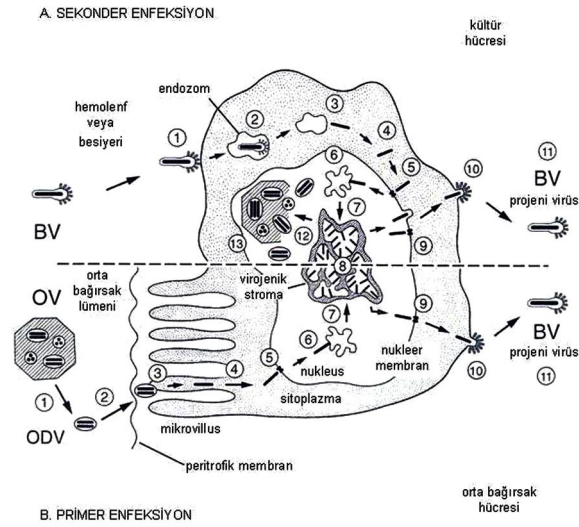
**Şekil 2.** Baculovirus virionlarının karşılaştırılması. Bu şekildeki ODV, çok nükleokapsidli NPV'ye aittir. Ortada gösterilen proteinler hem BV hem de ODV için ortak olan proteinlerdir. Soldaki proteinler BV için, sağdaki proteinler ise ODV için özel proteinlerdir (6).

### BACULOVIRUS REPLİKASYONUNA GENEL BAKIŞ

Hücre kültürlerinde yapılan ultrayapısal ve histokimyasal çalışmalar, viral DNA replikasyonunun, nükleus içinde "virojenik stroma" olarak adlandırılan bölgede meydana geldiğini göstermiştir (31, 53, 64). Bu replikasyon işlemi iki safhada meydana gelir (Şekil 3).

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

İkinci safha (B): OV ile bir orta bağırsak hücresinin enfeksiyonu (Primer enfeksiyon): Böcek tarafından beslenme yoluyla alınan OV'nin kritikal yapısı orta bağırsak lümeninde alkali ortam nedeniyle çözülür (1. adım). ODV'ler lümene yayılır ve bağırsak epitel hücrelerine girmek üzere peritrofik membranı geçerler (2. adım). ODV zarfı ile mikrovillus membranı füzyon olayı ile kaynaşır (3. adım). Nükleokapsidler sitoplazmaya dağılır ve buradan nükleusa hareket ederler (4. adım). Diğer replikasyon adımları (5-11. adımlar) kültür hücrelerindeki gibi gerçekleşir.



Şekil 3. Baculovirus enfeksiyon döngüsünün şematik gösterimi (17).

### Virüsün Konağa Girişi

Virüsün konağa giriş işlemi, inklüzyondan elde edilen virüslere göre BV'de daha fazla çalışılmış ve mekanik olarak her iki virüste de giriş işleminin farklı olduğu görülmüştür (64). BV'ler, böceklerde hücreden hücreye enfeksiyonun yayılmasında rol oynar. Bu fenotipik form, hücre kültürü uygulamalarında kullanılan ajandır. Zarflı virüslerin hücreye girişi ya direk hücre yüzeyine membran füzyonu ya da zarf füzyon proteini (GP64, EFP) tarafından gerçekleştirilir. Virüs, reseptör tarafından gerçekleştirilen endositozis yoluyla hücreye girer. BV'nin plazma membranına bağlanarak virionun bir endositik vesikül içine alınmasından sonra membran füzyonu meydana gelir ve nükleokapsidler sitoplazmaya dağılır.

### Nükleokapsidin Taşınması ve Kabuğun Atılması

Baculovirus nükleokapsidleri sitoplazmaya girdikten sonra nükleusa taşınır. Bu işlem hakkında az şey bilinmesine rağmen, konak hücre aktin ipliklerinin enfeksiyonun erken safhalarında rol oynadığı düşünülmektedir. Aktin, çeşitli hücresel aktiviteleri (hücre hareketi, fagositozis, sekresyon, vb.) ve hücresel yapıları kapsayan, hücrelerde bol miktarda bulunan bir hücresel proteindir. Baculovirus DNA'sının kabul atılması olayı nükleus dışında veya nükleusta oluşur. Elektron mikroskopu çalışmaları, iki baculovirus grubunda (NPV ve GV) viral DNA kabuğunun atılma yerlerinde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. NPV nükleokapsidlerinde kabuğun atılması konak hücre nükleusunda gerçekleşmesine rağmen (22), GV nükleokapsidlerinin sitoplazmada kaldığı ve viral DNA'nın nükleer porlardan nükleusa girdiği tespit edilmiştir (55).

### Virüs En Erken ve Geç Erken Genlerinin İfadesi

Nükleusta kabuğun atılmasından sonra ilk olarak replike olmamış viral DNA, bir konak RNA polimerazı tarafından transkrip edilir. Baculovirus erken genlerinin transkripsiyonları

ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (48, 60) ve genlerin enfeksiyonundan sonra farklı zamanlarda ekspres oldukları belirlenmiştir. DNA replikasyonundan önce ekspres olan genler de en erken ve geç erken olmak üzere ikiye ayrılır (Tablo 3).

Tablo 3. Baculovirus genlerinin ekspresyonları ve özellikleri

Faz	Özellik
<b>En Erken</b>	Virial transregülatörlerin ve etkili transkripsiyon için ihtiyaç duyulmayan genlerin ekspresyonu. Bu fazda ekspres olan genlerin çoğu enfeksiyonun oluşturulması için gereklidir.
<b>Geç Erken</b>	Virüsün replikasyonuna ve konağın manipülasyonuna iştirak eden genlerin ekspresyonu. Bu genler, etkili bir transkripsiyon için genellikle viral regülatörlerin (IE-0, IE-1, PE38 gibi) varlığına ihtiyaç duyar.
<b>Geç</b>	Erken fazdan geç faza geçiş konak hücre DNA replikasyonu ve protein sentezinin durdurulmasıyla karakterize edilir. Nükleokapsidler üretilir. BV'ler meydana gelir ve enfeksiyon konağın her tarafına yayılır.
<b>En Geç</b>	Virüs enfeksiyonunun ileri safhasıdır. Virionlar polihedrin proteini içerisine gömülür. Viral proteazlar konağı sıvılaştırır ve kitinden meydana gelen ekzoskeletonu parçalarlar. Gömülü projeni virüsler, horizontal yayılma için çevredeki materyallerin üzerine saçılır.

Enfeksiyonun en erken fazında, replikasyon basamaklarının düzenlenmesini sağlayan (IE-0, IE-1, IE-2, PE-38) ve konak cevabı engelleyen genlerin ürünleri (EG35) ekspres olur. Etkili bir ekspresyon için en erken genler viral transregülatörlerine ihtiyaç duymaz. Geç erken genler ise etkili bir transkripsiyon için bir transregülatöre ihtiyaç duyulmasıyla karakterize edilir.

DNA sentezi için ihtiyaç duyulan genler (DNA polimeraz, *dnapol* ve bir DNA helikaz-benzeri protein kodlayan, *p143*) ve geç gen ekspresyon faktörleri (geç ekspresyon faktörleri, *lef*) de bu erken fazda ekspres olur. İntra ve ekstrasellüler değişikliklere sebep olan birkaç gen de bu fazda ekspres olur. EGT enzimi ekstrasellüler çevre değişikliğine ve P35 de apoptosisin engellenmesine sebep olur.

Erken promotörlerin çoğu etkili bir transkripsiyon için regülatör protein IE-1'e (veya IE-0) de ihtiyaç duymasına rağmen, baculovirus erken genleri bir konak RNA polimerazı tarafından transkrip olur. Erken genler çeşitli transkripsiyon modellerine sahiptir. Bazı transkriptler enfeksiyondan 1 saat sonra gibi çok erken bir sürede görülür ve enfeksiyondan 6 saat sonra hızlı bir şekilde azalır. Oysa diğerleri zamanla birikir. Transkriptlerin ortaya çıkmalarındaki bu farklılık çeşitli erken proteinlerin rollerini ve bir geç promotör motifinin varlığını yansıtabilir. Transkriptlerin zamanlamaları virüsler arasında değişir ve virüsün enfekte ettiği konağın türüne de bağlıdır.

### Virial DNA Replikasyonu

Baculovirus DNA replikasyonu virojenik stroma içerisinde yapısal oluşumlar ile birlikte gerçekleşir. Replikasyon için zorunlu virüs genleri DNA polimeraz (*dnapol*), helikaz (*hel*),

IE-1 (*ie-1*) ve geç virüs genlerinin ekspresyonundan sorumlu geç ekspresyon faktörleri (LEF) 1 (*lef-1*), 2 (*lef-2*) ve 3 (*lef-3*)'tür (32, 50). Bazı konak hücre bileşenlerinin kullanımları hariç, DNA replikasyon mekanizmasının büyük bir kısmının virüs tarafından kodlandığı düşünülmektedir. Baculovirus replikasyonunun geç fazı enfeksiyondan yaklaşık 6-8 saat sonra başlar ve enfeksiyondan yaklaşık 24 saat sonraya kadar devam eder (14). Yapılan çalışmalar, viral DNA replikasyonu için *p126*'ya (DNA polimeraz) ilave olarak *p143* (helikaz) geninin de gerekli olduğunu ortaya koymuştur (32). Diğer analizler, zorunlu genlere ilave olarak, P35 (*p35*), IE-2 (*ie-2*), PE38 (*pe38*) ve LEF-7 (*lef-7*)'nin de viral replikasyon için uyarıcı faktörler olduklarını göstermiştir (38) (Tablo 4).

Bu fazın özellikleri viral DNA'nın replikasyonu, konak hücre transkripsiyonunun durdurulması ve virüsün tomurcuk (budded virüs, BV) formunun üretilmesini kapsamaktadır. Bu fazda üretilen proteinler DNA bağlanma proteini P6.9 (DNA paketlenmesine katılır) ve GP64 (BV'lerin yüzeyinde bulunan zarf füzyon proteini) proteinlerini içerir. Erken fazdan geç gen ekspresyonuna geçişi sağlayan anahtar olay, genlerin transkripsiyonları için kullanılan RNA polimerazdaki bir değişikliktir. Bu fazda yararlanılan polimeraz virüs tarafından kodlanan bir RNA polimerazdır.

Geç fazın anahtar özelliklerinden bir tanesi genomun replikasyonudur. Bu replikasyonun *hr* sıralarında başladığı ve genom üzerinde devam ettiği düşünülmektedir. DNA replikasyonunun bu modeli yukarıda da belirtildiği gibi bir yuvarlanan halka metodu olarak kabul edilir. Baculovirus genomunda çok sayıda *hr* olması, DNA pol'ün birçok yere bağlanmasına ve böylece genomun çok etkili bir şekilde replike olmasına izin verir.

Geç faz boyunca nükleokapsidler de üretilir. Bu, helikal nükleokapsidlerin oluşumu ve viral DNA'nın paketlenmesini kapsar. Viral DNA'nın paketlenmesi P6.9'un defosforilasyonuna ihtiyaç duyar. Nükleokapsidlerin akıbeti farklıdır. Onlar, GP64 bağımlı zarf füzyonunu takiben reseptör bağımlı endositozis ile konak hücrede enfeksiyonun yayılmasını sağlayan virionları oluşturmak üzere hücre membranından tomurcuklanırlar veya böcekler arasında horizontal yayılmayı sağlamak üzere bir matriks proteinine gömülerek inklüzyon yapılarına dönüşürler.

### Geç Gen Ekspresyonu

Enfeksiyonun geç fazı, alfa amanitin dirençli RNA polimeraz aktivitesinin ve geç genlerin transkripsiyonlarının görülmesiyle belirlenir (23). Baculovirus ile enfekte olmuş hücrelerden alınan nukleer ekstraktlar, geç promotörlerden tam transkripsiyon olduğunu desteklemiştir (19). Geç transkripsiyon için ihtiyaç duyulan viral gen ürünlerinin birkaçı geçici ekspresyon çalışmasıyla aydınlatılmıştır. En az 18 baculovirus geni geç eks-

presyon faktör veya "*lef*" genleri olarak tanımlanmıştır (58). Bu 18 *lef* geninin, 10 tanesi direkt olarak geç transkripsiyonu etkilerken, 9 tanesinin DNA replikasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir (38). *lef* genlerine ilaveten, yüksek seviyede ekspres olan en geç genler (*polh* ve *p10* genleri) için özel olarak ihtiyaç duyulan bir viral gen tanımlanmış ve "en geç faktör-1" veya *vlf-1* olarak adlandırılmıştır (40).

AcMNPV polihedrin geni çalışmaları, transkripsiyonun temel sorumlusu olarak transkripsiyon başlangıç ucunda 8 bp'lik (TAAG-ihiva etmekte olan) bir dizin olduğunu göstermiştir (49). Transkripsiyonlarının aşırı derecede olmasından dolayı, *polh* ve *p10* genleri "aşırı derecede ekspreslenen" en geç genler olarak adlandırılmıştır. Polihedrin gen promotörlerinin karşılaştırılması sonucunda TAAG kor dizininin hemen aşağısında AT'ce zengin korunmuş bir dizin olduğu görülmüştür. Mutasyonel analizler, polihedrin TAAG'nin hemen yukarısı ve aşağısındaki dizinlerin transkripsiyonlarının fevkelade yüksek seviyede olması için önemli olduğunu göstermiştir (45).

**Tablo 4.** Baculovirus replikasyonuna katılan önemli bazı proteinler ve fonksiyonları

Protein	Fonksiyonu
<b>Polihedrin / Granulin</b>	İnklüzyon yapıların kristal matriksini oluşturan yüksek oranda ekspres olan proteinlerdir. Virionların çevresel etkilerden korunmasına sağlar.
<b>GP64 / F-proteini</b>	Sadece BV'lerde bulunan zarf füzyon proteindir. Bunlara, BV'lerin konak hücrelere girişinde ihtiyaç duyulur.
<b>EGT</b>	Konak böceğin deri değiştirme hormonlarını inaktif eden bir enzimdir.
<b>P35, IAP-1, 2, 3, 4</b>	Apoptosis inhibitörleridir. Hücrelerin programlanmış ölümlerini ortadan kaldırır veya geciktirir.
<b>DNApol</b>	Viral DNA polimeraz. Viral genomun replikasyonunda gereklidir.
<b>P143</b>	Helikaz. Viral genomun replikasyonunda gereklidir.
<b>IE-0, IE-1, IE-2, PE38</b>	Replikasyon döngüsünde üretilen erken transaktivatörler. Replikasyon döngüsünün özellikle erken fazındaki diğer genlerin aktivitelerini düzenlerler.
<b>LEF'ler (en az 18)</b>	Geç ekspresyon faktörleri. Geç genlerin ekspresyonları için gereklidirler. Bazıları konak hücre aktivitelerini de bozar.
<b>P6.9</b>	DNA'nın paketlenmesi için bu proteinin defosforilasyonuna ihtiyaç vardır. Fosforilasyon, konak hücreye viral girişte DNA'nın çözülmesine yol açar.
<b>Ubikuitin</b>	Ökaryotik ubikuitin benzerliğine sahiptir. Viral enfeksiyon esnasında seçilen proteinlerin parçalanmasını durduran aktiviteye sahiptir.
<b>Kathepsin ve Kitinaz</b>	Enfeksiyonun başlaması için peritrofik membranın zarar görmesinde rol oynarlar. Konağın sıvılaşması için gereklidir ve böylece, projeni virüslerin dağılmasında etkilidirler.

## En Geç Gen Ekspresyonu ve Viral Birleşme

İnklüzyon fazı olarak da adlandırılan enfeksiyonun en geç fazı, birçok geç faz gen transkripsiyonunun azalması veya kesilmesiyle ve inklüzyon yapı proteini olan polihedrin (27) ve gömülme işlemine iştirak eden p10 proteini gibi en geç gen ürünlerinin bol miktarda ekspresyonuyla karakterize edilir (61, 69). Geç gen ürünlerinin sentezini takiben, nükleus içerisinde nükleokapsid birleşmesi başlar. Boş kapsidler elektronca yoğun olan “virojenik stroma” ile birleşir (67). İmmünofloresan boyama ile yapılan çalışmalarda, F-aktinin nükleokapsid oluşumunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir (7). Viral DNA'nın paketlenildiği nükleokapsidlerin ilk önce birleştiği ve sonra DNA ile doldukları gösterilmiştir. En geç fazda, gömülme yapı proteinleri birleşir ve sonra kristal yapılar nükleus içerisinde bulunan zarflı virionları sarar. Bu gömülme işlemi, inklüzyon yapıyı saran bir protein-karbohidrat “zarf yapısı” (polihedral zarf proteini: PEP veya pp34 ihtiva eden) ilavesiyle tamamlanır (20, 51). Nükleokapsidlerin plazma membranına (tomurcuklanıp BV'yi oluşturmak için) göç etmeleri veya sarılma ve gömülme için nükleus içerisinde kalma mekanizmaları hakkında fazla bir şey bilinmemektedir.

## Sitoliz ve Gömülü Yapıların Salınması

BV sentezi, enfeksiyonun en geç safhasında, ODV fenotipinin sentezini kolaylaştırmak için hem böcek hem de hücre kültüründe azaltılır. Baculovirus enfeksiyonunun en geç safhasında, gömülü yapılar üretilip, olgunlaştıktan sonra, bu yapıların dağılmasını kolaylaştırmak üzere bir nükleer parçalanma gerçekleşir (65). *Spodoptera frugiperda* ve *Trichoplusia ni* hücrelerinde yapılan bir çalışmada parçalanma işleminin yaklaşık olarak, enfeksiyondan 60 saat sonra başladığı ortaya konulmuştur.

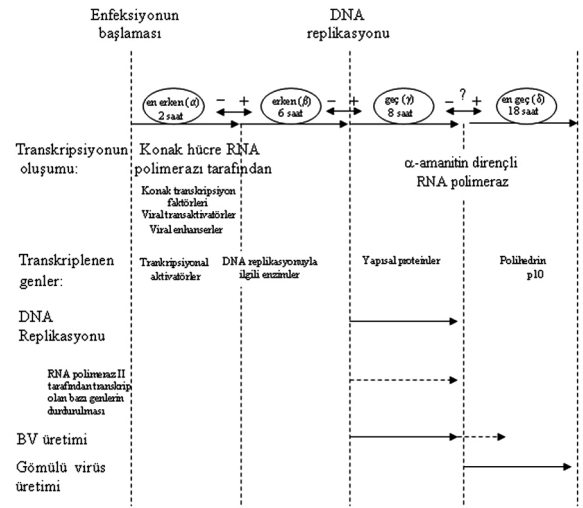
Enfeksiyon döngüsünün en geç safhasında, polihedrin sentezi hızlanır ve protein kristalizasyonunun başladığı yer olan nükleusa transfer olur. Bununla aynı anda p10 proteini de bol miktarda üretilir ve hem sitoplazmada hem de nükleusta farklı iplikli yapılar olarak yoğunlaşır (65). Polihedrinin yoğunlaşması esnasında ODV matriks içerisine gömülmüş olarak meydana gelir. Sonunda polihedrozis hastalığından dolayı böceğin ölmesi, gömülü yapıların (OB) etrafa saçılmasıyla ve etraftaki yüzeylerin bu yapılarla bulaşmasıyla sonuçlanır. OB'lerin saçılmaları, muhtemelen virüs tarafından kodlanan ve larval dokuların sıvılaşması sonucu konağın ölümüne sebep olan enzimlerin etkisiyle hızlanır (54). Kitinaz, larvaların ekzoskeletondaki kitini parçalarken, kathepsin, böcek içerisinde membranları parçalar. Ölümünden ve konak böcek doku ve kütikülasının parçalanmasından sonra OB, diğer larvalar tarafından yenilmeden önce ODV'yi korur. Gömülü yapılar, mevsimsel beslenme döngülerine sahip böcek popülasyonlarında virüs devamlılığında önemli bir rol oynar (30).

Enfekte olmuş hücrelerden inklüzyon yapılarının olgunlaşması ve salınımı p10 proteinine ihtiyaç duyar. p10 geninin delesyonu, ölüme neden olmazken, “zarfın” inklüzyon yapıla-

rına kusurlu ilavesi, zayıflatılmış nükleer dağılma ve kusurlu hücre parçalanması gibi bazı önemli etkilere neden olabilir. Böylece, fonksiyonel bir p10'dan yoksun baculovirus'lerde, polihedra normal hücre parçalanmasıyla enfekte hücrelerden salınmaz. Bu virüslerden üretilmiş polihedralar kolay kırılır ve fiziksel streslerle parçalanmaya duyarlıdır.

## BACULOVIRUS'LERDE GEN EKSPRESYONU

Baculovirus'ler ile enfekte olmuş hücrelerde virüse ait proteinler poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle yeterince tanımlanmıştır. Bu proteinlerin enfeksiyondan sonra 2-60 saatler arasında sentezlendikleri tespit edilmiştir. Enfekte edilen hücrelerden ardi adına alınan örneklerin SDS-PAGE'de incelenmeleri neticesinde, baculovirus gen ekspresyonlarının basamaklı bir şekilde meydana geldiği, bu genlere ait proteinlerin farklı zamanlarda oluşmalarıyla gözlenmiştir. İlk zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde, üç basamaklı sınıfın olduğu tespit edilirken sonraki çalışmalar, yeterince ayırt edilebilen 4 gen ekspresyon sınıfının olduğunu göstermiştir (43) (Şekil 4).



Şekil 4. Baculovirus replikasyonu ve gen ekspresyonu safhaları. (+): arttırıcı, (-): engelleyici.

En erken (α) olarak bilinen ilk sınıfa ait genlerin ekspresyonları, enfeksiyondan yaklaşık iki saat sonra başlar. Bu genlerin ekspresyonları için konak faktör (enfekte edilen hücrelere ait bazı protein)'lere ihtiyaç vardır. Erken (β) olarak bilinen ikinci sınıfa ait polipeptidlerin enfeksiyondan altı saat sonra görülmeye başladığı tespit edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonları için de bir veya daha fazla en erken sınıf proteinlerine ihtiyaç vardır (24). Bu iki grup genlerin ekspresyonlarının virüs DNA replikasyonundan önce olduğu ve bunların, enfekte eden ilk virüse ait DNA'dan sentezlendikleri tespit edilmiştir. Üçüncü sınıf geç (γ) safha olarak bilinir. Bu sınıf genlerin ekspresyonları enfeksiyondan yaklaşık sekiz saat sonra başlar. Bu safhada büyük ölçüde yeni oluşan virüs DNA'sının sentezlendiği

ve tomurcuklanan virüslerin, enfekte edilmiş hücrelerde üremeye başladıkları gözlenmiştir. On sekiz saatlik virüs enfeksiyonunu müteakip, *en geç* ( $\delta$ ) safha başlar. Bu safha, PIB yapısını (% 90) oluşturan polihedrin proteininin sentezlenmesi, nükleokapsidlerin *de novo* yoluyla zarf kazanmaları ve hücre içi virüslerin polihedral inklüzyon yapı oluşturulmaları ile belirlenir. Son iki sınıfa ait genlerin yeni oluşan DNA'dan sentezlendikleri tespit edilmiştir. En erken polipeptidler hariç, her takip eden sınıfın önceki sınıf proteinlerin ekspresyonuna ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir (31). Açıklamalardan da anlaşıldığı gibi, baculovirus gen regülasyonu karmaşık bir yapıya sahiptir. Yapılan çalışmalar neticesinde çeşitli baculovirus'lere ait gen regülasyonlarının transkripsiyonel seviyede kontrol edildikleri tespit edilmiştir (11, 34).

#### KAYNAKLAR

1. **Adams JR, McClintock JT**, 1991. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. Adams JR. Bonami JR. eds. *Atlas of Invertebrate Viruses*. Boca Raton: CRC press. p. 87-204.
2. **Ahrens CH, Russell RLQ, Funk CJ, Evans JT, Harwood SH, Rohrmann GF**, 1997. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*, 229: 381-399.
3. **Alves CAF, Ikeda M, Kobayashi M**, 2002. Identification and characterization of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus homologous repeated regions. *Virus Genes*, 25: 281-290.
4. **Beljelarskaya SN**, 2002. A baculovirus expression system for insect cells. *Mol Biol*, 36: 281-292.
5. **Bilimoria SL**, 1991. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. Edouard K. ed. *Viruses of Invertebrates*. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 1-72.
6. **Blissard GW**, 1996. Baculovirus-insect cell interactions. Vlak, JM. De Gooijer CD. Tramper J. Miltenburger HG. eds. *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects*. AA Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 73-93.
7. **Charlton CA, Volkman LE**, 1991. Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol*, 65: 1219-1227.
8. **Demir İ**, 2004. *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodoptera frugiperda* ve *Lymantria dispar* hücre kültürlerinde replikasyonunun karşılaştırılması. Doktora tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
9. **Demir İ, Demirbağ Z**, 2006. A protective replication of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* cell line. *J Microbiol. Biotechnol*, 16 (10): 1485-1490.
10. **Demir İ, Nalçacıoğlu R, Demirbağ Z, Kılıç AO, Beldüz AO**, 2000. Expression of *cryIVA* and *cryIVD* genes of *Bacillus thuringiensis* in baculovirus expression system. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC WPRS Bull*, 23: 267-274.
11. **Demirbağ Z**, 1993. Comparative replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in abortive and productive infections of insect cell lines. PhD Thesis. Texas Tech University, Texas, USA.
12. **Demirbağ Z, Beldüz AO, Ertürk Ö, Demir İ**, 1997. *Autographa californica* nüklear polihedrosis virüsün böcek hücre kültüründe karşılaştırmalı replikasyonu. *Türk J Biol*, 21: 63-70.
13. **Demirbağ Z, Beldüz AO, Demir İ**, 1998. Baculovirus'ün ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması. *Türk J Biol*, 22: 249-262.
14. **Erlanson MA, Carstens EB**, 1983. Mapping early transcription products of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 126: 398-402.
15. **Federici BA**, 1997. Baculovirus pathogenesis. Miller LK. ed. *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press. p. 33-59.
16. **Federice BA**, 1999. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. *Methods in Biotech*, 5: 301-320.
17. **Friesen PD, Miller LK**, 2001. Insect viruses. Knipe DM. Howley PM. eds. *Fields Virology*, Volume 1, Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 599-628.
18. **Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE**, 2002. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. *Mol Ther*, 6: 5-11.
19. **Glocker B, Hoopes RR, Hodges L, Rohrmann GF**, 1993. *In vitro* transcription from baculoviruses late gene promoters: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol*, 67: 3771-3776.
20. **Gombart AF, Pearson MN, Rohrmann GF, Beaudreau GS**, 1989. A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: Genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology*, 169: 182-193.
21. **Gomi S, Majima K, Maeda S**, 1999. Sequence analysis of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 80: 1323-1337.
22. **Granados RR**, 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology*, 90: 170-174.
23. **Gruła MA, Buller PL, Weaver RF**, 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.
24. **Guarino LA, Summers MD**, 1986. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhancer delayed-early gene expression. *J Virol*, 60: 215-223.
25. **Hayakawa T, Rohrmann GF, Hashimoto Y**, 2000. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculovirus. *Virology*, 278: 1-12.
26. **Herniou EA, Luque T, Chen X, Vlak JM, Winstanley D, Cory JS, O'Reilly DR**, 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *J Virol*, 75: 8117-8126.
27. **Hooft van Iddekinge B, Smith GE, Summers MD**, 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 131: 561-565.

28. **Hyink O, Graves S, Fairbairn FM, Ward VK**, 1998. Mapping and polyhedrin gene analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 79: 2853-2862.
29. **Inceoglu AB, Kamita SG, Hinton AC, Huang Q, Severson TF, Kang K, Hammock BD**, 2001. Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Manag Sci*, 57: 981-987.
30. **Jaques RP**, 1985. Stability of insect viruses in the environment. Maramorosch K. Sherman KE. eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York: Academic Pres, Inc. p. 285-360.
31. **Kelly DC**, 1982. Baculovirus replication. *J Gen Virol*, 63: 1-13.
32. **Kool M, Voeten JTM, Goldbach RW, Vlaskovskij JM**, 1994. Functional mapping of regions of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome required for DNA replication. *Virology*, 198: 680-689.
33. **Kost TA, Condreay JP**, 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*, 20: 173-180.
34. **Krappa R, Knebel-Morsdorf D**, 1991. Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. *J Virol*, 65: 805-812.
35. **Kuzio J, Pearson MN, Harwood SH, Funk CJ, Evans JT, Slavicek JM, Rohrmann GF**, 1999. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*, 253: 17-34.
36. **Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P**, 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol Control*, 21: 230-248.
37. **Long G**, 2007. Structure-function relationship of the baculovirus envelope fusion protein F. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.
38. **Lu A, Miller LK**, 1995. Differential requirements for baculovirus late expression genes in two cell lines. *J Virol*, 69: 6265-6272.
39. **Luckow VA**, 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. Prokop A. Bajpai RK. Ho CS. eds. *Recombinant DNA Technology and Applications*. New York: McGraw-Hill, Inc. p. 97-152.
40. **McLachlin JR, Miller LK**, 1994. Identification and characterization of *vlf-1*, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *J Virol*, 68: 7746-7756.
41. **McIntosh AH, Christion PD, Grasela JJ**, 1999. The establishment of *Heliothis* cell lines and their susceptibility to two baculoviruses. *In Vitro Cell Dev Biol*, 35: 94-97.
42. **Mikhailov VS**, 2003. Replication of the baculoviruses genome. *Mol Biol*, 37: 250-259.
43. **Miller LK**, 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann Rev Microbiol*, 42: 177-199.
44. **Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD**, 1995. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Wien: Springer-Verlag, p. 104-113.
45. **Ooi BG, Rankin C, Miller LK**, 1989. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mol Biol*, 210: 721-736.
46. **O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA**, 1992. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. W.H. Freeman and Company, New York.
47. **Orlovskaya EV**, 1998. The theoretical basis for using baculoviruses to control forest pests. Proceeding: Population Dynamics, Impacts and Integrated Management of Forest Defoliating Insects. *USDA Forest Service General Technical Report NE-247*. p. 206-212.
48. **Pullen SS, Friesen PD**, 1995. Early transcription of the *ie-1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *J Virol*, 69: 156-165.
49. **Rankin C, Ooi BG, Miller LK**, 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus gene expression. *Gene*, 70: 39-49.
50. **Rapp JC, Wilson JA, Miller LK**, 1998. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J Virol*, 72: 10197-10206.
51. **Rohrmann GF**, 1992. Baculovirus structural proteins. *J Gen Virol*, 73: 749-761.
52. **Sadler TJ, Glare TR, Ward VK, Kalmakoff J**, 2000. Physical and genetic map of the *Wiseana* nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 81: 1127-1133.
53. **Slack J, Arif BM**, 2007. The baculovirus occlusion-derived virus: Virion structure and function. *Adv Virus Res*, 69: 99-165.
54. **Slack JM, Kuzio J, Faulkner P**, 1995. Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus AcNPV. *J Gen Virol*, 76: 1091-1098.
55. **Summers DM**, 1971. Electron microscopic observations of granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *J Ultrastr Research*, 35: 606-625.
56. **Summers MD**, 2006. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector system and pesticides. *Adv Virus Res*, 68: 3-73.
57. **Theilmann DA, Blissard GW, Bonning B, Jehle JA, O'Reilly DR, Rohrmann GF, Thiem S, Vlaskovskij JM**, 2005. Baculoviridae. Fauquet CM. Mayo MA. Maniloff J. Desselberger U. Ball LA. eds. *Eighth Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press. p. 177-185.
58. **Todd JW, Passarelli AL, Miller LK**, 1995. Eighteen baculovirus genes, including *lef-11*, *p35*, *39K* and *p47*, support late gene expression. *J Virol*, 69: 986-974.
59. **URL-1:**  
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/baculoviruses.html>
60. **URL-2:**  
<http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html>



61. **Van Oers MM, Flipsen JTM, Reusken CBE, Vlak JM**, 1994. Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology*, 200: 513-523.
62. **Van Oers MM**, 2006. Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv. Virus Res*, 68: 193-253.
63. **Volkman LE**, 1995. Baculovirus bounty. *Science*, 269: 1834.
64. **Volkman LE, Keddie BA**, 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. Seminars in Virology, UC Berkeley. p. 249-256.
65. **Williams GV, Faulkner P**, 1996. Replication patterns and cytopathology of cells infected with baculoviruses. Vlak, JM. De Gooijer CD. Trampler J. Miltenburger HG. eds. *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects*. AA Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 95-110.
66. **Yin J, Li G, Ren X, Herrler G**, 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression system for foreign genes. *J Biotech*, 127: 335-347.
67. **Young JC, Mackinnon EA, Faulkner P**, 1993. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells *in vitro* infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Struct Biol*, 110: 141-153.
68. **Zanotto PM, Kessing BD, Maruniak JE**, 1993. Phylogenetic interrelationships among baculovirus: evolutionary rates and host associations. *J Invertbr Pathol*, 62: 147-164.
69. **Zuidema D, Van Oers MM, Van Strien EA, Caballero PC, Klok EJ, Goldbach RW, Vlak JM**, 1993. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *p10* Gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis. *J Gen Virol*, 74: 1017-1024.