

1-1-1998

## Use of Baculovirus as Expression Vector in Biotechnology

Zihni DEMİRBAĞ

A. Osman BELDÜZ

İsmail DEMİR

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology>



Part of the [Biology Commons](#)

---

### Recommended Citation

DEMİRBAĞ, Zihni; BELDÜZ, A. Osman; and DEMİR, İsmail (1998) "Use of Baculovirus as Expression Vector in Biotechnology," *Turkish Journal of Biology*. Vol. 22: No. 3, Article 1. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol22/iss3/1>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Biology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact [academic.publications@tubitak.gov.tr](mailto:academic.publications@tubitak.gov.tr).

## Baculovirus'ün Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması

Zihni DEMİRBAĞ, A. Osman BELDÜZ, İsmail DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Trabzon-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.09.1996

**Özet:** Tıbbi, endüstriyel ve zirai açıdan önemli olan çeşitli viral, bakteriyel, bitkisel ve hayvansal proteinlerin, değişik özelliklerdeki ekspresyon vektörleri aracılığı ile sentezlenmeleri biyoteknolojide büyük öneme sahiptir. Baculovirusler, moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir model olmaları, zirai mücadelede zararlı böceklerle karşı kullanılmaları ve son zamanlarda DNA'larından önemli proteinlerin üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak yararlanılmalarından dolayı biyoteknolojide yeni bir dönem başlatmıştır. İlaç, toksin ve besin maddesi gibi çeşitli ürünleri kodlayan ilgili yabancı genler, özellikle hücre kültüründe baculoviruslerin replikasyonu için zorunlu olmayan viral genler yerine klonlanarak, oldukça fazla miktarda üretilmektedirler. Diğer vektörlere göre baculovirus ekspresyon vektör sisteminin sahip olduğu üstünlükler ve avantajlar, bunları biyoteknolojinin önemli bir çalışma sahası haline getirmiştir. Pekçok bilim adamı tarafından halen devam ettirilmekte olan, baculoviruslerin daha etkili bir ekspresyon vektörü haline getirilme ve virüs replikasyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılması çalışmaları, bunların gelecekte biyoteknolojinin daha önemli bir materyali olmalarına yardımcı olacaktır.

**Anahtar Sözcükler :** Baculovirus, ekspresyon vektörü, biyoteknoloji

### Use of Baculovirus as Expression Vector in Biotechnology

**Abstract:** Various viral, bacterial, plant and animal proteins which are important for medicinal, industrial and agricultural aspects, have been synthesized via expression vector systems have great importance in biotechnology. Baculoviruses, used as a good model system in molecular biology studies, a biological control agent in agriculture and an expression vector for synthesis of important proteins, opened up a significant period for recombinant DNA technology and protein production. Desired foreign genes, code for various products such as drug, toxin and nutrient substances, can be replaced with viral genes which are not essential for replication of baculovirus in cell culture. Priority and advantages of baculoviruses, compare to other expression vectors, made them an important area of biotechnology. However, the continuing studies to develop more effective expression vector and to understand the molecular mechanism of virus replication will make baculoviruses more significant material of biotechnology in the future.

**Key Words:** Baculovirus, expression vector, biotechnology

### Giriş

Bilim adamları, dünyada hızla artan hastalıklara karşı kullanılacak ilaçların bulunması ve geliştirilmesinde, besin maddesi olarak ihtiyaç duyulan bazı proteinlerin üretilmesinde ve çe-

şitli genlerin moleküler düzeyde tanımlanmalarında, günümüzde oldukça geçerli olan ve etkili sonuçların alındığı biyoteknolojik çalışmalara başvurumaktadırlar. Bu alanda yapılan çalışmalarda, özellikle baculavirus ekspresyon vektör sistemi (BEVS)'nin kullanılması ile yüzünde baş gösteren ve insanlığı olumsuz yönde etkileyen birçok hastalığa karşı tedavi amacıyla kullanılan çeşitli proteinlerin üretilmesiyle, ilaç hammaddesi eksikliklerinin giderilmesinde (1) ve çeşitli organizmalara ait genlerin tanımlanmasında önemli aşamalar kaydedilmiştir (2).

Baculovirüsler, genomları prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan daha küçük olmalarına rağmen, gen yapı ve düzeyleri bakımından bu organizmaların genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadırlar (3, 4). Ayrıca, zirai mücadelede zararlı böceklerle karşı bir biyolojik kontrol ajanı olarak da kullanılmaktadırlar. Diğer taraftan bu virüsler, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli olan çeşitli prokaryotik (5, 6, 7), ökaryotik (8, 9), viral (10, 11) ve fungal (12) genlerin BEVS'nde ifadeleri mümkün olduğu için, biyoteknolojide büyük bir öneme sahiptirler (2, 13, 14). BEVS'i, günümüzde dünyanın çeşitli yerlerinde, birçok temel araştırma laboratuvarında kullanılmaktadır (15).

Bu derleme makalede, günümüzde kullanılmakta olan çeşitli ekspresyon vektörlerinin genel özellikleri, baculovirusün biyolojisi ve ekspresyon vektörü haline dönüştürülmesi konuları üzerinde durularak, baculavirus ekspresyon vektör sisteminin üstünlükleri hakkında bilgiler verilecektir.

### **Ekspresyon Vektörlerinin Genel Özellikleri**

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

- Vektör DNA'sında, özgün bir baz dizisinden meydana gelen, DNA replikasyonunun başlamasında rol alan tüm enzimlerin tanıyıp bağlanabildiği ve vektörün konak içerisinde çoğalmasını sağlayan, yaklaşık 500 bp uzunluğunda bir "promotör" bulunmalıdır.
- Vektörler, vektörün veya rekombinant DNA'nın tanınmasını sağlayan bazı işaret (marker gen)'lere sahip olmalıdırlar. Bunlar, çeşitli antibiyotiklere dirençlilik sağlayan bir gen olabileceği gibi, bazı amino asit ve şekerleri metabolize edebilen oksotrofik bir özellik de olabilir.
- Vektörlerde, yabancı DNA'ların klonlanmasında kolaylık sağlayan, çok sayıda ve özel restriksiyon endonükleaz kesme noktaları olmalıdır.

- Vektör DNA'sı, klonlanmış DNA'nın gen ifadesi için uygun kontrol elementlerini, promotörleri ve ribozom bağlanma bölgelerini içermelidir.

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

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

DNA moleküllerinin hücrelere verilmesi çeşitli yöntemler ile olur (1). Bunların bazıları, DNA'nın transfeksiyonu ve direkt olarak mikroenjeksiyonudur. Transfeksiyon çok genel üç transfer yöntemiyle yapılır. Bu yöntemler, alıcı hücrelerin DNA'yı kolaylıkla alabilmesi için transfeksiyon karışımına DEAE-dextran veya kalsiyum fosfat ilave edildiği ve karışımın geçici bir süre elektriğe maruz bırakıldığı yöntemlerdir.

#### Kullanılmakta Olan Bazı Ekspresyon Vektörleri

Günümüzde, gen klonlamak amacıyla mikroorganizmalar arasından çok sayıda ve çeşitte ekspresyon vektörleri geliştirilerek, biyoteknolojide kullanılmaktadır. Bu vektörler amaca uygun ve bilinçli olarak seçilmelidirler. Özellikle restriksiyon haritalarının, baz sıralarının, gen işlevlerinin, hücre içi replikasyon basamaklarının, özgün işaret genlerinin ve diğer özelliklerin çok iyi bilinmesi ve tanınması klonlamanın başarılı olması için oldukça önemlidir. Gen ifadesinde bakteriyal, plazmid, faj, viral ve Maya Yapay Kromozomu (YAC) gibi çeşitli vektörler kullanılmaktadır (16).

Yabancı genlerin klonlamasında virüs ve plazmidler kadar yoğun kullanım alanı bulunmamasına rağmen, bakteriyal vektörler son yıllarda bazı genleri bakteri genomlarına klonlamada başarılı bir şekilde kullanılmıştır (16). Bakterilerde bulunan ve bakteriyal genomu dahil olmayan, çift zincirli yuvarlak DNA molekülleri olan çeşitli plazmidler ekspresyon vektörü olarak geliştirilip kullanılmaktadırlar (17). Plazmidler, özellikle moleküler ağırlıklarının küçük olmalarından ve hücrelerde bağımsız olarak çoğalmalarından dolayı yabancı genlerin ifadesinde iyi sonuçlar verirler. Bunlar, moleküler tekniklerin uygulanmasıyla amaca uygun olarak geliştirilip kullanılmaktadırlar (18, 19).

Çeşitli faj DNA'ları da gen transferinde bir aracı molekül olarak kullanılmaktadır (20, 21). Ekspresyon vektörü olarak kullanılan bakteriyofajlar, genellikle bakterilerde üreyen litik bakteri virüsleridirler. Fajlar arasında vektör amacıyla en yaygın olarak kullanılanlar *Escherichia coli*'ye ait lambda, M13, ayrıca, fajmid ve kozmidlerdir (16).

DNA'ların daha etkili bir biçimde hücrelere verilmesi çalışmaları, yabancı DNA'ların yüksek verimlilikle transfer edildiği viral vektörler üzerinde yoğunlaşmıştır (18). Bunun için kullanılan ilk vektörün yapılmasında maymun tümör virüsü olan SV40'tan yararlanılmıştır (22). SV40'ın sadece maymun hücrelerini enfekte edebilmesi, küçük DNA molekülleri taşıması ve genomlarında yeniden düzenlenme ve delesyon olaylarının sıkça görülmesi, bunun kullanımlarını sınırlandırmaktadır (18). Daha sonra, olumsuz özelliklerin nispeten gözardı edilebildiği bir vektör olan vaccinia vektörü geliştirilmiştir (23). Vaccinia virüs genleri sitoplazmada ifade edilmektedir. Yabancı genler, plazmidlere klonlama işlemi gibi normal klonlama yöntemleriyle klonlama yerine hücre içerisinde uzun ve hassas bir işlem olan rekombinasyon ile klonlanırlar. Adenovirüsler de ekspresyon vektörü olarak geliştirilip kullanılmaktadırlar (24). Bu virüslerden, yardımcı virüslere bağımlı olmayanları vektör olarak gen aktarımında ve genlerin ifadesinde denenmiştir. Adenovirüs vektörleri, E3 geni çıkarılmış vektörler olarak çalışılmıştır (25, 26). E3 gen ürünü, yabani virüs için gerekli değildir. Dolayısıyla E3 geni çıkarılıp, yerine ekzogen DNA sıralarının yerleştirilmesiyle büyük miktarda yabancı protein üretilebilmektedir (27, 28). Adenovirüs vektörlerinin asıl avantajı, geniş bir hücre kültürü konağında çok yüksek verimlilikle gen transferi yapabilme özelliğidir. Diğer taraftan, retrovirüsler de gen transferi için iyi verim alınan ekspresyon vektörü olarak geliştirilip biyoteknolojide kullanılmaktadırlar (29). Bu virüsler hücreye girdiklerinde, sahip oldukları "reverse transkriptaz" enzimiyle RNA'larını DNA'ya dönüştürmekte ve konak hücrenin genomuna entegre olmaktadır. Esas itibarıyla retrovirüs vektörleri, ilgili gen veya genlerin paketlenme sıraları ve transkripsiyon birimi olan 5' ve 3' uzun uç tekrarları (LTRs) içerirler (30, 31, 32). Bunlardan başka retrovirüsler, zarf proteini (*env*), RNA'ya bağımlı DNA polimeraz (*pol*) ve grup antijenleri (*gag*) gibi proteinleri kodlayan genleri de içerirler. Yabancı genler, *gag* ve *env* gibi gen bölgelerine yerleştirilir ve yardımcı virüs içeren hücreler enfekte edilir. Retrovirüs vektörlerinin asıl avantajı, hücre genomuna entegre olmaları ve bu yüzden uzun süreli protein üretimini gerçekleştirmeleridir.

YAC vektörleri, maya hücrelerine gen transferinde kullanılır ve bunlar aracılığıyla büyük DNA parçaları (100 kbp'den fazla) transfer edilebilir. Bu vektörler yardımıyla bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın tüm genomu mayaya transfer edilerek ifade edilmiştir (16).

Baculovirus ekspresyon vektör sistemi, yukarıda bahsedilen vektörlere göre önemli üstünlüklere sahiptir ve tıbbi, zirai ve endüstriyel açıdan önemli çeşitli proteinlerin üretilmesinde günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

### Baculoviruslerin Biyolojisi

Baculovirusler, 25 x 250 nm büyüklüğünde olup, 90-200 kbp, yuvarlak-kapalı, çift zincir, süpersarmal DNA ihtiva ederler (33). Virüs DNA'sı, hücre zarı benzeri ve karmaşık yapıya sahip bir zarf tarafından çevrili nükleokapsid içine paketlenmiştir (34).

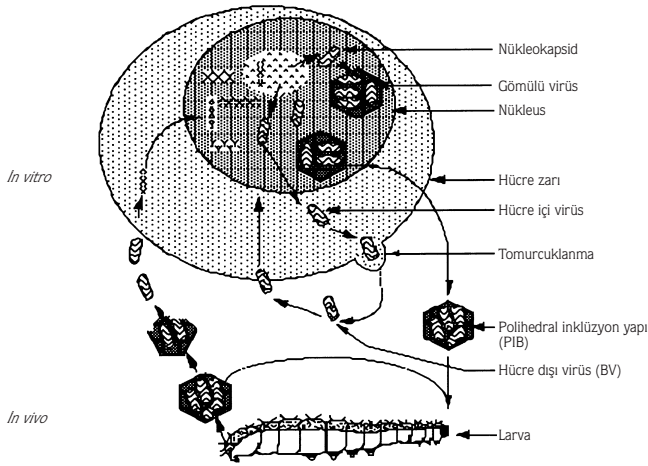
Hücre içi virüsler, *polihedra* veya *granula* olarak adlandırılan proteinsi yapılar içerisine gömülürler (3). Baculovirus familyası, inklüzyon yapıların şekillerine göre *Nüklear polihedrosis virüs* ve *Granulosis virüs* olmak üzere iki alt cinse ayrılır.

*Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs (AcNPV), nüklear polihedrozis virüs cinsine ait olup, en çok çalışılan örnek bir baculovirus tipidir (3, 13). Bu nedenle, bu derlemede baculovirus biyolojisi hakkındaki genel bilgiler AcNPV ile sınırlandırılmıştır (Şekil 1). Nüklear polihedrozis virüsler, 1-18 nükleokapsidin bir zarf içine gömülmesiyle oluşur. Daha sonra, bu zarfa sahip virüsler (*virionlar*), *polihedrin* (28 kDa) olarak adlandırılan tek bir proteinden oluşmuş polihedral inklüzyon yapı (PIB) adındaki kristal benzeri cisimler içerisine gömülürler.

AcNPV'nin replikasyon çemberi iki safha halinde meydana gelir. Birinci safhada, nükleus içerisinde nükleokapsidler oluşur. Silindirik şeklindeki bu nükleokapsidler, *kapsid* denilen tüp benzeri yapı içerisinde DNA'yı içerirler (24). Oluşan nükleokapsidler nükleus kanallarından geçerek sitoplazmaya ulaşır ve sonra, *tomurcuklanma* yöntemiyle hücre zarından zarf kazanarak hücreden ayrılırlar. Bu zarflı virüsler (hücre dışı virüsler, BV) *in vitro* şartlarda, hücreler arasında enfeksiyon yapma özelliğine sahip, çomak şeklinde virüs formlarıdır.

İkinci safhada ise nükleus içerisinde üretilen nükleokapsidlerin bir kısmı *de novo* yöntemiyle zarf kazandıktan sonra, küp şeklindeki protein yapılar içerisine gömülerek PIB'leri oluştururlar. AcNPV'ye ait PIB'lerin büyüklükleri 0.5-15 µm arasındadır ve bunlar genel olarak protein matriks ve zarf yapılarından oluşur. PIB'ler, doğada virüs enfeksiyonunun larvadan larvaya taşınmasında rol oynayan virüs parçacıklarıdır (35). Bunlar *in vitro* enfeksiyon için gerekli değildir.

AcNPV'nin yapısal özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. DNA'sının moleküler ağırlığı tespit edilmiş (36) ve fiziki haritası çıkartılmıştır. (37). Ayrıca, toplam genomuna ait nükleik asit sırası tayin edilmiş (38, 39), birçok gene karşılık gelen DNA zincirleri belirlenerek (40, 41, 42) pekçok genin işlevi aydınlatılmıştır (38).



Şekil 1. Baculovirus'ün replikasyon şeması.

Bu güne kadar SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle yapılan çalışmalarda, AcNPV'ye ait proteinler yeterince aydınlatılmıştır. Translasyon ürünlerinin enfeksiyondan sonra 2-60 saatleri arasında sentezlendikleri tespit edilmiştir. AcNPV gen ifadesinin basamaklı bir şekilde meydana geldiği ve bu genlerin ürünlerinin farklı zamanlarda ortaya çıktıkları da belirlenmiştir. Son yıllarda metabolik inhibitörler, sıcaklığa duyarlı mutantlar ve transient gen ifadesi yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarla, baculoviruslerin *en erken* ( $\alpha$ ), *erken* ( $\beta$ ), *geç* ( $\gamma$ ) ve *en geç* ( $\sigma$ ) olmak üzere, oldukça iyi ayırt edilebilen 4 gen ifadesi sınıfına sahip olduğu tespit edilmiştir (43). *En erken* grubu genler, enfeksiyondan yaklaşık 2 saat sonra ifade edilir ve konak faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Ürünleri enfeksiyondan 5 saat sonra görülmeye başlayan *erken* grubu genler, *en erken* grubu genlerin ürünlerine ihtiyaç duyarlar (44). Bu iki gruba ait genlerin ifadelerinin DNA replikasyonundan önce gerçekleştiği bilinmektedir (45). Enfeksiyondan yaklaşık 8 saat sonra sentezlenmeye başlayan *geç* grubu genlerin sentezlenmesi, *projeni* (yavru) virüs DNA'sının sentezlendiğini ve hücre dışı virüslerin meydana gelmeye başladığını gösterir (46). On sekiz saatlik virüs enfeksiyonunu takiben ifade edilmeye başlayan *en geç* grubu genlerin sentezlenmesiyle, inklüzyon yapılarını oluşturan polihedrin ve enfekte olmuş hücrelerin nükleuslarında iplikli yapıların oluşumunu sağlayan ve virüs replikasyonunda zorunlu olmadığı bilinen p10 proteinleri sentezlenir (47).

### Baculovirus Ekspresyon Vektör Sistemi

Baculovirus'ün ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmasının en önemli üstünlüğü, polihedral inklüzyon yapı matrisi proteini (polihedrin, 28-30 kDa) ve p10 proteinlerini kodlayan genlerden (*polh* ve *p10*) gelmektedir. Bunlar, enfekte olmuş hücrelerde virüs replikasyon siklusunun *en geç* safhasında fazla miktarda üretilirler (48). Polihedrin proteinine, virüs partiküllerini doğada konaklar arasında koruyan inklüzyon yapıların oluşumunda veya virüs partiküllerinin polihedrin içerisine paketlenmesinde ihtiyaç duyulur. Polihedraya, böceklerin ağız yoluyla enfeksiyonunda ihtiyaç duyulmasına rağmen, *in vivo* virüs replikasyonunda ihtiyaç duyulmaz (49, 50). Bu nedenle söz konusu genlerin (*polh* ve *p10*) kodlayan bölgeleri çıkarılıp, yerlerine yabancı genlerin yerleştirilerek baculovirus ekspresyon vektörleri geliştirilmekte (49) ve bu vektörler çeşitli yabancı genlerin geniş miktarda ifade edilmesinde kullanılmaktadır (2, 51).

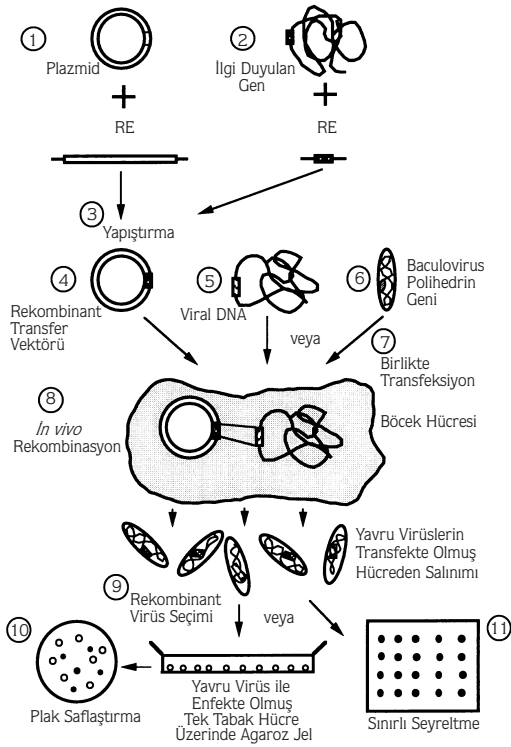
Baculoviruslerin ekspresyon vektörü olarak kullanılmasına ait ilk çalışmalar, Smith ve ark. (49) ve Pennock ve ark. (52) tarafından, *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüs kullanılarak *Spodoptera frugiperda* hücrelerinde  $\beta$ -interferon'u ve  $\beta$ -galaktozidaz'ı üretmeleriyle ilgili yapılan yayınlardır. Maede ve ark. (53) ipek böceğinde *Bombyx mori* nüklear polihedrozis virüsü kullanarak  $\beta$ -interferonunu sentezlediler. Sonraki yıllarda BEVS'i kullanılarak tıbbi, ekonomik ve endüstriyel öneme sahip viral (54, 55, 56, 57, 58, 59), fungal (60), bakteriyel (7, 61), bitkisel (62, 63) ve hayvansal (64, 65, 66) orjinli çeşitli rekombinant proteinler bol miktarda üretildiler. Günümüzde ise özellikle tıbbi alanda yapılan çalışmalarla çeşitli hastalıklara karşı yeni antijenler (67), büyüme faktörleri (68, 69, 70) ve kinazlar (71, 72) üretilip, yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Geliştirilen yeni ilaçlarla birlikte yeni tedavi yöntemleri de ortaya çıkarılmıştır. Bunların sonucunda, başta rekombinant ve

sentetik olmak üzere birçok yeni aşı bulunmuştur. Yine bu alanda yapılan çalışmalar sayesinde immünooglobulinler (73), insülin (74), interferon (75) ve interlökin gibi proteinler bol miktarda üretilmiştir. Endüstriyel öneme sahip çeşitli bitkisel proteinler de bu sistemde yaygın olarak sentezlenmektedirler (62, 63). Ayrıca, zirai mücadelede zararlı böceklere karşı etkili olan bazı toksik özelliğe sahip proteinler de BEVS'de üretilerek zirai mücadele çalışmalarında kullanılmaktadır (7, 77).

### Baculovirus Genomuna Yabancı Genlerin Yerleştirilme Prensipleri

Baculovirus genomunun büyük (AcNPV, 128 kbp) olması, yabancı DNA'ları yerleştirmek için bakteri veya maya vektörlerine benzer bir tarzda, restriksiyon enzimleri ve DNA ligaz kullanılarak, direkt olarak çalışmada güçlükler yaratır.

*polh* genini oluşturan virüs genomu bölgeleri, bakteriyal plazmide yerleştirilerek *Escherichia coli*'de çoğaltılır. Daha sonra, *polh* geni restriksiyon enzimleri ve ekzonükleazlar kullanılarak elde edilir (49, 52, 53). Promotörün hemen aşağısında sadece bir restriksiyon enzimi yeri oluşturulması, yabancı DNA'nın yerleştirilmesini kolaylaştırır. Oluşturulan bu son plazmid transfer vektörü (49) veya rekombinasyon vektörü (52) olarak adlandırılır ve çeşitli



Şekil 2.

Baculovirus ekspresyon vektör sistemini (BEVS) kullanarak rekombinant gen ifadesi.



şekillerde düzenlenir. Böylece, transfer vektörü *polh* genine ait kodlayan bölgeden mahrum fakat, rekombinasyon için gerekli olan askı bölgelerine sahip ve işaret geni taşıyan bir plazmidir.

Şekil 2'de, ilgili bir ekzogen proteini ifade etmekte olan rekombinant AcNPV'nin üretimi, seçimi ve izolasyonu şematik olarak gösterilmektedir. Öncelikle, uygun promotör/okuma zinciri/askı bölgelerini taşıyan bir transfer vektörü, kültür edilmiş böcek hücrelerine ya yabani-tip virüs enfeksiyonu sonrası ya da yabani-tip virüs DNA'sıyla birlikte transfer edilir. Bu enfeksiyonun ürünleri transfer vektörü, viral DNA veya uygulanan yabani-tip virüse bağlı olmak kaydıyla %0,1'den %50'ye kadar varan farklılıkta rekombinant virüs içerir. Daha sonra ilgili rekombinant virüs ya 96-gözlü kaplarda (Costar) sınırlı seyreltme ya da 5-6 kez tekrar eden plak saflaştırma yöntemleriyle izole edilir.

#### Baculovirus Ekspresyon Vektör Sisteminin Avantajları

Tüm rekombinant proteinler için ideal bir gen ifade sistemi henüz geliştirilememiştir. Gen ifadesinde kullanılan bakteriyal, plazmid, faj, viral ve YAC vektörlerinin herbiri, rekombinant protein yapısına ve onun kullanılış özelliğine uygunluk gösterir. Çoğu durumda mükemmel bir yöntem olan baculovirus ekspresyon vektör sistemi (BEVS), diğerlerine göre aşağıda belirtildiği gibi birçok avantaja sahiptir:

- *Protein üretimi için ökaryotik bir ortam olması*: BEVS'nin iyi bir ökaryotik ortam olması, biyolojik olarak aktif ökaryotik proteinlerin üretimi için oldukça önemlidir. Bu sistem uygun katlanma, disülfid bağ oluşumu, oligomerizasyon ve/veya biyolojik olarak aktif olan bazı proteinlere özgü olan post translasyonel modifikasyonları kontrol eder. Buna ilave olarak, bu sistemde sinyal parçalaması, proteolitik parçalama, N-glukolizasyon, O-glukolizasyon, açılasyon, amidasyon, fosforilasyon ve karboksilasyon gibi post translasyonel değişiklikler de olur.

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

- *Güçlü gen promotörlerinin olması*: *polh* ve *p10* genleri, enfekte olmuş hücrelerde proteinlerin fazla miktarda sentezlenmesini sağlayan, oldukça aktif, güçlü promotörlere sahiptirler. Diğer genler daha az aktif olmalarına rağmen bazı genlerin ifadelerinde kullanılırlar. Polihedrin proteini toplam viral proteinlerin %90'ndan fazlasını oluşturur. Bu güçlü promotörün (*polh*) kullanılmasıyla toplam hücre proteininin %25-%50 oranında ifadesi ( $10^9$  hücre/1 litre kültürden 1 g protein) mümkün olmaktadır.

- *Temporal faktörlerin olması*: Virüse ait *en geç* gen promotörlerinin ifadesi hücrelerde enfeksiyon yapabilen virüs oluşumundan sonra meydana geldiği için bir sitotoksik protein sentezlenmiş ise bu protein, virüs replikasyonunu etkilemez.

- *Olgunlaşmamış genlerin (örneğin, cDNA'lar) yüksek oranda ifade edilmesi*: Tanımlanmış baculovirus *en geç* genleri olgunlaşmamış olup yüksek oranda ifade edilirler. Bu nedenle ba-

culovirüsler, izole edilen cDNA'ları ifade etmek için uygundur. Intron içeren genlerin yüksek miktarda ifadesi için cDNA kullanmak daha fazla üstünlükler sağlar. Bununla birlikte, BEVS'nin bazı olgunlaşma işlevlerini yerine getirdiği tespit edilmiştir (78).

- *Insertin büyüklüğü*: Baculovirus genleri çeşitli büyüklüklere sahiptir (88-200 kbp). Normal replikasyon ve DNA paketlenmesini etkilemeksizin büyük miktarda (100 kbp veya daha fazla) yabancı DNA virüse yerleştirilebilir. Aynı zamanda, gen sayısı da birden fazla olabilir.

- *27°C'de gen ifadesi*: Baculovirüsler 27°C'de üretilirler. Bu sıcaklık 37°C'de kültür edilen hayvan hücrelerine ait ısı-duyarlı mutantlar için üretken bir ortamdır. Bu yüzden, BEVS bir genin ısı duyarlı alleli tarafından kodlanan aktif bir proteini büyük oranda üretmek için kullanılabilir. Bu durum vektörün 37°C'de üretildiği ortamlarda mümkün değildir (79).

- *Teknoloji basitliği*: Baculovirüsler replikasyonları için yardımcı virüslere ihtiyaç duymadıklarından kullanılışları nispeten kolaydır. Rekombinant baculovirus oluşturulması, yüksek gen ifade özelliğine sahip bir ökaryotik rekombinant hücre suşu üretmekten çok daha kolaydır.

- *Güvenilir olması*: Baculovirüslerin replikasyonu sadece omurgasızlarda gerçekleşir. Bu yüzden, sistemin kullanıcılarına karşı herhangi bir riski yoktur.

- *Aşırı üretim*: Böcek hücreleri *in vitro* sistemlerde geniş hacimde protein üretmeye uygundur.

## Sonuç

Baculovirüslerin biyoteknolojide ekspresyon vektörü olarak kullanılmaları, çeşitli biyolojik özelliklere sahip proteinlerin sentezi bakımından biyoteknologların başvurdukları bir yoldur. Bu sayede özellikle tıbbi, ekonomik ve endüstriyel açıdan önemli, çeşitli viral, fungal, bakteriyel, bitkisel ve hayvansal proteinler bu sistemde üretilip insanlığın hizmetine sunulmaktadır. Ayrıca, yine BEVS sayesinde yeni aşı ve ilaçlar keşfedilmiştir. Çeşitli bitkisel proteinler de bol miktarda üretilerek besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Yine yüksek oranda üretilen çeşitli toksinler de zirai mücadelede kullanılmakta ve daha fazla ürün alınarak ekonomik katkı sağlanmaktadır. Baculovirüslerin diğer ekspresyon vektörlerine göre sahip oldukları üstünlükler, bunları biyoteknolojinin merkezi haline getirmiştir. Sahip oldukları üstünlükler günümüzde biyoteknolojik yöntemlerle daha da geliştirilip, kullanıma sunulmaya devam etmektedir.

Baculovirüsler ile ilgili önemli bir durum ise baculovirus sayesinde sağlanan katkıların henüz başlangıç aşamasında olması ve bu yüzden, bu teknolojinin gelecekte büyük istikbal vadedmesidir.

## Kaynaklar

1. Vlak, J.M. and Keus, F.J.A.: Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines. In: Viral Vaccines (A. Mizrahi, ed). Advances in Biotechnological Processes, New York, 1990 Wiley-Liss, 14:91-128.
2. Jasny, B.R., Insect viruses invade biotechnology. Science, 238:1263-1563, 1987.
3. Blissard, G.W. and Rohrmann, G.F., Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol., 35:155-172, 1990.
4. Bilimoria, S.L.: The Biology of Nuclear Polyhedrosis Viruses: Viruses of Invertebrates, New York, 1991 Edouard K. Marcel Dekker, Inc., 1.
5. Demirbağ, Z. ve Beldüz, A.O., Baculovirus'ün biyolojik mücadeledeki önemi. Derleme. KÜKEM Dergisi. 20 (7):49-58, 1997.
6. Iacono-Connors, L.C., Schmaljohn, C.S. and Dalrymple, J.M., Expression of the Bacillus anthracis protective antigen gene by baculovirus and vaccinia virus recombinants. Infect. Immun., 58:366-372, 1990.
7. Martens, J.W.M., Honee, G., Zuidema, D., van Lent, J.W.M., Visser, B. and Vlak, J.M., Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2764-2770, 1990.
8. Atkinson, A.E., Earley, F.G.P., Beadle, D.J. and King, L.A., Expression and characterization of the chick nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit in insect cells using a baculovirus vector. Eur. J. Biochem., 192: 451-458, 1990.
9. Hasemomn, C.A. and Capra, J.D., High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:3942-3946, 1990.
10. Ray, R., Galinski, M.S. and Compans, R.W., Expression of the fusion glycoprotein of human parainfluenza type 3 virus in insect cells by a recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic property. Virus Res., 12:169-180, 1989.
11. Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H-D., The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector. Virology, 174:418-429, 1990.
12. Baum, J.A., Geever, R. and Giles, N.H., Expression of qa-1f activator protein: identification of upstream binding sites in the qa gene cluster and localization of the DNA-binding domain. Mol. Cell. Biol., 7:1256-1266, 1987.
13. D'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A.: Baculovirus Expression Vectors A: laboratory Manual, New York, 1992 W.H. Freeman and Company, pp: 12.
14. Volkman, L.E., Baculovirus bounty. Science, 269:1834-1834, 1995.
15. Luckow, V.A. and Summers, M.D., Trends in the development of baculovirus expression vectors. Bio/Technology, 6:47, 1998.
16. Arda, M.: Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Genişletilmiş 3. Baskı, Ankara, 1995 Armoni Ltd. Şti., pp: 123-144.
17. Boliver, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene, 2:95-115, 1977.
18. Covarrubias, L. and Boliver, F., Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pB328 lacking the 428 base pair inserted duplication. Gene, 17, 79-89, 1982.
19. Watson, J.D., Girman, M., Witkowski, J. and Zollar, M.: Recombinant DNA (Second Edition), New York, 1992 Scientific American Books. Distributed by W.H. Freeman and Company, pp: 99-233.
20. Rambach, A. and Tiollais, P., Bacteriophage  $\lambda$  having Eco RI endonuclease sites only in the non-essential region of the genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71:3927-3930, 1974.

21. Murray, N.E.: Phage  $\lambda$  and Molecular Cloning. In "Lambda II"; Hendrix, R.W. et. al., eds, New York, 1983 Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.
22. Mulligan, R.C., Howard, B.H. and Berg, P., Synthesis of rabbit  $\gamma$ -globin in cultured monkey kidney cells following transfection with a SV40  $\gamma$ -globin recombinant genome. *Nature*, 277:108-114, 1979.
23. Panicali, D. and Paoletti, E., Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:4927, 1982.
24. Yamada, M., Lewis, J.A. and Grodzicker, T., Overproduction of the protein product of a nonselected foreign gene by an adenovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:3567, 1985.
25. Berkner, K.L., Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques*, 6:616-29, 1988.
26. Graham, F.L. and Prevec, L.: Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. In *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, Boston, 1994 Butterworth-Heinemann, pp:363-90.
27. Tacket, C.O., Losonsky, G., Lubeck, M.D., Davis, A.R., Mizutani, S., et. al., Initial safety and immunogenicity studies of an oral recombinant adenohepatitis B vaccine. *Vaccine*, 10:673-767, 1992.
28. Mittal, S.K., McDermott B.R., Johnson, D., Hrevec, L. and Graham, F.L., Monitoring foreign gene expression by a human adenovirus-based vector using the firefly luciferase gene as a reporter. *Virus Res.*, 28:67-90, 1993.
29. Miller, A.D. and Rosman, G.J., Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 7:980, 1989.
30. Miller, A.D., Retrovirus packaging cell. *Hum. Gene Ther.*, 1:5, 1990.
31. Miller, A.D., Retrovirus vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:1-24, 1992.
32. Jolly, D., Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther.*, 1:51-64, 1994.
33. Arif, B.: The Structure of Viral Genome. *The Biology of Baculoviruses*, Berlin, 1986 Doerfler, W. and Bohm, P. Springer, 21.
34. Fraser, M.J., Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, 95:189-195, 1987.
35. Granados, R.R. and Williams, K.A.: *In Vivo Infection and Replication of Baculoviruses: The Biology of Baculoviruses*, Granados, R.R and Federici, B.A., (II), Florida, 1986 Boca Raton, CRC Press, Inc., 89.
36. Vlaskin, J.M. and Odink, K.G., Characterization of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus deoxyribonucleic acid. *J. Gen. Virol.*, 44:333-347, 1979.
37. Cochran, M., Carstens, E.B., Eaton, B.T. and Falkner, P., Molecular cloning and physical mapping of restriction endonuclease fragments of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA. *J. Virol.*, 41:940-946, 1982.
38. Koll, M. and Vlaskin, J.M., The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: review. *Arch. Virol.*, 130:1-16, 1993.
39. Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. and Possee, R.D., The complete sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 202:586-605, 1994.
40. Friesen, P.D. and Miller, L.K.: The regulation of baculovirus gene expression: *The Molecular Biology of Baculovirus*, Berlin 1986 Doerfler, W. and Bohm, P. Springer, 31.
41. Lu, A. and Carstens, E.B., Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 181:336-347, 1991.

42. Hershberger, P.A., Dickson, J.A. and Friesen, P.D., Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Cell Line-Specific Effects on Virus Replication. *J. Virol.*, 66: 5525-5533, 1992.
43. Miller, L.K., Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177-199, 1988.
44. Guarino, L.A. and Summer, M.D., Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhancer delayed-early gene expression. *J. Virol.*, 60:215-223, 1986.
45. Mille, L.K., Miller, D.W. and Adang, M.J.: An insect virus for genetic engineering: Developing baculovirus polyhedrin substitution vector, New York, 1983. In: Lurquin P.F., Kleinhofs, A. (eds). *Genetic engineering in eukaryotes*. Plenum, pp: 89-97.
46. Vlak, J.M., Klinkenberg, F.A., Zalla, K.J.M., Usmany, M., Klinge-Roode, E.C., Geervliet, J.B.F., Roosien, J. and Van Lent, J.W.M., Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- $\beta$ -galactosidasi fusion gene. *J. Gen. Virol.*, 69: 765-776, 1988.
47. Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J. and Faulkner, P.: A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutant. *Journal of General Virology*. 70:187-202, 1989.
48. Smith, G.E., Vlak, J.M. and Summers, M.D., Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10.000-molecular-jeight protein. *J. Virol.*, 45:215-225, 1983a.
49. Smith, G.E., Summers, M.D. and Fraser, M.J., Production of human  $\beta$ -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.*, 3:2156-2165, 1983b.
50. Gonnet, P. and Devauchelle, G.: Obtention par recombinaison dans le gene du polypeptide p10 d'un baculovirus experimant le gene de resistance à la neomycine dans le celleles d' insecte, Paris, 1987 C.R. Acad. Sci., t. 305, Serie III, pp: 11-114.
51. Luckow, V.A.: Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: *Recombinant DNA Technology and Applications*, New York, 1991, (A. Prokop, R.K. Bajpai and C.S. Ho, eds), McGraw-Hill, Inc., pp: 97-152.
52. Pennock, G.D., Shoemaker, C. and Miller, L.K., Strong and regulated expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4:399-406, 1984.
53. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Production of human  $\alpha$ -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Natura*, 315:592-594, 1985.
54. Morikava, Y., Overton, H.A., Moore, J.P., Wilkinson, A.J., Brady, R.L., Lewis, S.J. and Jones, I.M., Expression HIV-1 gp 120 and human soluble CD4 by recombinant baculoviruses and their interaction in vitro. *AIDS Res.Hum. Retroviruses*, 6:765-773, 1990.
55. Rota, P.A., Black., De, B.K., Harmon, M.W. and Kendal, A. P., Expression of influenza A and B virus nucleoprotein antigens in baculovirus. *J. Gen. Virol.*, 71:1545-1554, 1990.
56. Watson, S.J. and Hay, R.T., Expression of adenovirus type DNA polymerase in cells infected with a recombinant baculovirus. *Nucleic Acids Res.*, 18:1167-1173, 1990.
57. Frappier, L. and O'Donnel, M., Overproduction, purification and caharacterization of EBNA1, the origin bending protein of Epstein-Barr virus. *J. Biol. Chem.*, 266:7819-7826, 1991.
58. Kuroda, K., Veit, M. and Klenk, H.D., Retarded processing if influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology*, 180:159-165, 1991.
59. Matsuura, Y., Tatsumi, M., Enami, K. Morikawa, S., Yamazaki, S. and Kohase, M., Biololgical function of recombinant IL-6. *Cytokine*, 3:204-211, 1991.

60. Pease, E.A., Ausk, S.D. and Tien, M., Heterologous expression of active manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using the baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 179:897-903, 1991.
61. Carbonell, L.F., Klowden, M.J. and Miller, L.K., Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J. Virol.*, 56:153-160, 1985.
62. Bustos, M.M., Luckow, V.A., Griffing, L.R., Summers, M.D. and Hall, T.C., Expression, glycosylation and secretion of phaseolin in a baculovirus system. *Plant. Mol. Biol.*, 10:475-488, 1988.
63. Kunze, R. and Starlinger, P., The putative transposase of transposable element Ac from *Zea mays* L. interacts with subterminal sequences of Ac. *EMBO J.*, 8: 3177-3186, 1989.
64. Iatrou, K. and Meidinger, R.G., Tissue-specific expression of silkworm chorion genes in vivo using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis as a transducing vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:3650-3654, 1990.
65. Medin, J.A., Hunt, L., Gathy, K., Evans, R.K. and Coleman, M.S., Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:2760-2764, 1990.
66. Moore, M.D., Cannon, M.J., Sewall, A., Finlayson, M., Okimoto, M. and Nemerow, G.R., Inhibition of Epstein-Barr virus infection in vitro and in vivo by soluble CR2 CD21 containing repeats. *J. Virol.*, 65:3559-3565, 1991.
67. Levy, F. and Kvist, S., Co-expression of the human HLA-B27 class-I antigen and the E3/19K protein of adenovirus-2 in insect cells using a baculovirus vector. *Int. Immunol.*, 2:995:1002, 1990.
68. Greenfield, C., Hiles, I., Waterfield, M.D., Federwisch, M., Wollmer, A., Blundell, T.L. and McDonald, N., Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external binding of its receptor. *EMBO J.*, 8:4115-4124, 1989.
69. Buxser, S., Vroegop, S., Dekker, D., Hinzmann, J., Poorman, R., Thomsen, D.R., Stier, M., Abraham, I., Greenberg, B.D., Hatzenbuehler, N.T., Shea, M., Curry, K.A. and Tomich, C.S.C., Single-step purification and biological activity of human nerve growth factor produced from insect cells. *J. Neurochem.*, 56:1012-1018, 1991.
70. Hsu, C.Y.J., Hurwitz, D.R., Mervic, M. and Zilberstein, A., Autophosphorylation of the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor results in different effects on its tyrosine kinase activity with various peptide substrates. Phosphorylation of peptides representing tyrosine phosphorylation sites of phospholipase C- $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 266:603-608, 1991.
71. Burns, D.J., Bloomenthal, J., Lee, M-H. and Bell, R.M., Expression of the  $\alpha$ ,  $\beta$ II and  $\gamma$  protein C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *J. Biol. Chem.*, 265:12044-12051, 1990.
72. Fiebich, B., Hugh, H. and Marme, D., High-efficiency expression of rat protein kinase C- $\gamma$  baculovirus-infected insect cells. *FEBS Lett.*, 277:15-18, 1990.
73. Laroche, Y., Demaeyer, M., Stassen, J.M., Gansemans, Y., Demarsin, E., Matthyssens, G., Collen, D. and Holvoet, P., Characterization of a recombinant single-chain molecule comprising the variable domains of a monoclonal antibody specific for human fibrin fragment D-dimer. *J. Biol. Chem.*, 266:16343-16349, 1991.
74. Ellis, L., Tavares, J.M. and Levine, B.A., Insulin receptor tyrosine kinase structure and function. *Biochem. Soc. Trans.*, 19:426-432, 1991.
75. Maeda, S.: Expression of human interferon  $\alpha$  in silkworms with a baculovirus vector. In *Biotechnology In Invertebrate Pathology and Cell Culture*, ed, San Diego and London, 1987 K. Maramorosh, Academic Press., pp:221-234.

76. Ingle, E., Cutler, R.L., Fung, M.C., Sanderson, C.J. and Young, I.G., Production and purification of recombinant human interleukin-5 from yeast and baculovirus expression systems. *Eur. J. Biochem.*, 196:623-629, 1991.
77. Charles, I.G., Rodgers, B.C., Makoff, A.J., Chatfield, S.N. Slater, D.E. and Fairweather, N.F., Synthesis of tetanus toxin fragment-C in insect cells by use of a baculovirus expression system. *Infection. Immun.*, 59:1627-1632, 1991.
78. Iatrou, K., Meidinger, R.G. and Goldsmith, M.R., Recombinant baculoviruses as vectors for identifying proteins encoded by intron-containing members of complex multigene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:9129-9133, 1989.
79. Reynisdottir, I., O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Priver, C., Thermally inactivated SV40 tsA58 mutant T antigen cannot initiate viral DNA replication in vitro. *J. Viral.*, 64:6234-6245, 1990.