

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Nicotiana Benthamiana BİTKİSİNDE SUMO-G FÜZYON PROTEİNİNİN
(Small Ubiquitin-Like Modifier Domain ve Rabies Glycoprotein (G))
MÜHENDİSLİĞİ ve EKSPRESYONU

Öznur ÜLGEN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Nicotiana Benthamiana* BİTKİSİNDE SUMO-G FÜZYON PROTEİNİNİN
(Small Ubiquitin-Like Modifier Domain ve Rabies Glycoprotein (G))
MÜHENDİSLİĞİ ve EKSPRESYONU**

Öznur ÜLGEN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Nicotiana Benthamiana* BİTKİSİNDE SUMO-G FÜZYON PROTEİNİNİN
(Small Ubiquitin-Like Modifier Domain ve Rabies Glycoprotein (G))
MÜHENDİSLİĞİ ve EKSPRESYONU**

**ÖZNUR ÜLGEN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez TÜBİTAK tarafından 218S723 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2022

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Nicotiana Benthamiana* Bitkisinde Sumo-G Füzyon Proteininin (Small Ubiquitin-Like Modifier Domain ve Rabies Glycoprotein (G)) Mühendisliği ve Ekspresyonu**

**ÖZNUR ÜLGEN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez / / 202..... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ

ÖZET

***Nicotiana Benthamiana* Bitkisinde Sumo-G Füzyon Proteininin (Small Ubiquitin-Like Modifier Domain ve Rabies Glycoprotein (G)) Mühendisliği ve Ekspresyonu**

Öznur ÜLGEN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Haziran 2022; 30 sayfa

Kuduz, kuduz virüsünün neden olduğu, en yaygın onuncu ölümcül enfeksiyon hastalığı olup, merkezi sinir sisteminin akut bulaşıcı bir enfeksiyonudur. Hastalık evcil ve vahşi hayvanlar aracılığıyla yayılmakta ve her yıl dünya çapında tahmini 60.000 insanın ölümüne neden olmaktadır. Kuduz glikoproteini (G), viral patogeneze önemli bir rol oynar ve koruyucu bir antijen olarak işlev görür. Günümüzde kuduz hastalığına karşı insan ve hayvan aşıları mevcut olmasına rağmen, bunlar pahalıdır, üretimleri zahmetlidir ve nispeten zayıf bir immünojeniteye sahiptir. Protein translasyon sonrası modifikasyonlarından SUMOlasyon'un protein hücre altı lokalizasyonunu, protein-DNA bağlanmasını, protein-protein etkileşimlerini, transkripsiyonel düzenlemeyi, DNA onarımını ve genom organizasyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Bir partner proteinin N-terminaline oldukça stabil bir yapının (SUMO gibi) eklenmesi, stabiliteyi artırarak verimi artırır. İlgilenilen proteinlerle kaynaşmış SUMO, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olarak ekspresyonu önemli ölçüde geliştirir ve çözünürlüğü destekler. Bitki bazlı geçici ekspresyon sistemi, aşı antijenleri, terapötik proteinler, antikorlar ve endüstriyel enzimler dahil olmak üzere çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi için umut verici bir teknolojidir. Bu sistemler, hızlı üretim zaman çizelgesi, düşük maliyetli girdi, yüksek düzeyde ölçeklenebilir, yüksek üretim kapasitesi ve memeli patojenlerini barındırmayan diğer ifade sistemlerine göre üstün faydalar sunar. Bu çalışmada protein translasyon sonrası modifikasyonlarından Sumolasyona ait Sumo proteini ile kuduz virüsüne ait yüzey glikoproteini (GP) füzyon olarak (SumoGP) bitki geçici ekspresyon sisteminde kısa sürede başarıyla üretilmiştir. Sumo'ya özgü proteaz SENP1 enzimi de bitki geçici ekspresyon sistemiyle başarıyla ve yüksek saflıkta üretilmiştir. SENP1 ile SumoGP füzyon proteini koekspresyonları bitki geçici ekspresyon sisteminde açıkça ifade edilememiştir. Bununla ilgili SENP1 üzerinde aktivasyon çalışmaları devam etmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Kuduz G proteini, Sumolasyon, SUMO, Bitki Geçici Ekspresyon Sistemi, *Nicotiana Benthamiana*, Kuduz

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ

ABSTRACT

Engineering and Expression of Sumo-G Fusion Protein (Small Ubiquitin-Like Modifier Domain and Rabies Glycoprotein (G)) in *Nicotiana Benthamiana* Plant

Öznur ÜLGEN

Master's Degree Thesis, Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

June 2022; 30 pages

Rabies is an acute contagious infection of the central nervous system caused by the rabies virus, the tenth most common fatal infectious disease. The disease spreads through domestic and wild animals, killing an estimated 60,000 people worldwide each year. Rabies glycoprotein (G) plays an important role in viral pathogenesis and functions as a protective antigen. Although human and animal vaccines against rabies are currently available, they are expensive, laborious to manufacture, and have relatively poor immunogenicity. One of the protein post-translational modifications, SUMOylation has been reported to regulate protein subcellular localization, protein-DNA binding, protein-protein interactions, transcriptional regulation, DNA repair, and genome organization. The addition of a highly stable construct (such as SUMO) to the N-terminus of a partner protein increases efficiency by increasing stability. SUMO fused with proteins of interest significantly improves expression and promotes solubility by aiding in correct folding of proteins. The plant-based transient expression system is a promising technology for the production of various recombinant proteins, including vaccine antigens, therapeutic proteins, antibodies and industrial enzymes. These systems offer fast production timelines, low-cost input, highly scalable, high production capacity, and superior benefits over other expression systems that are free of mammalian pathogens. In this study, the Sumo protein belonging to Sumolation, one of the post-translational modifications of the protein, and the surface glycoprotein (GP) of the rabies virus were successfully produced in a short time in the plant transient expression system as fusion (SumoGP). The sumo-specific protease SENP1 has also been successfully produced in a plant transient expression system with high purity. Coexpressions of the SENP1 and SumoGP fusion protein were not clearly expressed in the plant transient expression system. Activation studies on SENP1 are ongoing.

KEYWORDS: Rabies G protein, Sumolation, SUMO, Plant Transient Expression System, *Nicotiana Benthamiana*, Rabies

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Asst. Prof. Dr. Melike ERSÖZ

ÖNSÖZ

Kuduz, üzerine yapılan onca çalışma ve geliştirilen aşılarla rağmen hala dünyadaki en yaygın onuncu enfeksiyon hastalığıdır. Çalışmamız sonucunda kuduza karşı yerli, güvenli, düşük maliyetli, uzun süreli stabilite gösteren ve yüksek afiniteli bir aşı geliştirebilmeyi umuyoruz.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Tarımsal Biyoteknoloji bölümünün tüm kıymetli hocalarına, deneysel çalışmalarım boyunca tüm zor anlarımda teknik destekleriyle her zaman yanımda olan bölümümüzün tüm lisansüstü öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim boyunca ve sonrasında her konuda bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan, bugün bulunduğum noktada emeğini ve desteğini her an hissettiğim kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgeyemeyen hayatımda ki en kıymetli insanlar olan annem Ayşe ÜLGEN, babam İmdat ÜLGEN, biricik ablam Rabia ÜLGEN, kardeşlerim Baran ÜLGEN ve Emin ÜLGEN ve canım yol arkadaşım Osman BAĞIRGAN'a sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım. Siz olunca her şey çok kolay, iyi ki hayatımdasınız. Sizi her şeyden çok seviyorum!

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
AKADEMİK BEYAN.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Kuduz Hastalığı.....	3
2.2. Kuduz Virüsünün Bulaş Yolları.....	3
2.3. Kuduz Virüsü Yapısı.....	4
2.4. Kuduz Virüsünün Yaşam Döngüsü.....	6
2.5. Kuduz Virüsünün Nöronlara Girişi ve Nöron İçi Taşıma.....	7
2.6. Tarihte Kuduz Aşısı.....	7
2.7. Sumolasyon.....	8
2.8. Bitki Bazlı Geçici Ekspresyon Sistemleri Ve Agroinfiltrasyon Metodu.....	10
3. MATERYAL VE METOT.....	13
3.1. Kullanılan Organizmalar.....	13
3.2. Kullanılan Besiyerleri, Tampon Çözeltiler ve Diğerleri.....	13
3.3. Genlerin Klonlanması.....	19
3.4. Genlerin Vektörden Kesimi ve Doğrulanması.....	19
3.5. Lp1 Plazmitine Ligasyon ve E.Coli XL1 Blue Kompetent Hücrelerine Transfer.....	19
3.6. Lp1 Plazmit İzolasyonu.....	20
3.7. <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> Suşlarına (Kompetent Hücrelerine) Transfer.....	20
3.8. <i>Nicotiana Benthamiana</i> Bitkilerine <i>A. Tumefaciens</i> Aracılığı ile SUMOGP ve SENP1 Varyantlarının İnfiltrasyonu.....	20
3.9. SUMOGP ve SENP1 Varyantlarının İn vitro Koespresyonu.....	21
3.10. Western Blot İle Ekspresyon Analizleri.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1. LP1 Plazmit İzolasyonu Ve Enzim Kesimi İle Doğrulanması.....	23

4.2. Western Blot İle Ekspresyon Analizleri.....	24
5. SONUÇLAR.....	26
6. KAYNAKLAR.....	28
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Derece santigrat
g	: Gram
L	: Litre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar

Kısaltmalar

bp	: Baz çifti
kDa	: Kilodalton
O.D.	: Optik Dansite
pH	: Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi
SDS Page	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
Sn	: Saniye
V	: Volt
Xg	: Rölatif santrifüj kuvveti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kuduz hastalığına yakalanmış köpek.....	4
Şekil 2.2. Kuduz virüsü virionu.....	5
Şekil 2.3. Kuduz virüsü yaşam döngüsünün yönleri.....	6
Şekil 2.4. Kuduz virüsünün nöronlara girişi ve nöron içi taşıma.....	7
Şekil 2.5. Memeli hücrelerinde SUMO modifikasyonlarının biyokimyasal süreci.....	10
Şekil 2.6. <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> aracılı Agroinfiltrasyon.....	12
Şekil 4.1. LP1 plazmiti içine klonlanan SUMOGP ve SENP1 genlerinin Age1 ve XhoI enzimleri ile kesiminin elektroforez ile doğrulanması.....	23
Şekil 4.2. <i>Nicotiana Benthiana</i> ’da üretilen rekombinant SumoGP varyantının ekspresyon analizi.....	24
Şekil 4.3. <i>Nicotiana Benthiana</i> ’da üretilen rekombinant SumoGP:SENP1 varyantları farklı konsantrasyondaki koekspresyonları analizi.....	25
Şekil 4.4. <i>Nicotiana Benthiana</i> ’da üretilen rekombinant SumoGP:SENP1 varyantlarının farklı konsantrasyondaki invitro koekspresyon analizi	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için 10% Poliakrilamid jel hazırlanması.....	18
Çizelge 3.2. SUMOGP - SENP1 varyantlarının infiltrasyonu için <i>A. tumefaciens</i> kombinasyonları.....	21
Çizelge 3.3. SUMOGP ve saflaştırılmış SENP1 varyantlarının invitro koekspresyon kombinasyonları.....	21



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Nicotiana Benthamiana* Bitkisinde Sumo-G Füzyon Proteininin (Small Ubiquitin-Like Modifier Domain ve Rabies Glycoprotein (G)) Mühendisliği ve Ekspresyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../2022

Öznur ÜLGEN



1. GİRİŞ

Kuduz, kuduz virüsünün neden olduğu merkezi sinir sisteminin akut bulaşıcı bir enfeksiyonudur. En yaygın onuncu ölümcül enfeksiyon hastalığıdır. Hastalık evcil ve vahşi hayvanlar aracılığıyla yayılır. Kuduz, 23.750'si Afrika'da olmak üzere her yıl dünya çapında tahmini 60.000 insanın ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, her yıl dünya çapında 11 milyon insan kuduza maruziyet sonrası profilaksi (PEP) geçirmektedir. Kuduz, Asya'da, Amerika'nın bazı bölümlerinde ve Afrika'nın büyük bölümlerinde köpeklerin ana konak olarak kaldığı zoonotik bir hastalıktır ve kuduz köpekler, insan kuduz vakalarının çoğunun nedenidir. Köpek ısırması kurbanlarının %30 ila %60'ı 15 yaşın altındaki çocuklardır. Uygun olmayan köpek aşılama programları, aşırı erişim ve kuduz köpeklere maruz kalmış bireylerin maruziyet sonrası tedavileri geliştirmekte olan ülkelerde önemli sorunlardır (Martinez vd. 2000).

Rabdoviridae ailesinin Lyssavirus cinsinden negatif sarmallı bir RNA virüsü olan kuduz virüsü (RV), 5 yapısal proteini kodlayan nispeten basit, modüler bir genomu sahiptir: bir RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (L), bir nükleoprotein (N), bir fosforile protein (P), bir matris proteini (M) ve bir dış yüzey glikoproteini (G) içerir. N, P ve L, genomik RNA ile birlikte ribonükleoprotein kompleksini (RNP) oluşturur. Kuduz glikoproteini (G), viral patogeneze önemli rol oynar ve koruyucu bir antijen olarak işlev görür. Kuduz virüsünün ana özelliği, periferik bölgelerden merkezi sinir sistemini (MSS) istila etme konusundaki benzersiz yeteneğini ifade eden nöroinvasivliktir (Faber vd. 2009).

Patojenik RV suşları, zayıflatılmış suşlardan daha düşük bir oranda çoğalır, bu da virüsler tarafından MSS'ye ulaşmak için kullanılan nöronların yapısının korunmasına yardımcı olur. Ek olarak, viral antijenlerin, özellikle koruyucu bağışıklığın uyarılmasından sorumlu ana viral antijen olan RV G'nin düşük ekspresyon seviyeleri, konakçı bağışıklık sistemi tarafından erken saptanmasını engeller.

İlk kuduz aşısı, kuduz tavşanlardan elde edilen omurilik süspansiyonunun deri altından aşılanmasından oluşuyordu. O zamandan beri, aşının geliştirilmesi için sürekli bir çaba devam etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde üç hücre kültürü kuduz aşısı lisanslıdır: insan diploid hücre aşısı, saflaştırılmış civciv embriyo hücre aşısı ve adsorbe edilmiş kuduz aşısı. Bu aşılar koruyucu içermez ve sulandırıldıktan hemen sonra uygulanmalıdır. 2°C ile 8°C arasında ışıktan korunarak saklanmalı ve dondurulmamalıdır (Kyle vd. 2013).

Kuduz virüsü aşılarının geliştirilmesinde ve kuduzun kontrolünde kaydedilen büyük ilerlemeye rağmen dünya çapında kuduz virüsünün neden olduğu yıllık ölüm sayısı oldukça fazladır. Bu nedenle, tedavi için yeni yaklaşımlara ve daha ucuz, daha etkili ve stabilitesi yüksek aşılar acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Virüsün biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve alternatif aşılarda geliştirilmesi önemlidir.

Bitki bazlı geçici ekspresyon sistemi, aşı antijenleri, terapötik proteinler, antikorlar ve endüstriyel enzimler dahil olmak üzere çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi için umut verici bir teknolojidir. Bu sistemler, hızlı üretim zaman çizelgesi, düşük maliyetli girdi, yüksek düzeyde ölçeklenebilir, yüksek üretim kapasitesi ve memeli patojenlerini barındırmayan diğer ifade sistemlerine göre üstün faydalar sunar.

Şimdiye kadar, bitkilerde aşı antijenleri, antikorlar ve terapötik proteinler dahil olmak üzere bir dizi rekombinant protein üretilmiştir. Bitki ekspresyon sistemi, diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla basit, yüksek düzeyde ölçeklenebilir, uygun maliyetli üretim, barındırılan herhangi bir memeli patojeninin olmaması nedeniyle göreceli ürün güvenliği ve ökaryotik post-translasyon modifikasyon makinelerinin varlığı gibi birçok avantaja sahiptir ve yeteneği vardır (Mammedov vd. 2020).

Protein translasyon sonrası modifikasyonları (PTM'ler) fosforilasyon, glikosilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon, SUMOlasyon ve diğerlerini içerir. Ubikuitinasyon'un bir rakibi olarak, protein SUMOlasyon, son yıllarda araştırma noktalarından biri haline gelmiştir. SUMOlasyon, küçük ubiquitin benzeri değiştirici (small ubiquitin-related modifier, SUMO) protein ailesinin bir üyesinin hedef proteinlerdeki lizin (Lys) kalıntılarına konjuge edildiği PTM'lerden biridir. SUMOlasyon modifikasyonu, değiştirilmiş proteinlerin sentrin/SUMO-spesifik proteazlar (SENPs) tarafından deSUMOlasyona tabi tutulabildiği, tersine çevrilebilir ve dinamik bir süreçtir (Guo vd. 2014).

Bir partner proteinin N-terminaline oldukça stabil bir yapının (ubikitin veya SUMO gibi) eklenmesi, stabiliteyi artırarak verimi artırır. İlgilenilen proteinlerle kaynaşmış SUMO, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olarak ekspresyonu önemli ölçüde geliştirir ve çözünürlüğü destekler. Fonksiyonel ve yapısal çalışmalar için membran proteinlerinin ekspresyonu ve saflaştırılması için koşulların optimize edilmesi zahmetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu aynı zamanda verimli bir ifade ve saflaştırma işlemi gerektirir. Bu süreç füzyon teknolojisi kullanılarak hızlandırılabilir (Liang vd. 2017). Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) proteaz ve 5-lipoksijenaz aktive edici protein (FLAP) gibi zar proteinleri, füzyon teknolojisi kullanılarak başarıyla eksprese edilmiş ve saflaştırılmıştır (Zuo vd. 2005). Benzer bir yöntem SUMO proteini ve kuduz virüsü için denenerek, kuduzla karşı daha ucuz, daha etkili ve stabilitesi yüksek bitki kaynaklı aşılarda geliştirilmesine umut olabilir.

Günümüzde kuduz hastalığına karşı insan ve hayvan aşıları mevcut olmasına rağmen, bunlar pahalıdır, üretimleri zahmetlidir ve nispeten zayıf bir immünojeniteye sahiptir. Bu nedenle, büyük miktarda üretilebilecek, daha immünojenik, daha ucuz ve güvenli kuduz aşılara acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, kuduz virüsünün zoonotik ve tehlikeli karakteri göz önüne alındığında, şu anda Türkiye'de kuduz aşılarının üretimi olmamakla birlikte, ülke ciddi bir hastalığın kontrolü için uluslararası ticarete bağımlıdır. Bu tez çalışmasının amacı, Türkiye'de yerli üretime yönelik düşük maliyetli, güvenli ve yüksek düzeyde immünojenik yeni nesil kuduz aşıları geliştirmektir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kuduz Hastalığı

Kuduz, dünya çapında her yıl yaklaşık 50.000-60.000 ölüme neden olan bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır. En yaygın onuncu ölümcül enfeksiyon hastalığıdır (Dietzschold vd. 2005). Kuduz, rabies virus ile meydana gelen, hayvandan hayvana veya hayvandan insana genellikle ısırma ile bulaşan bir hastalıktır. Isırma yoluyla vücuda giren kuduz virüsü sinir lifleri boyunca ilerleyerek beyne yerleşir ve belirli bir kuluçka süresinden sonra genellikle ölümle sonuçlanan bir ensefalomiyelit oluşturur (Hazar vd. 2000). Kuduz, Asya'da, Amerika'nın bazı bölümlerinde ve Afrika'nın büyük bölümlerinde köpeklerin ana konak olarak kaldığı zoonotik bir hastalıktır ve kuduz köpekler, insan kuduz vakalarının çoğunun nedenidir. Fakat yarasalar, rakunlar, kokarcılar ve tilkiler gibi vahşi hayvanlarda önemli kuduz vektörleridir (Jackson 2000). Ayrıca, her yıl dünya çapında 11 milyon insan kuduza maruziyet sonrası profilaksi (PEP) geçirmektedir. Köpek ısırması kurbanlarının %30 ila %60'ı 15 yaşın altındaki çocuklardır (Varughese vd. 1987). Dünya çapında insan kuduz vakalarının çoğundan aşısız evcil köpekler tarafından bulaşma sorumludur. . Afrika, Asya, Avrupa ve Amerika'daki birçok ülkede evcil köpeklerin toplu aşılama kuduz prevalansını azaltmada etkili bir strateji olmuştur. Uygun olmayan köpek aşılama programları, aşırı sınırlı erişim ve kuduz köpeklere maruz kalmış bireylerin maruziyet sonrası tedavileri gelişmekte olan ülkelerde önemli sorunlardır. Köpekleri kuduza karşı yeterince aşılamamanın nedenleri arasında aşılama maliyetlerinin yeterince ucuz olmaması gösterilebilir (Jackson 2000).

Kuduz virüsünün ana özelliği, periferik bölgelerden MSS'yi istila etme konusundaki benzersiz yeteneğini ifade eden nöroinvazivliktir. Virüs alımı, aksonal taşıma, transsinaptik yayılma ve viral replikasyon hızı, bir RV'nin nöroinvazivliğini belirleyen anahtar faktörlerdir (Hooper vd. 2009).

2.2. Kuduz Virüsünün Bulaş Yolları:

Hayvandan insana bulaş: Isırık, tırmalama salya teması, bütünlüğü bozulmuş deri veya mukozanın yalanması.

Aerosol ile bulaş: Enfekte yarasaların olduğu mağaralar, enfekte sinir dokusu ile çalışılan laboratuvar ortamları.

Oral bulaş: Enfekte ineğin çiğ sütü, enfekte hayvanın etini yemek.

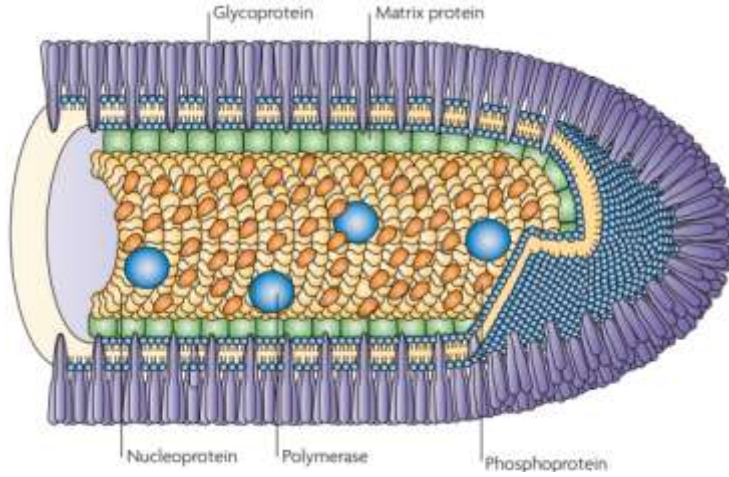
İnsandan insana bulaş: Kornea-solid organ transplantı, enfekte insan tarafından ısırılma, enfekte insanla öpüşme, cinsel yolla.



Şekil 2.1. Kuduz Hastalığına Yakalanmış Köpek

2.3. Kuduz Virüsü Yapısı

Kuduz enfeksiyonu, Mononegavirales sınıfının Rhabdoviridae ailesinde yer alan Lyssaviruslar tarafından oluşmaktadır. Kuduz virüsü (RV), Rhabdoviridae ailesinden negatif sarmallı bir RNA virüsü olan 5 yapısal proteini kodlayan nispeten basit, modüler bir genoma sahiptir: bir RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (L), bir nükleoprotein (N), bir fosforile protein (P), bir matris proteini (M) ve bir dış yüzey glikoproteini (G) içerir. N, P ve L, genomik RNA ile birlikte ribonükleoprotein kompleksini (RNP) oluşturur (Faber vd. 2009). RNA genomu nükleoproteinin içine sıkıca kaplanmıştır (Şekil 2.2.). Sadece RNP olarak adlandırılan kapsüllenmiş RNA, transkripsiyon ve replikasyon için fonksiyonel bir şablondur. Viral kapsid ayrıca polimerazdan (büyük protein için L olarak bilinir) ve polimeraz kompleksinin katalitik olmayan alt birimi olan fosfoproteinden oluşan viral polimeraz kompleksini (PC) içerir. Kapsid, iki viral protein, matris proteini ve glikoprotein ile etkileşime giren konakçı hücreden türetilmiş zar ile çevrilidir. Yapısal düzeyde, matris proteini, kuduz virüsü RNP'si ile virion zarı arasında bir köprü işlevi görür. Matriks proteini, RNP ile etkileşime girer ve onu yoğunlaştırarak, viryonlar içinde bulunan RNP'nin tipik sarmal formunu verir. Ayrıca bir trimer oluşturan glikoproteinin sitoplazmik alanı ile etkileşime girer ve sadece virüs girişi ve membran füzyonunda değil, aynı zamanda virüs salınımında da rol oynar (Schnell vd. 2009).



Şekil 2.2. Kuduz virüsü virionu (Schnell vd. 2009)

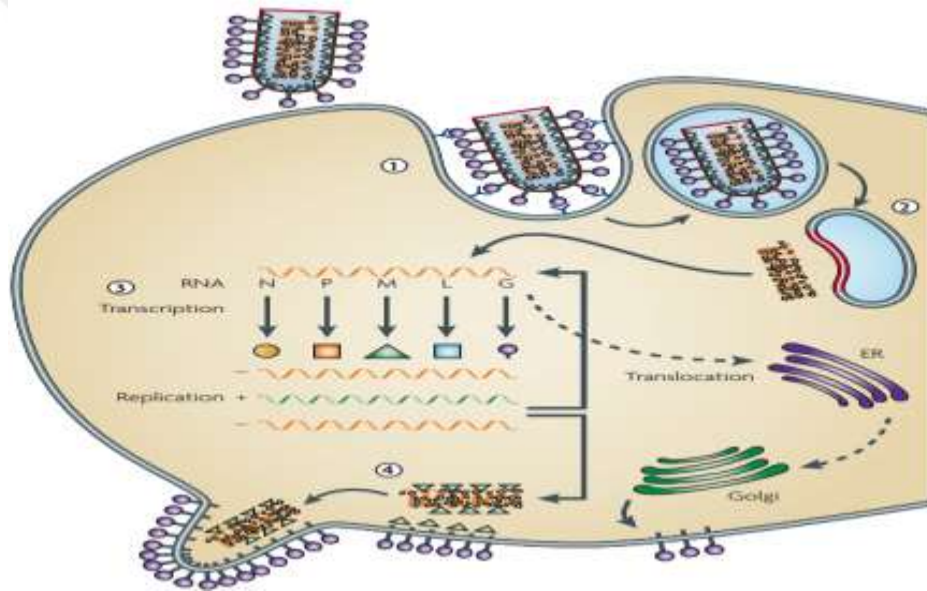
- Negatif sarmallı RNA genomu, nükleoprotein (sarı) içine sıkıca sarılır ve RNP olarak adlandırılır.
- Diğer iki viral protein, RNP ile ilişkilidir, iç çekirdeği veya kapsidi oluşturan viral polimeraz (mavi) ve fosfoprotein (turuncu).
- Kapsid, iki ek viral proteinle ilişkili olan konakçı hücreden türetilen zar tarafından yutulur: kapsid ve virion membranı arasında bir köprü görevi gören matris proteini (yeşil) ve trimer olarak düzenlenen tek transmembran glikoproteini (mor).

Kuduz virüsü gen ekspresyonu ve genom replikasyonu yüksek düzeyde düzenlenir ve VSV (veziküler stomatit virüsü, bir rabdovirüs) dahil olmak üzere diğer rabdovirüslerinkinden bazı açılardan farklıdır. VSV'nin en az zamanda olabildiğince çok virüs üretmeyi amaçladığı görünse de, kuduz virüsü iki nedenden dolayı enfekte olmuş hücreleri korumaya çalışır. İlk olarak, enfekte olmuş nöronda sitotoksitenin indüklenmesi nöronal taşımayı önleyecektir. İkincisi, yüksek seviyelerde viral protein, özellikle glikoprotein üretimi, virüsü yaşam döngüsünü tamamlamadan önce nötralize edecek olan güçlü humoral bağışıklık tepkilerini indükleyecektir. Bu nedenle, kuduz virüsü, verimli viral üretim için gerekli optimum miktarlarda, ancak bağışıklık sistemi tarafından tanınmayacak veya konakçı hücrelerinin hayati işlevlerine müdahale etmeyecek kadar düşük viral bileşenler üreten düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir (Hooper vd. 2009).

Viral replikasyonun düzenlenmesi de RV patogeneze katkıda bulunan önemli mekanizmalardandır. Patojenik RV suşları, zayıflatılmış suşlardan daha düşük bir oranda çoğalır, bu da virüsler tarafından MSS'ye ulaşmak için kullanılan nöronların yapısının korunmasına yardımcı olur. Ek olarak, viral antijenlerin, özellikle koruyucu bağışıklığın uyarılmasından sorumlu ana viral antijen olan RV G'nin düşük ekspresyon seviyeleri, konakçı bağışıklık sistemi tarafından erken saptanmasını engeller. Yabancıl RV'lerinin aksine, çoğu zayıflatılmış RV suşu çok hızlı bir şekilde çoğalır ve büyük miktarlarda G eksprese eder, böylece virüs klirensi ile sonuçlanan güçlü adaptif bağışıklık tepkilerini indükler. Bu özellikler, kuduz öncesi ve PEP için zayıflatılmış RV suşlarının kullanımına temel sağlar (Morimoto vd. 1999).

2.4. Kuduz Virüsünün Yaşam Döngüsü

Kuduz virüsünün yaşam döngüsü üç aşamaya ayrılabilir. (Şekil 2.3.) Birinci faz, konakçı hücre reseptörüne (veya reseptörlerine) bağlanmayı, endositoz yoluyla konakçı hücreye girişi, ardından viral ve endozomal membranın füzyonunu ve viral genomun sitoplazmaya salınmasını içerir. Yarasayla ilişkili kuduz virüsünü kullanan yeni bir çalışma, virüsün kanda yayıldığını ve hipotalamusun nörovasküler kavşağında MSS'yi işgal ettiğini gösterse de, klasik vahşi tip kuduz virüsü büyük olasılıkla sinir-kas kavşağında bir motor nörona girer (Preuss 2009). Her iki durumda da, kuduz virüsü parçacıkları daha sonra enfekte nöron aksonu yoluyla retrograd yönde taşınır. Virüs parçacıkları nöronun hücre gövdesine ulaştığında, virion bileşenlerinin (transkripsiyon, replikasyon ve protein sentezi) üretimini içeren ikinci aşama başlar. Yaşam döngüsünün son aşaması, viral bileşenlerin bir araya getirilmesini, bunların tomurcuklanma bölgesine taşınmasını ve daha sonra yeni bir enfeksiyon döngüsünü başlatabilecek olgun kuduz virüsü parçacıklarının salınmasını içerir. Bu işlemin her adımı yüksek düzeyde korunmuştur ve sadece kısmen anlaşılmıştır (Kelly vd. 2000).

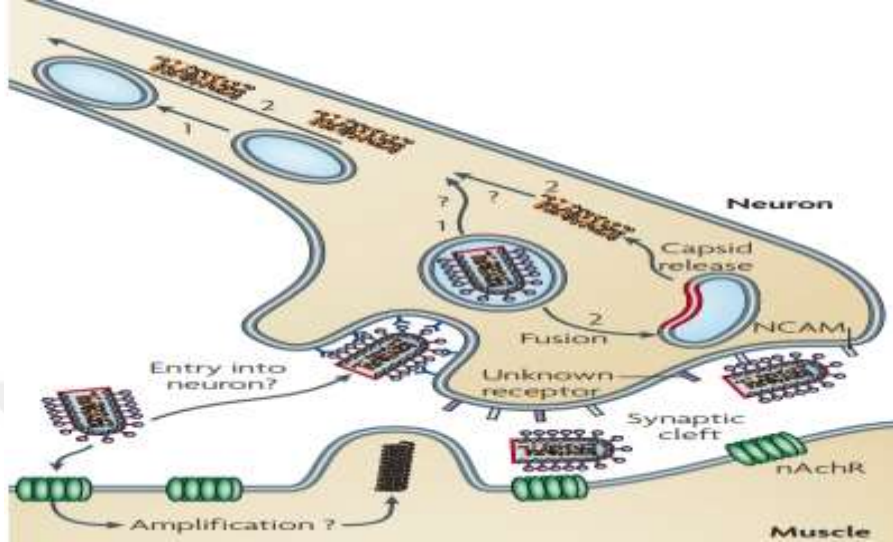


Şekil 2.3. Kuduz virüsü yaşam döngüsünün yönleri (Schnell vd. 2009)

Enfekte bir hücredeki basitleştirilmiş bir kuduz virüsü yaşam döngüsü, üç farklı aşamaya ayrılabilir. Birinci aşama, endositoz yoluyla bağlanma ve konakçı hücreye girişi (adım 1), ardından viral genomu serbest bırakmak için viral membran ve endozom membranının füzyonunu içerir (adım 2). İkinci aşamada, virion bileşenleri üretilir (transkripsiyon, replikasyon ve protein sentezi; aşama 3). Yaşam döngüsünün son aşaması, viral bileşenlerin bir araya gelmesi ve yeni bir enfeksiyon döngüsünü başlatabilen kuduz virüsü viryonlarının tomurcuklanması ve salınmasıdır (4. adım). (ER, endoplazmik retikulum).

2.5. Kuduz Virüsünün Nöronlara Girişi ve Nöron İçi Taşıma

Kuduz virüsünün aksonlardaki giriş bölgesi protein sentezi için gerekli biyokimyasal ortamı sağlamadığı için, kuduz virüsünün replikasyon ve transkripsiyon için nöronal hücre gövdesine ulaşması gerekir.



Şekil 2.4. Kuduz virüsünün nöronlara girişi ve nöron içi taşıma

Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR), postsinaptik kas zarında bulunur. nAChR'nin nöromüsküler kavşakta veya sinaptik yarıktaki kuduz virüsünü zenginleştirdiği ve bağlı motor nöronların daha verimli enfeksiyonunu sağladığı öne sürülmüştür. Diğer araştırmalar, ilk kuduz virüsü replikasyonunun kas hücrelerinde olduğunu ve nAChR'lerin kas hücrelerini enfekte etmek için kullanılabileceğini gösterir (Lafon 2005). Her iki durumda da kuduz virüsü nöronlara nöral hücre yapışma molekülü (NCAM) veya başka bir bilinmeyen reseptör kullanarak girer. Kuduz virüsünün akson yoluyla hücre gövdesine taşınması için iki farklı mekanizma önerilmiştir: ya kuduz virüsü kapsidinin ya da tüm kuduz virüsü virionunun kese içinde taşınması. Kanıtlar, bozulmamış viryonların taşınmasını desteklemektedir (Malgaroli vd. 2006).

2.6. Tarihte Kuduz Aşısı

Victor Galtiere, 1879 yılında tavşanların kuduzla karşı oldukça duyarlı ve virüs için uygun bir hayvan olduğunu göstermiştir. 1885 yılında Louis Pasteur tarafından Emile Roux ile yapılan çalışmalara dayanan, kuduz bir köpek tarafından 14 yerinden ısırılan 9 yaşındaki Joseph Meister'in başarılı tedavisinde PEP (temas sonrası profilaksi)'in kökeni iyi bilinmektedir. İlk aşılama, kuduzdan ölen tavşanların kurutulmuş omurilik dokularından hazırlanan bir dizi aşıdan oluşuyordu, 13. doz en öldürücü preparattı. Aşı serisi, ölü veya yüksek oranda zayıflatılmış bir preparattan canlı kuduz virüsüne doğru ilerliyordu. Bu aşı, beynine sabit virüs enjekte edilen tavşanların omuriliğinin desikatörde KOH ile muamele edilerek kurutulması ile elde ediliyordu (Hooper vd. 2011). Hilary Koprowski, 1954'te aşı ve kuduz antiserumunun bir kombinasyonunun daha etkili olduğunu gösterene kadar, etkisizleştirilmiş sinir dokusu aşıları kuduz PEP'inin temeli oldu (Koprowski 1954). Modern PEP, uygun yara

yönetimi, inaktive kuduz virüsü aşısı ve kuduz immün globulin uygulamasından oluşur. İnaktive kuduz virüsü, mevcut tüm insan kuduz aşılarının temelidir (Hooper vd. 2011).

Üç hücre kültürü kuduz aşısı Amerika Birleşik Devletleri'nde lisanslıdır: insan diploid hücre aşısı (Imovax Rabies, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, ABD), saflaştırılmış civciv embriyo hücre aşısı (RabAvert, Novartis Vaccines and Diagnostics, Emeryville, CA, ABD) ve adsorbe edilmiş kuduz aşısı (Bioport Corporation, Lansing, MI, ABD). Bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletleri'nde yalnızca Imovax ve RabAvert kullanım için mevcuttur. Hem Imovax hem de RabAvert koruyucu içermez ve sulandırıldıktan hemen sonra uygulanmalıdır. 2°C ile 8°C arasında ışıktan korunarak saklanmalı ve dondurulmamalıdır. Her iki aşı için de 1 dozun toplam hacmi 1 mL'dir (hem maruziyet öncesi hem de maruziyet sonrası profilaksi rejimleri için tam 1.0 mL intramüsküler (IM) doz kullanılır) ve deltoid bölgeye IM uygulanmalıdır. Küçük çocuklarda ve bebeklerde, gerekirse aşılar uyluğun anterolateral bölgesine enjekte edilebilir. Gluteal uygulama önerilmez, çünkü bu daha düşük nötralize edici antikor titrelerine neden olabilir ve siyatik sinire zarar verebilir. Aşılar subkutan, intradermal veya intravasküler olarak uygulanmamalıdır. Gelişmekte olan ülkelere maliyetleri azaltmak amacıyla, bazıları intradermal ve IM enjeksiyonların kullanımı denemiştir (Verma vd. 2011). Bununla birlikte, bu uygulama Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmamıştır ve daha fazla veri elde edilene kadar denenmemelidir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), insan kullanımına yönelik tüm ABD lisanslı kuduz aşılarının, Dünya Sağlık Örgütü'nün tavsiye ettiği 1,0 mL aşı başına 2,5 IU standardına eşit veya daha yüksek bir etki gücüne sahip olmasını şart koşar. Şiddetli yumurta alerjisi olan hastalarda aşı civciv embriyoları ile hazırlandığından ve az miktarda yumurta proteini içerebileceğinden RabAvert'ten kaçınılmalıdır. 1 aşı ürününün diğerine kıyasla üstünlüğünü tespit etmek için karşılaştırmalı klinik çalışmalar mevcut değildir (Weant vd. 2013).

Kuduz virüsü aşılarının geliştirilmesinde ve kuduzun kontrolünde kaydedilen büyük ilerlemeye rağmen dünya çapında kuduz virüsünün neden olduğu yıllık ölüm sayısı oldukça fazladır. Bu nedenle, tedavi için yeni yaklaşımlara ve daha ucuz, daha etkili aşılar acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7. Sumolasyon

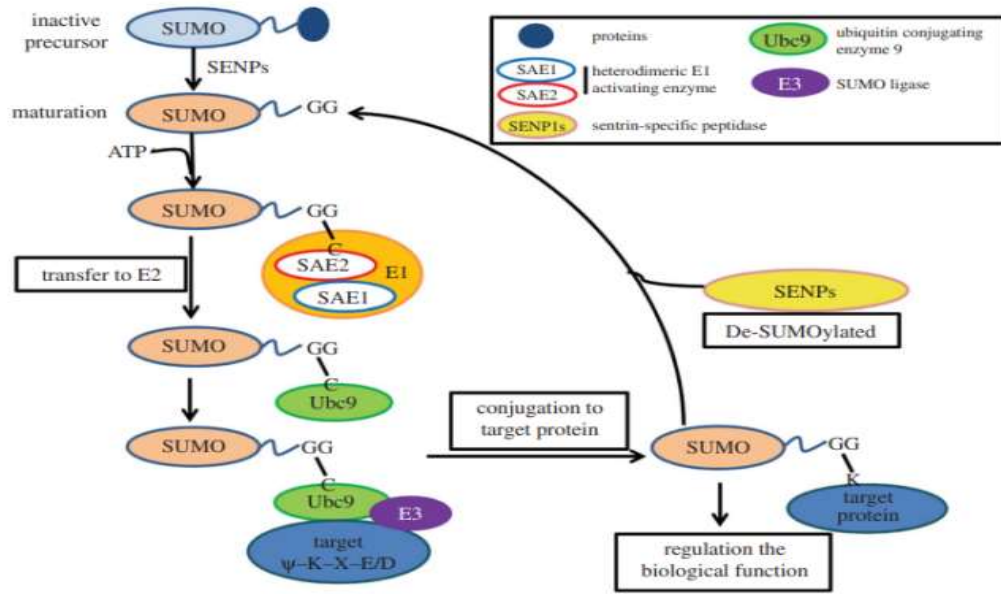
Protein translasyon sonrası modifikasyonları fosforilasyon, glikosilasyon, asetilasyon, ubikuitinasyon, SUMOlasyon ve diğerlerini içerir. Ubikuitinasyon'un bir rakibi olarak, protein SUMOlasyon, son yıllarda araştırma konularından biridir. SUMOlasyon, küçük ubikuitin benzeri değiştirici (small ubiquitin-related modifier, SUMO) protein ailesinin bir üyesinin hedef proteinlerdeki lizin (Lys) kalıntılarına konjuge edildiği PTM'lerden biridir. SUMOlasyon modifikasyonu, değiştirilmiş proteinlerin sentrin/SUMO-spesifik proteazlar (SENPs) tarafından deSUMOlasyona tabi tutulabildiği, tersine çevrilebilir ve dinamik bir süreçtir. Bir SUMO'nun bir proteine tersinir şekilde bağlanması, ubikuitinasyon yolağına benzer bir enzimatik yol tarafından kontrol edilir (Guo vd. 2014). Giderek daha fazla araştırma, vücudun normal işlevinde SUMOlasyon'ın önemini fark etmiştir. Biyolojik fonksiyonları hakkında biriken bilgilerin yanı sıra SUMOlasyon'ın protein hücre altı lokalizasyonunu, protein-DNA bağlanmasını, protein-protein etkileşimlerini, transkripsiyonel düzenlemeyi, DNA onarımını ve genom organizasyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Yang vd. 2017).

Ayrıca, SUMO düzenlemesindeki sapmanın kalp hastalığı, nörodejeneratif hastalık ve kanserler dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla yüksek oranda ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda kanıt vardır (Hickey vd. 2012).

Protein SUMOlasyon biyokimyasal süreci ubikuitinasyon ile ilgilidir. Ubikitin benzeri proteinlerin (Ubls) korunmuş bir protein ailesinin en belirgin üyeleri olan Ubikitin ve SUMO, bir izopeptid bağı yoluyla hedef proteinlerin Lys kalıntılarına bağlanabilir. Ubikuitin benzeri modifikasyonlar, aktive edici enzimlerin (E1s), konjuge edici enzimlerin (E2s) ve ligazların (E3s) ardışık eylemini gerektiren üç aşamalı bir kademeli mekanizmada gerçekleştirilir. İnsan hücrelerinde, ubikuitinasyon, iki E1 ubikuitin aktive edici enzim, yaklaşık 35 çeşit E2 ubikuitin konjuge edici enzim ve çeşitli E3 ubikuitin ligazları tarafından aracılık edilir. Ubikuitinlenmiş proteinler, ubikuitin bağlama alanları içeren reseptörler tarafından tanınırken, özel bir proteaz ailesi olan deubikuitinazlar, ubikuitin modifikasyonlarını ortadan kaldırır (Komander vd. 2016).

Benzer şekilde, ubikuitinasyon'un benzer bir modifikasyonu olan SUMOlasyon, sırayla E1, E2 ve E3 enzim katalizi altında gerçekleştirilen biyokimyasal süreçte ubikuitinin konjugasyon yoluna benzer. Protein SUMOlasyon sırasında, SUMO'lar memeli hücrelerinde SENP'ler tarafından C-terminali diglisin motiflerini ortaya çıkarmak için bölünme gerektiren propeptidler olarak sentezlenir. SUMO'lar daha sonra SUMO aktive edici enzim alt birimi 1 (SAE1) ve SAE2'nin ATP'ye bağımlı bir heterodimeri tarafından aktive edilir ve bu heterodimer aktive edilmiş SUMO proteinini spesifik ve benzersiz birleştirici enzim olan bir ubikuitin eşlenik enzimi 9'a (Ubc9), bir trans-esterifikasyon reaksiyonu ve yüksek enerjili bir tiyoester bağı oluşturularak aktarılır. Ubc9 genellikle bir E3 bağlama enzimi ile birlikte hareket eder, ardından substrata SUMO konjugasyonunu katalize eder. Son olarak, SUMO konjugasyonu, SUMO C-terminali ile hedef protein içindeki bir Lys'nin bir e-amino grubu arasında bir izopeptid bağı oluşturur. SUMO modifikasyonunun bir proteinden çıkarılmasına SENP'ler aracılık eder. Memeli hücrelerinde SUMO modifikasyonlarının biyokimyasal süreci Şekil 2.5'te gösterilmiştir (Yang vd. 2017).

Bir partner proteinin N-terminaline oldukça stabil bir yapının (ubikitin veya SUMO gibi) eklenmesi, stabiliteyi artırarak verimi artırır. İlgilenilen proteinlerle kaynaşmış SUMO, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olarak ekspresyonu önemli ölçüde geliştirir ve çözünürlüğü destekler. Ubikitin'in, E. coli'deki kaynaşmış proteinler üzerinde refakatçi etkisi uyguladığı ve bunların verimini ve çözünürlüğünü arttırdığı bilinmektedir. Ubikuitin ve ubikuitin benzeri proteinlerin çözündürücü etkisi, kısmen, ubikuitin ve SUMO'nun çekirdek yapısının dış hidrofiliği ve iç hidrofobikliği ile de açıklanmıştır, aksi takdirde çözünmeyen proteinler üzerinde deterjan benzeri bir etki uygular. Yüksek oranda çözünür bir füzyon etiketinin mevcudiyeti ayrıca protein ürünlerinin E. coli'de artan çözünür ekspresyonunu mümkün kılar, böylece ürün agregasyonunu veya inklüzyon cisimlerinin oluşumunu önler (Singh vd. 2012).



Şekil 2.5. Memeli hücrelerinde SUMO modifikasyonlarının biyokimyasal süreci (Yang vd. 2017)

- Tüm küçük ubiquitin benzeri değiştirici (SUMO) paralogları, bir karboksiterminal diglisin (GG) motifini (olgunlaşma) ortaya çıkarmak için ilk önce bir SENP tarafından bölünen ön proteinler olarak sentezlenir.
- Heterodimerik E1 aktive edici enzim (SAE1 ve SAE2 dahil) tarafından ATP gerektiren bir aktivasyon adımı daha sonra bir SUMO – SAE2 tiyoester üretir.
- SUMO daha sonra tekrar bir tiyoester oluşturan E2 konjuge enzim Ubc9'a aktarılır. Bu son adım, genellikle SUMO C-terminali ile hedef protein içindeki bir lizin arasında bir izopeptid bağı meydana getirmek için bir SUMO E3 ligazını gerektirir.

Fonksiyonel ve yapısal çalışmalarda membran proteinlerinin ekspresyonu ve saflaştırılması için koşulların optimize edilmesi zahmetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu aynı zamanda verimli bir ifade ve saflaştırma işlemi gerektirir. Bu süreç füzyon teknolojisi kullanılarak hızlandırılabilir. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) proteaz ve 5-lipoksijenaz aktive edici protein (FLAP) gibi zar proteinleri, füzyon teknolojisi kullanılarak başarıyla eksprese edilmiş ve saflaştırılmıştır (Zuo vd. 2005). Benzer bi yöntem SUMO proteini ve kuduz virüsü için denenerek, kuduza karşı daha ucuz, daha etkili ve stabilitesi ve immunojenitesi daha yüksek bitki kaynaklı aşılarda geliştirilmesine umut olabilir.

2.8. Bitki Bazlı Geçici Ekspresyon Sistemleri ve Agroinfiltrasyon Metodu

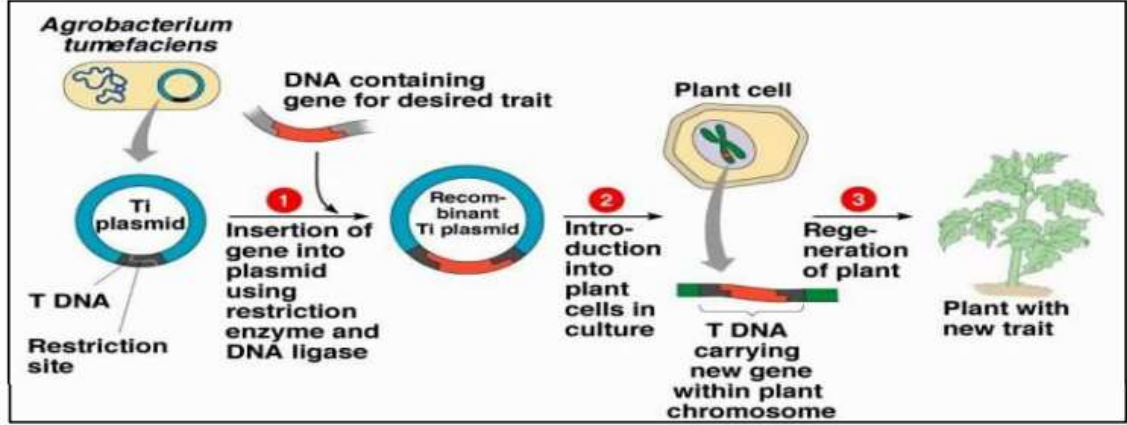
DNA tabanlı teknolojilerin geliştirilmesi, protein ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesi için yeni fırsatlar yaratmıştır. Bugüne kadar, birkaç protein ekspresyon sistemi geliştirilmiş ve bu ekspresyon sistemleri kullanılarak, halihazırda piyasada bulunan bulaşıcı hastalıkların aşılarda da dahil olmak üzere çeşitli rekombinant proteinler üretilmiştir. Geliştirilen ilk ekspresyon sistemi bakteri ekspresyon sistemidir ve şu anda en çok kullanılan sistemdir. Bakteri ekspresyon sistemi ucuz ve verimli olmasına

rağmen, sistemin ökaryotik proteinlerin, özellikle kompleks memeli proteinlerinin üretimi için ciddi sınırlamaları vardır. Düşük maliyeti ve güvenliği nedeniyle maya, rekombinant proteinlerin üretimi için mükemmel bir ökaryotik konaktır. Ancak mayalarda yaygın olarak görülen hipermannosilasyon, protein katlanmasını olumsuz etkiler. Memeli hücre kültürü, karmaşık memeli proteinlerinin üretimi için ideal bir platformdur, ancak bu sistemin memeli patojen kontaminasyonu riski vardır, çok pahalıdır ve büyütülmesi de zordur. Son yıllarda bitkiler, güvenli ve etkili terapötik proteinler üretmek için umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki bazlı geçici ekspresyon sistemi, aşı antijenleri, terapötik proteinler, antikorlar ve endüstriyel enzimler dahil olmak üzere çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi için umut verici bir teknolojidir. Bu sistemler, hızlı üretim zaman çizelgesi, düşük maliyetli girdi, yüksek düzeyde ölçeklenebilir, yüksek üretim kapasitesi ve memeli patojenlerini barındırmayan diğer ifade sistemlerine göre üstün faydalar sunar. Şimdiye kadar, bitkilerde aşı antijenleri, antikorlar ve terapötik proteinler dahil olmak üzere bir dizi rekombinant protein üretilmiştir. Bitki ekspresyon sistemi, diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla basit, yüksek düzeyde ölçeklenebilir, uygun maliyetli üretim, barındırılan herhangi bir memeli patojeninin olmaması nedeniyle göreceli ürün güvenliği ve ökaryotik post-translasyon modifikasyon makinelerinin varlığı gibi birçok avantaja sahiptir ve yeteneği vardır (Mamedov vd. 2020).

Bitkilerde geçici gen ekspresyonu, çok kısa (günler) bir süre içinde büyük miktarda rekombinant proteinin birikmesine izin verir. Bitkilerde geçici olarak eksprese edilen rekombinant proteinlerin üretimini arttırmak için iki ana strateji özetlenebilir: daha pahalı ve zaman alıcı yaklaşım, viral bazlı vektörlerin inşası dahil ekspresyon vektör sisteminin modifikasyonunu içerir. Bu sistem, farklı plazmitleri taşıyan *Agrobacterium*'un aynı anda infiltrasyonu ile bitkiye verilen üç elementten oluşur. Viral genler ve düzenleyici elementler, *Streptomyces* faj PhiC31 siteye özgü rekombinazın yardımıyla bitki hücresi içindeki ilgili gen ile birleştirilir. Ortaya çıkan DNA molekülü, RNA'ya bağımlı RNA polimerazın viral genlerini ve hareketli proteini içerir. Raportör gen, yeşil floresan protein (GFP), bir viral kaplama proteininin subgenomik promotörü tarafından çalıştırılır. Bu nedenle, elde edilen vektör, kaplama proteininden yoksun olduğu için sistemik olarak hareket edemez, ancak hareketli protein nedeniyle hücreden hücreye hareket edebilir (Marillonnet vd. 2004). Son yayınlar bu yaklaşımın perspektiflerini göstermiştir: *Agrobacterium* infiltrasyonu ile bitkide sağlanan viral bazlı vektörlerin optimize edilmiş yapısı, GFP seviyesinin %50'den fazla TSP ve %10'a kadar insan büyüme hormonu seviyesinin elde edilmesini sağladı. (Sheludko vd. 2006).

Agroinfiltrasyon hızlıdır, hiçbir transgenik bitki oluşturulmasına gerek yoktur ve deneysel işlem basit olduğu için numune sayılarının artırılması da uygundur. Düşük verimlilikte ve kararsız proteinlerin fonksiyonel fenotiplerini gözlemlemek için özellikle iyi bir tekniktir çünkü bu proteinler genellikle transgenik bitkilerde bile saptanamaz (Liu vd. 2010). Agroinfiltrasyon için, en yaygın olarak kullanılan ajan, dikot bitkilerin geniş bir konakçı aralığı patojeni olan *Atumefaciens*'tir. *A. tumefaciens* bir tümör indükleyici (Ti) plazmiti içerir. İlgili gen, *Agrobacterium Tumefaciens*'in Ti-plazmitine enjekte edilir. Bir Ti plazmidinden transfer DNA'sı (T-DNA), bakterinin virülans mekanizması aktive edildikten sonra bitki hücrelerine yer değiştirir. Bu, hafif asidik bir ortamda salınan düşük moleküler ağırlıklı fenolik bileşikler ve monosakkaritler tarafından yaralı bitki hücrelerinde tetiklenebilir. Virülans geni, *Agrobacterium*

süspansiyonlarının ana damarlar tarafından tanımlanan yaprak panellerine sızmasından sonra aktive olur. Daha sonra yaprak panellerindeki bitki hücreleri dönüştürülecek ve T-DNA bölgesinde bulunan transgen(ler)i ifade edecektir (Du vd. 2014).



Şekil 2.6. *Agrobacterium Tumefaciens* aracılı Agroinfiltrasyon (Gangrade vd. 2016)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Organizmalar

Bir *E.coli* suşu olan XL1Blue daha önceden yapılan çalışmalar sırasında Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nden temin edilmiştir.

Nicotiana Benthiana, Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümü iklimlendirme odasında torf ve perlit karışımı (3:1 oranında) üzerinde 24°C, 60 % nem ve 18 saat ışıklı 6 saat ışısız olacak şekilde yetiştirildi ve deneylerde 6-7 haftalık bitkiler kullanıldı.

3.2. Kullanılan Besiyerleri, Tampon Çözeltiler ve Diğerleri

1% Agoroz jel

0.6 g agaroz tartılıp 60 ml 1x TAE tamponu içinde çözündürüldü. Solüsyon tamamen çözülene kadar mikrodalga fırında yaklaşık 1-2 dakika ısıtıldı. Çözeltinin sıcaklığı düştükten sonra 1,2 µL Ethidium Bromide (EtBr) eklendi. Karışım önceden hazırlanmış yatay elektroforez tankına dökülüp uygun tarak yerleştirildi ve ağarın katılaşması beklendi.

50X TAE tampon Solüsyonu

242 g Tris, otoklavlanmış 700 mL ddH₂O içinde çözündürüldü. Karışım, 100 mL 0.5M EDTA (pH: 8) ve 57.1 mL glacial asetik asit eklenerek çözüldü. pH 8.5-8.6'ya ayarlandıktan sonra, son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

1X TAE tampon Solüsyonu

20 mL 50xTAE tampon solüsyonu son hacim 1000 mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O ile tamamlandı.

0.5 M EDTA

14,612 g EDTA tartıldı ve 80 mL otoklavlanmış ddH₂O içinde çözündürüldü. pH:8'e ayarlandıktan sonra, son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

SOC ortamı

20 g baktotripton, 5 g bakto maya ekstraktı, 2 ml 5M NaCl, 2.5 ml 1M KCl, 10 ml 1M MgCl₂, 10 ml 1M MgSO₄ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde çözüldükten sonra, 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı. Solüsyon otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklığın 50 °C'ye düşürülmesi beklendi. Daha sonra steril kabin altında 20 ml 1M glikoz ilave edilerek 4 °C'de saklandı.

LB agarlı Besiyeri (50mg/ml Kanamisin)

✓ LB-Broth

✓ ddH₂O

40 g LB-Broth Agar tartıldı ve 1 litre otoklavlı ddH₂O içinde çözdürüldü ardından solüsyon 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı. Otoklavlanan LB agar solüsyonu su banyosunda 50°C'ye soğutuldu ve 1 litre LB agar besiyerine 1 ml 50 mg/ml stock kanamisin içerisinde 1000ul antibiyotik eklendi. LB agar Besiyeri petrilere 25 ml olacak şekilde döküldü ve +4°C'de saklandı.

Kanamisin stok (50mg/ml)

✓ Kanamisin

✓ ddH₂O

50mg/ml kanamisin stoğu için; 0,5 g kanamisinmonosülfat(cat n:) tartıldı ve 10 ml ddH₂O içerisinde çözdürüldü. Solüsyon 0.45um filtreden enjektör ile geçirildi, 500 µl olacak şekilde eppendorflara ayrıldı, -20°C de saklandı.

BBL Besiyeri (SYS)

✓ Soyhidrolizat

✓ Yeast extract

✓ NaCl

✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 10 g soyahidrolat, 5 gr maya özütü ve 5 g NaCl eklendi ardından manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti pH: 7.0 olacak şekilde KOH ile ayarlandı ve son hacim 1 L' ye tamamlandı. 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

MMA Ortamı (10 mm MES, 10 mm MgCl₂)

✓ MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)

✓ MgCl₂

✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 1.952 g MES ve 2.03 g MgCl₂.6H₂O eklendi ardından manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti pH: 5.8 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı, son hacim 1 L' ye tamamlandı. 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

Asetosiringon

- ✓ Asetosiringon
- ✓ Etanol (absolute)
- ✓ ddH₂O

Asetosiringon 100 mM stok olarak hazırlanır. 0,3924 g asetosiringon, 12 ml % 95 etanol ve 8 ml otoklavlı ddH₂O içinde çözüldü. Stok, 0.45 µm filtreden geçirildi ve 100 µl olacak şekilde -20°C'de saklandı.

90 % Gliserol

- ✓ 100% Gliserol
- ✓ ddH₂O

9 birim 100 % gliserol ve 1 birim otoklavlı ddH₂O karıştırıldı. Solüsyon 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı.

1X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

- ✓ 1X PBS tablet
- ✓ ddH₂O

Hazırlanışında anlatıldığı gibi 1 adet PBS tablet 200 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve +4°C'de saklandı.

DIECA (Sodyum dietilditiokarbamat)

- ✓ DIECA
- ✓ ddH₂O

1 M (Dieca mw:225,31g/mol) olacak şekilde hesaplanarak hazırlandı. Bu çalışmada infiltre edilen yaprakların ekspresyon kontrolünde 2 mM, purifikasyon için kullanılacak olan biyomas için ise 1 mM DIECA kullanıldı.

5X Laemmli Tampon (5X SDS)

- ✓ Tris
- ✓ Gliserol
- ✓ SDS
- ✓ Bromophenol Blue

✓ B-mercaptoethanol

Laemmli buffer, içerisinde ki merkaptotanol sayesinde proteinlerin denatüre olmasını sağlar. 7.5 ml β -merkaptotanol içerisine 3.333 g SDS, 9.375 ml 1M Tris, 11.9 ml gliserol, 660 μ l Bromofenol mavisi (% 0.01) eklendi ve çözündürüldü. Çözelti pH: 6.8 olacak şekilde HCl ile ayarlandı. Dört birim protein örneği ve bir birim 5X Laemmli Tampon ile karıştırılarak kullanıldı.

40 % Akrilamid / Bis-akrilamid Çözeltisi

✓ Akrilamid

✓ Bis-Akrilamid

✓ ddH₂O

194.8 g akrilamid 150 ml otoklavlı ddH₂O içinde çözündürüldü. Ardından 5.2 g bisakrilamid çözeltiye eklendi. Çözelti bir gece manyetik karıştırıcıda bırakıldı ve tamamen çözündürüldü. Akrilamid tamamen çözündüğünde çözeltinin hacmi arttı ve hacim 500 ml olacak şekilde tamamlandı. Akrilamid / bis-akrilamid solüsyonu ışık geçirmeyen bir erlen içerisinde + 4°C' de saklandı.

1.5 M Tris-HCl Çözeltisi

✓ Tris

✓ HCl

✓ ddH₂O

800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde 185 g Tris çözündürüldü. HCl ile pH: 8.8'e ayarlandı. Son hacim 1 L' ye tamamlandı.

0.5 M Tris-HCl Çözeltisi

✓ Tris

✓ HCl

✓ ddH₂O

800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde 60 g Tris çözündürüldü. HCl ile pH: 6.8' e ayarlandı. Son hacim 1 L' ye tamamlandı.

10 % SDS Tamponu

✓ SDS

✓ ddH₂O

90 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 10 g SDS tozu eklendi ve gün boyunca manyetik karıştırıcıda çözünmeye bırakıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Sülfat / 10 % Amonyum (APS)

✓ Ammonium persülfat

✓ ddH₂O

10 µg APS tozu 90 µl otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve her zaman günlük olarak hazırlandı.

5X TBS ve 1X TBS

✓ Tris

✓ NaCl

✓ HCl

✓ ddH₂O

5X TBS, 20 mM Tris (pH: 7.5) ve 150 mM NaCl içerir. 12.115 g Tris ve 43.88 g NaCl, 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde çözülür. pH, HCl ile 7.5'e ayarlandı. Otoklavlı ddH₂O ile hacim 1 L'ye tamamlandı. 1X TBS, 5X TBS'i seyrelterek hazırlandı. 1 hacim 5X TBS ve 4 hacim otoklavlı ddH₂O ile karıştırıldı.

1X Yürütme Tamponu

✓ Tris

✓ Glisin

✓ SDS

✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 3.03 g Tris ve 14.3 g Glisin eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltiye 10 ml 10% SDS solüsyonu eklendi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

1X Transfer Tamponu

✓ Tris

✓ Glisin

✓ SDS

✓ ddH₂O

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 5.8 g Tris ve 2.93 g Glisin eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltiye 370 µl 10% SDS solusyonu eklendi ve son hacim 1 L' ye tamamlandı.

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için 12% Poliakrilamid jel hazırlanması

MALZEMELER	AYIRMA JELİ	YÜKLEME JELİ
Otoklavlı ddH ₂ O	2,175 ml	1,917 ml
40 % Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	1,5 ml	374.4 µl
1,5 M Tris-HCl	1,25 ml	-
0,5 M Tris HCl	-	787 µl
10 % SDS	50 µl	31,25 µl
TEMED	2,5 µl	3,125 µl
10 % APS	25 µl	15,62 µl

Blotlama Çözeltisi (I-blok)

✓ Blotting grade powder

✓ 1X TBS

1 g blotting grade powder, 100 ml 1X TBS eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Jel Boyama Solüsyonu (Coomassie Blue)

✓ Glacial asetik asit

✓ Metanol

✓ Coomassie mavisi

✓ ddH₂O

100 ml glacial asetik asit, 500 ml metanol ve 400 ml ddH₂O karıştırıldı. Karışıma 1 gr Coomassie mavisi eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Destaining Solüsyonu

- ✓ Metanol
- ✓ Asetik asit
- ✓ ddH₂O

200 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 700 ml ddH₂O karıştırılır.

3.3. Genlerin Klonlanması

Sumo geni ve kuduz virüsü glikoproteini (SUMOGP) koeksprese olarak sentezletilip *Nicotiana Benthamiana* bitkisinde üretimi için gerekli kodon optimizasyonları Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV tarafından yapılarak, C terminal ucuna His epitopu (afinite saflaştırma etiketi) eklenerek vektör içerisinde ticari olarak satın alındı.

SENP1 geni *Nicotiana Benthamiana* bitkisinde üretimi için gerekli kodon optimizasyonları Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV tarafından yapıp C terminal ucuna FLAG epitopu (afinite saflaştırma etiketi) eklenerek vektör içerisinde ticari olarak satın alındı. Tüm genler, Age I ve Xho I restriksiyon enzimi kesim bölgeleri ile tasarlanmıştır.

3.4. Genlerin Vektörden Kesimi ve Doğrulanması

Laboratuvarımızda daha önce SUMOGP ve SENP1 genlerini bulundukları vektörlerden ayırmak için AgeI ve XhoI enzimleri ile kesim işlemi uygulanmıştır. Doğrulama için genler 3µL GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) ile 1xTAE tampon solüsyonunda %1 agaroz jele yüklenip elektroforezde yürütülmesinin ardından U.V. ışık kaynağı altında ilgili SUMOGP ve SENP1 bantları bir lanset yardımıyla kesilerek jelden geri kazanılmıştır. Geri kazanımdan sonra tekrar %1 agaroz jele yüklenerek doğrulamaları yapılmıştır.

3.5 LP1 Plazmitine Ligasyon ve E.coli XL1Blue Kompetan Hücrelerine Transfer

Bulundukları vektörlerden AgeI ve XhoI enzimleri ile ayrılan ve doğrulamaları yapılan SUMOGP ve SENP1 genleri üreticinin protokolüne göre Quick Ligation Kit (New England BioLabs, Katalog Numarası: 1091410) kullanılarak LP1 plazmitine ligaz edildi.

Plazmit ile birleştirilmiş genler oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra ısı şoku yöntemiyle *E.coli* XL1Blue kompetan hücrelerine aktarıldı. Bu yöntemle göre ligasyon ürünü (21 µl) üzerine *E.coli* XL1Blue kompetan hücreler (400 µl) ilave edildi ve 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra örnekler 42°C'deki su banyosunda 50 saniye bekletildi ve hemen buz kabına aktararak 5 dakika daha buz üzerinde tutuldu. Örneklerin üzerine 400 µl LB besiyeri eklenerek 37°C'de 225 rpm'de 1 saat inkübasyonu sağlandı.

3.6. LP1 Plazmit İzolasyonu

E.coli XL1Blue kompetan hücrelerine transformasyonu yapılan ve inkübasyonu tamamlanan örnekler (Lp1 SUMOGP; Lp1 SENP1) 3000xg'de 2 dakika santrifüjlendi. Daha sonra çöken hücrelere 100 µL süpernatant ilave edilerek çöken hücreler pipetaj ile yeniden süspanse edildi ve steril bir öze ile 50 µg/ml kanamisin içeren LB petriye yayılarak gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra petri kabında koloniler gözlemlendi. Seçilen koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml sıvı LB besiyerine konularak 37°C'de 225 rpm'de gece boyunca inkübe edildi. *E.coli* XL1Blue hücrelerindeki plazmitler, Zymoprep Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, ABD, Katalog Numarası: D4037) ile üreticinin protokolüne göre izole edildi. İzole plazmitler, 37°C'de 1 saat süreyle XhoI ve AgeI enzimleri ile kesildi ve örnekler 3µL GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) ile 1xTAE tampon çözeltisi içinde %1 agaroz jele yüklendi. Elektroforez 110V'da 55 dakika çalıştırılarak doğrulamaları yapıldı. Plazmitleri içeren *E. coli* XL1Blue hücrelerinin bir kısmı 90 % gliserol ile stoklandı ve -80 °C'de saklandı.

3.7. *Agrobacterium Tumefaciens* Suşlarına (Kompetent Hücrelerine) Transfer

E.coli XL1Blue hücrelerinden (Lp1 SUMOGP; Lp1 SENP1) izole edilen ve doğrulamaları yapılan plazmitler, elektrik şokuyla elektroporasyon yoluyla (BIO-RAD Gene pulser Xcell, USA) *Agrobacterium tumefaciens* AGL1psoup ve EHA105 suşu kompetent hücrelerine aktarıldı (0,5µL DNA+50µL AGL1psoup/EHA105 suşu kompetent hücreler, SUMOGP: 2474V. 10,2m/s; SENP1 2482V. 10,2m/s). Elektroporasyon kuvvetine 1 ml SOC Medium eklendikten ve nazikçe pipetaj yapıldıktan sonra hücreler 28°C'de 2 saat çalkalayıcılı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnekler 300g'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu bakteriler daha sonra 50 µg/ml kanamisin içeren LB petriye sterile bir öze ile yayıldı ve 28°C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. 3 gün sonra koloniler gözlemlendi. EHA105 kompetent hücrelerine ait petride koloni gözlenmediği için deneylere AGL1psoup suşu ile devam edildi. Uygun koloniler seçilerek kanamisin içeren BBL ortamına aktarıldı ve gece boyunca 28 °C, 225 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 24 saat sonra büyütülen bakterilerin 600 nm'de O.D. (Optik Yoğunluk) ölçümü yapıldı (Thermo Fisher Scientific Oy Ratastie 2, FI-01620, Finland) (O.D. ≥1 olmalıdır). Bakteriyel çözeltinin bir kısmı ayrılarak 90 % gliserol ile stoklandı ve -80 °C'de saklandı.

3.8. *Nicotiana Benthiana* Bitkilerine *A. Tumefaciens* Aracılığı ile SUMOGP ve SENP1 Varyantlarının İnfiltrasyonu

Agrobacterium Tumefaciens AGL1psoup hücrelerine aktarılmış ve gece boyu BBL ortamında inkübasyona bırakılmış bakterilerin O.D değerleri ölçülüp kaydedildikten sonra bakteriler 5000xg'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve pellet O.D.'ye göre, 100ml MMA tamponu için 15µL asetosiringon ile desteklenmiş MMA ortamına aktarıldı. Bakteriler daha sonra manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı.

İnfiltrasyon için tohum ekiminden itibaren, 24°C, 60 % nem ve 18 saat ışıklı 6 saat ışısız olacak şekilde iklimlendirme odasında yetiştirilen 6-7 haftalık belli bir büyüklüğe ulaşan *Nicotiana Benthiana* bitkileri kullanıldı. 2 saatlik inkübasyon

sonunda bakteriyel çözelti AGL1psoup SUMOGP ve AGL1psoup SENP1 hem tek başlarına hem de SENP1 enziminin SUMOGP füzyon proteini üzerindeki etkisini gözlemlemek için farklı konsantrasyonlarda koeksprese edilerek şırınga aracılığıyla bitki yapraklarına enjekte edildi.

Çizelge 3.2. SUMOGP – SENP1 varyantlarının infiltrasyonu için *A. tumefaciens* kombinasyonları

	SUMOGP	SUMOGP:SENP1 9:1	SUMOGP:SENP1 8:2	SENP1
SUMOGP	10 ml	0,9 ml	0,8 ml	-
SENP1	-	0,1 ml	0,2 ml	10 ml

3.9. SUMO-GP ve SENP1 Varyantlarının İnvitro Koeskpresyonu

Agrobacterium Tumefaciens AGL1psoup hücrelerine aktarılmış ve *Nicotiana Benthamiana* bitkilerine infiltrasyonu yapılan SUMOGP varyantına ait bitki yaprakları 5 dpi'da toplanıp -80°C'ye kaldırıldı.

-80°C'de bulunan SUMOGP varyantına ait bitki yapraklarından 1 g alındı. Üzerine 3 ml ekstraksiyon tamponu (1X PBS, 2 mM DIECA) eklenerek havan ve havaneli yardımı ile buz üzerinde ekstrakte edildi. Ezilen örnekler 20.000xg, 5dk, +4°C'de santrifüj edilerek supernatant, pelletten ayrıldı. Elde edilen süpernatant 6 adet ependorfa 20'şer µl olarak paylaştırıldı. Ependorfların üzerine laboratuvarımızda saflaştırılmış olan SENP1 proteini farklı konsantrasyonlarda eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Çizelge 3.3. SUMO-GP ve saflaştırılmış SENP1 varyantlarının invitro koeskpresyon kombinasyonları

	SENP1	SENP1	SENP1	SENP1	SENP1	SENP1
SUMOGP 20 µl	-	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl

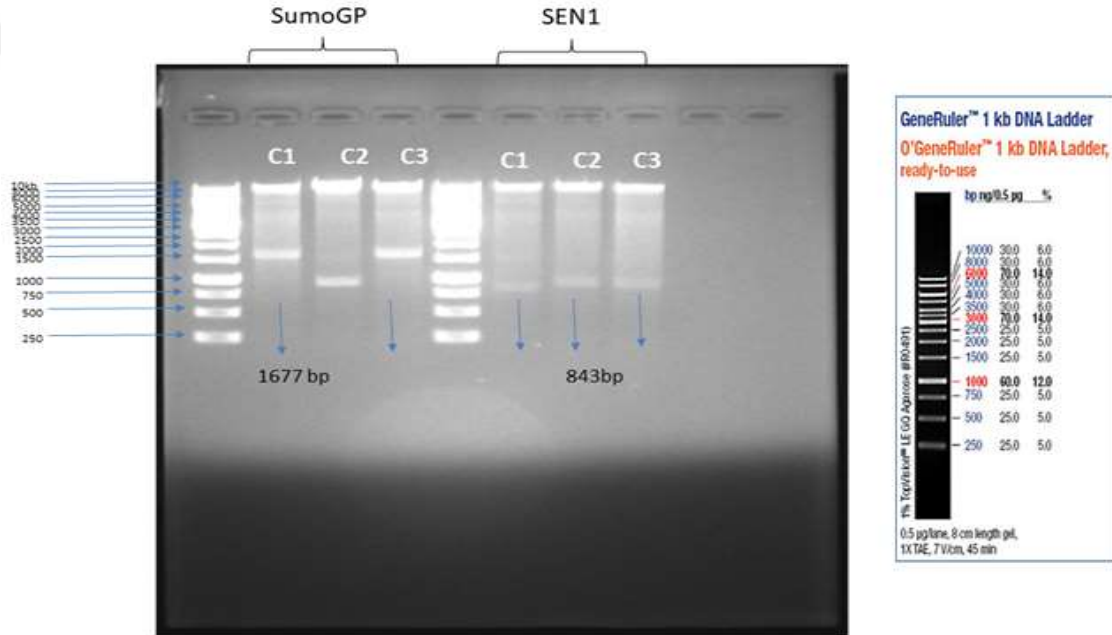
3.10. Western Blot ile Ekspresyon Analizi

SumoGP ve SumoGP:SENp1 varyantları ile infiltre edilen *Nicotiana benthamiana* bitki yaprakları infiltrasyondan sonraki 5. günde (day post infiltration, 5dpi), SENp1 varyantı ile infiltre edilen bitki yaprakları ise 4 dpi'da toplandı. Toplanan infiltre yapraklardan homojen bir örnek alındı ve kalan yaprak kütlesi kullanılabileceği kadar -80°C'de saklandı. Örnekler, ağırlıklarının 3 katı hacimde ekstraksiyon tamponunda (1X PBS, 2 mM DIECA) havan ve havaneli yardımı ile buz üzerinde ekstrakte edildi. Ezilen örnekler 20.000xg, 5dk, +4°C'de santrifüj edilerek supernatant, pelletten ayrıldı. Western Blot Ekspresyon analizi için 4 hacim supernatant ve 1 hacim 5X Laemmli Tamponu karıştırıldı. Hazırlanan örnekler su banyosunda 100°C'de 5dk kaynatıldı ve 12% poliakrilamid jele laboratuvarımızda daha önce hazırlanan western blot standartları ile yükleme yapıldı. (SumoGP ve SumoGP:SENp1 için: dPA83 standart protein; SENp1 için: PNGase standart protein) Protein etiketleri farklı olduğu için SUMO-GP ve SUMO-GP:SENp1 koekspresyon örnekleri bir jele, SENp1 örneği ayrı bir jele yüklendi. Yürütme tamponu ile birlikte 100 V'de 15 dakika ardından 200 V'de 45 dakika yürütüldü. Daha sonra proteinler, transfer tamponu ile poliviniliden florür membran üzerine 100 V'da 1 saat transfer edildi. Membranlar, 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1% I-blok ile blok edildi. 10µl primer antikor (SUMO-GP ve SUMOGP:SENp1 koekspresyonları için; anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502, SENp1 için anti-FLAG antikor Cat. No. 637301) 10ml 1% I-blok hazırlanarak, 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. 1 saat sonra I-blok ile 3 kere 5'er dakika yıkama yapıldı. Yıkamaların ardından temizlenen membranlar sekonder antikor ile (SUMO-GP ve SUMOGP:SENp1 koekspresyonları için Anti-Mouse IgG 3 µl + 10 ml I-blok; SENp1 için Anti-rat IgG 3 µl + 10 ml I-blok) 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldı. İnkübasyonu tamamlayan membranlar 3 kere 5'er dakika I-blok ile ardından 1 kere 1X TBS ile yıkandı. Membranlar son olarak SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. Membran GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak ekspresyon görüntüsü alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. LP1 Plazmit İzolasyonu ve Enzim Kesimi ile Doğrulanması

Laboratuvarımızda bulunan LP1 plazmitine lıgaz edilmiş örnekler (LP1-SUMO GP, LP1-SEN P1), materyal metod kısmına detaylıca açıklandığı gibi ısı şoku yöntemiyle E.coli XL1Blue kompetent hücrelerine aktarıldı. İnkübasyonun ardından santrifüj edilen örnekler steril bir öze ile 50 µg/ml kanamisin içeren LB petriye yayıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra seçilen koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml sıvı LB besiyerine konularak 37°C'de 225 rpm'de tekrar bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Kit ile üreticinin protokolüne göre yapılan plazmit izolasyonundan sonra, izole edilmiş plazmitler XhoI ve AgeI enzimleri ile kesim için inkübe edildi ve 1xTAE tampon çözeltisi içinde %1 agaroz jele yüklendi. Elektroforez 110V'de 55 dakika çalıştırılarak genlerin yeri doğrulandı (Şekil 4.1.).

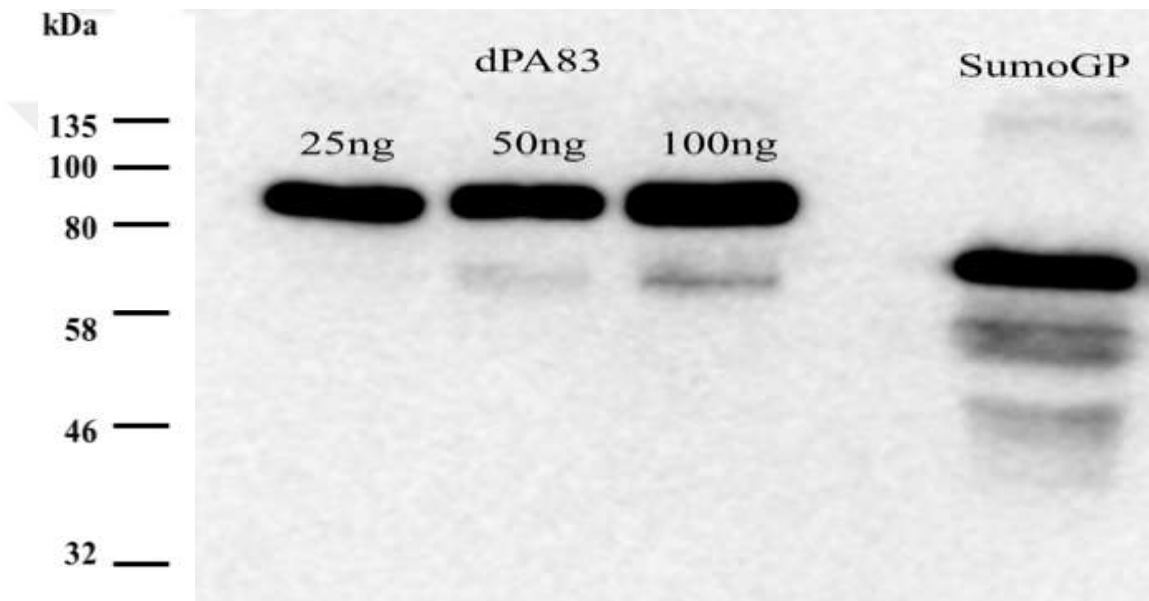


Şekil 4.1. LP1 plazmiti içine klonlanan SUMO GP ve SENP1 genlerinin AgeI ve XhoI enzimleri ile kesiminin elektroforez ile doğrulanması

LP-SumoGP plazmidinin AgeI ve Xho I restriksiyon enzimi ile ikili kesilmesinden sonra, klonlanmış SumoGP geninin büyüklüğünü doğrulayan boyutta 1677 bp (şekilde C1 ve C3 olarak etiketlenmiş) bant gözlemlendi. LP-SENP1 plazmidinin AgeI ve XhoI restriksiyon enzimi ile ikili kesilmesinden sonra, klonlanmış SENP1 geninin büyüklüğünü doğrulayan boyutta 843 bp (şekilde C1 ve C2 olarak etiketlenmiş) bant gözlemlendi. C3 koloni etiketine sahip SumoGP ve SENP1 agroinfiltrasyon transfer için kullanıldı.

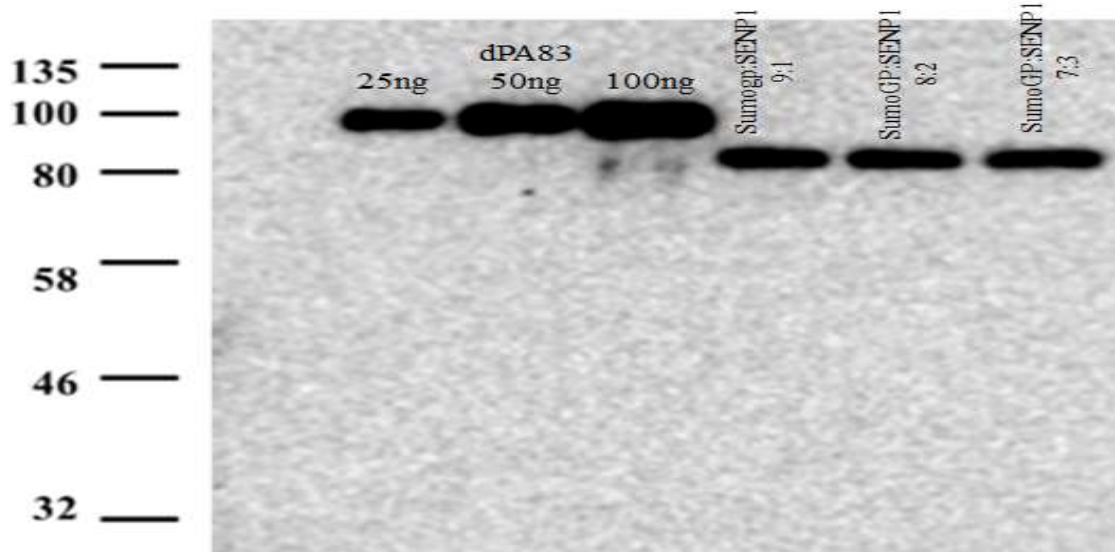
4.2. Westren Blot ile Ekspresyon Analizleri

Materyal ve metod bölümünde anlatıldığı gibi SUMOGP, SENP1 ve SUMOGP:SENP1 varyantlarının koekspresyonları enjektör kullanılarak *Nicotiana Benthamiana* bitkisine infiltrasyonu yapıldı. 24°C, %60 nem ve 18 saat ışıklı 6 saat ışıksız olacak şekilde iklimlendirme odasında yetiştirildi. Agroinfiltrasyondan 4 ve 5 gün sonra bitkiler hasat edildi ve materyal metod bölümünde anlatıldığı gibi manuel olarak ekstrakte edildi. Ekstrakte örnekler santrifüj sonrası supernatant ile laemmli buffer doğru oranlarda karıştırıldı. Poliakrilamid jele yüklenen örnekler yürütüldü ve blotlamanın ardından moleküllerin marker kullanılarak doğru yerde oldukları tespit edildi.

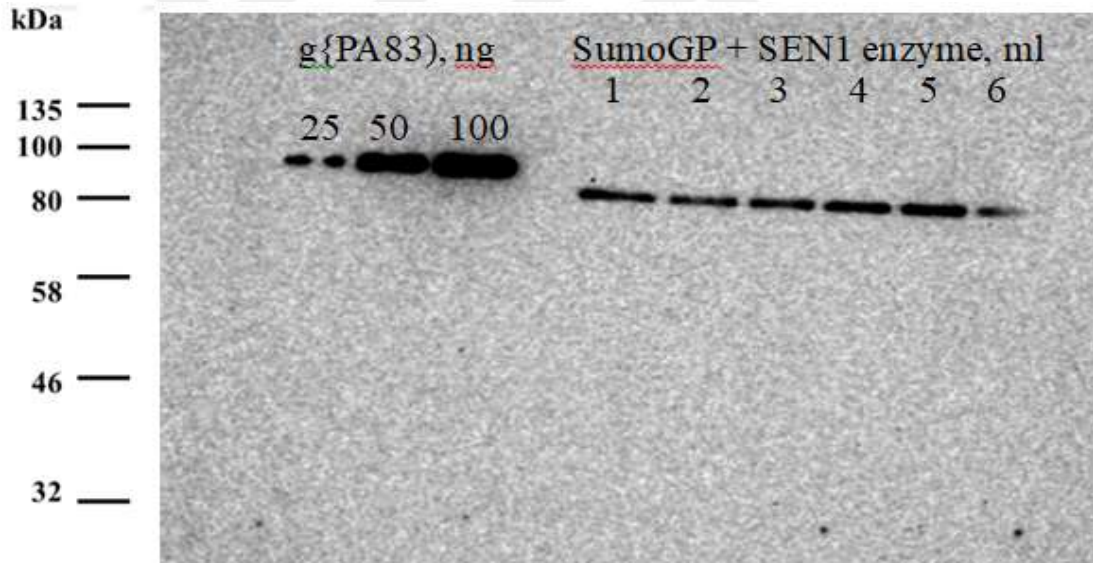


Şekil 4.2. *Nicotiana Benthamiana*'da üretilen rekombinant SumoGP varyantının ekspresyon analizi

AGL1psoup kompetent hücrelerine aktarılmış ve *Nicotiana benthamiana* bitkisine infiltre edilmiş SENP1 varyantı ekspresyonu ekip arkadaşlarımızdan birinin tez konusu olduğu için AGL1psoup SENP1 varyantına ait ekspresyon bulguları paylaşılmayacaktır. AGL1psoup SENP1 varyantı *Nicotiana Benthamiana* bitkisinde başarıyla üretilmiştir.



Şekil 4.3. *Nicotiana Benthamiana*'da üretilen rekombinant SumoGP:SEN1 varyantları farklı konsantrasyondaki koekspresyonları analizi



Şekil 4.4. *Nicotiana Benthamiana*'da üretilen rekombinant SumoGP:SEN1 varyantlarının farklı konsantrasyondaki invitro koekspresyon analizi

5. SONUÇLAR

Kuduz, kuduz virüsünün neden olduğu en yaygın onuncu ölümcül enfeksiyon hastalığıdır. Hastalık evcil ve vahşi hayvanlar aracılığıyla yayılır. Kuduz, tedavi edilmezse % 100 ölümcüldür ve başta gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklar olmak üzere yılda 60.000'den fazla ölüm vakası oluşturmaktadır. Kuduz virüsü, nükleoprotein (N olarak tasarlanmış), fosfoprotein (P), matris proteini (M), RNA'ya bağlı RNA polimeraz (L) ve glikoprotein (G) kodlayan tek sarmallı, negatif-sense RNA genomundan oluşur. G proteini, kuduzu virüs nötralize eden antikorları indükleyebilen ve intraserebral zorlanmaya karşı koruma sağlayan en büyük antijendir. Bununla birlikte, kuduzlara karşı insan ve hayvan aşıları mevcut olmasına rağmen, bunlar pahalıdır, üretimleri zahmetlidir ve nispeten zayıf bir immünojeniteye sahiptirler. Bu nedenle, büyük miktarda üretililecek, daha immünojenik, daha ucuz ve güvenli kuduz aşılara acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Halbuki, rabiesvirüsün zoonotik ve tehlikeli karakteri göz önüne alındığında, şu anda Türkiye'de kuduz aşılarının üretimi yoktur ve ülkemiz, ciddi, bildirilebilir bir hastalığın kontrolü için ithalata bağımlıdır. Türkiye'de yerli üretime yönelik düşük maliyetli, güvenli ve yüksek düzeyde immünojenik yeni nesil kuduz aşılarının geliştirilmesi büyük ihtiyaç ve başarı umududur.

Günümüzde, çeşitli ifade sistemleri, bakteri, maya, memeli ve böcek hücreleri kültürleri geliştirilmiş ve protein bazlı yeni nesil altbirimler aşıları olarak adlandırılan çeşitli aşı tiplerini ifade etmek için yaygın şekilde kullanılmıştır. Son yıllardaki çok sayıda çalışma, bitkiye dayalı geçici sentezleme sisteminin yüksek ekspresyonlara sahip olduğunu göstermiştir. Bu sistemler, hızlı üretim zaman çizelgesi, düşük maliyetli girdi, yüksek düzeyde ölçeklenebilir, yüksek üretim kapasitesi ve memeli patojenlerini barındırmayan diğer ifade sistemlerine göre üstün faydalar sunar. Bu çalışmada, G proteinine dayalı aşı adayı, transgenik ekspresyonunla karşılaştırılan bir takım avantajlara sahip olan bitki geçici ekspresyon teknolojisi kullanılarak üretilmektedir. Amacımız, insan kullanımı için uzun vadeli istikrar özelliği ile güvenli, düşük maliyetli ve yüksek immünojenik kuduz aşısı geliştirmektir.

Protein translasyon sonrası modifikasyonları (PTM'ler) fosforilasyon, glikosilasyon, asetilasyon, ubikuitinasyon, SUMOlasyon ve diğerlerini içerir. SUMOlasyon, küçük ubikuitin benzeri değiştirici (small ubiquitin-related modifier, SUMO) protein ailesinin bir üyesinin hedef proteinlerdeki lizin (Lys) kalıntılarına konjuge edildiği PTM'lerden biridir. SUMOlasyon modifikasyonu, değiştirilmiş proteinlerin sentrin/SUMO-spesifik proteazlar (SENp'ler) tarafından deSUMOlasyona tabi tutulabildiği, tersine çevrilebilir ve dinamik bir süreçtir.

Bir partner proteinin N-terminaline oldukça stabil bir yapının (ubikitin veya SUMO gibi) eklenmesi, stabiliteyi artırarak verimi artırır. İlgilenilen proteinlerle kaynaşmış SUMO, proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olarak ekspresyonu önemli ölçüde geliştirir ve çözünürlüğü destekler. Fonksiyonel ve yapısal çalışmalar için membran proteinlerinin ekspresyonu ve saflaştırılması için koşulların optimize edilmesi zahmetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu aynı zamanda verimli bir ifade ve saflaştırma işlemi gerektirir. Bu süreç füzyon teknolojisi kullanılarak hızlandırılabilir.

Yürütülen tez çalışması kapsamında bir protein translasyon sonrası modifikasyonuna ait Sumo proteini bitki geçici ekspresyon sisteminde ifade edilmesi için

başarıyla dizayn edildiği gösterilmiştir. Agroinfiltrasyon kullanılarak *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde kısa sürede (5 dpi) kuduz virüsüne ait glikoprotein (GP) ile Sumo proteini füzyon olarak başarılı şekilde üretilmiştir.

SumoGP füzyon proteinin ayrımı için bitki geçici ekspresyon sisteminde ifade edilecek şekilde tasarlanmış Sumo'ya özgü proteaz SENP1 *Nicotiana benthamiana* bitkisinde kısa sürede (4 dpi), yüksek saflıkta başarıyla üretilmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda Sumo'ya özgü proteaz SENP1'in SumoGP füzyon proteinini ayırdığı söylemek zordur. Burada SENP1'in aktifliği veya Sumo-SENP ilişkisinde spesifik detaylar etkili olabilir. Daha kesin bilgiler için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

İlerleyen aşamalarda yüksek saflıkta, biyolojik olarak aktif ve yüksek afiniteli güçlü bir altbirim rekombinant aşı adayı olacak protein, antijen, antikor ve rekombinant enzimlerin üretimi hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ashraf S., Singh P. K., Yadav D. K., Mishra S., Sawant S V., Tuli R. 2005. *High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. Journal of Biotechnology*, 119, 1–14.
- Assenberga R., Delmas O., Morinc B., Grahama S.C., Lamballerie X.D., Laubert C., Coutardc B., Grimes J.M., Neyts J., Owens R.J. 2010. *Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. Antiviral Research*, 87, 149, 161.
- Ay U., Şen M., Akbayır E., Tüzün E., Küçükali İ. C. 2017. *NF-κB, SUMO ve Ubikitinasyon İlişkisi. Deneysel Tıp Dergisi*, 7, 13, 35-46.
- Ay U., Şen M., Akbayır E., Tüzün E., Küçükali İ. C. 2017. *Nörodejeneratif Hastalıklar ve SUMO. Deneysel Tıp Dergisi*, 7, 13, 59-70.
- Du J., Rietman H., Vleeshouwers V. G. A. A. 2014. *Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and Nicotiana benthamiana. Journal of Visualized Experiments*, (83).
- Dietzschold B., Schnell M., Koprowski H. 2005. *Pathogenesis of Rabies. Springer-Verlag* 292:45–56.
- Fabera M., Lia J., Keanb B.R., Hooperb D.C., Alugupallia K.R., Dietzscholda B. 2009. *Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virüs. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11300–11305.
- Gareau R. J. and Lima D. C. *The SUMO Pathway: Emerging Mechanisms That Shape Specificity, Conjugation And Recognition. 2010. Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 11, 861-871.
- Guo C. and Henley M. J. 2014. *Wrestling with Stress: Roles of Protein SUMOylation and deSUMOylation in Cell Stress Response. IUBMB Life*, 66(2):71–77.
- Guo D., Li M., Zhang Y., Yang P., Eckenrode S., Hopkins D., Zheng W., Purohit S., Podolsky R.H., Muir A. vd. 2004. *A functional variant of SUMO4, a new IκBα modifier, is associated with type 1 diabetes. . Nature Publishing Group* 36, 8.
- Gürbüzaslan İ. 2021. *Endo H İle Deglikozile Edilmiş Pa83 Ve Pa83 Antijenlerinin Farklı Varyantlarının Anti-Pa83 Monoklonal Antikorları İle Bağlanma Afinite Çalışmaları. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.*
- Hazar S., Yarkın F., Akan E. 2000. *Kuduz ve Önemi. Flora*, 5(3):159-167.
- Hickey M.C., Wilson N.R., Hochstrasser M. 2012. *Function and regulation of SUMO proteases. Nature Reviews*, 755,766.
- Hooper C. D., Roy A., Barkhouse A. D., Li J., Kean B. R. 2011. *Rabies Virus Clearance from the Central Nervous System. Advances in Virus Research*, 79.
- Islam M.R., Choi S., Muthamilselvan T., Shin K. Hwang I. 2020. *In Vivo Removal of N-Terminal Fusion Domains From Recombinant Target Proteins Produced in Nicotiana benthamiana. Front. Plant Sci.* 11:440.
- Jackson C. A. 2000. *Rabies. Can. J. Neurol. Sci.*, 27: 278-283.

- Kelly R. M. and Strick P. L. 2000. *Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. J. Neurosci. Methods* 103, 63–71.
- Komender D. and Swatek N. K. 2016. *Ubiquitin Modifications. Nature Cell Research*, 26, 399-422.
- Koprowski H. and Black J. 1954. *Studies on chick-embryo-adapted rabies virus. V. Protection of animals with antiserum and living attenuated virus after exposure to street strain of rabies virus. J. Immunology*, 72(1):85–93.
- Lafon, M. 2005. *Rabies virus receptors. J. Neurovirol.* 11, 82–87.
- Liu L., Zhang Y., Tang S., Zhao Q., Zhang Z., Zhang H., Dong L., Guo H., Xie Q. 2010. *An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in Nicotiana benthamiana. The Plant J.* 61;5, 893-903.
- Malgaroli A., Vallar L., Zimarino V. 2005. *Protein homeostasis in neurons and its pathological alterations. Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 270–274.
- Mamedov T. and Yusibov V. 2013. *In vivo deglycosylation of recombinant proteins in plants by co-expression with bacterial PNGase F. Bioengineered*, 4(5), 338–342.
- Mamedov T., Chichester A. J., Jones M. R., Ghosh A., Coffin V. M., Herschbach K., Prokhnevsky I. A., Streatfield J. S., Yusibov V. 2016. *Production of Functionally Active and Immunogenic Non-Glycosylated Protective Antigen from Bacillus anthracis in Nicotiana benthamiana by Co-Expression with PeptideN-Glycosidase F (PNGaseF) of Flavobacterium meningosepticum. Journal pone*, 21, 1-17.
- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R., Hasanova, G. 2017. *In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in Nicotiana benthamiana plants by coexpression with Endo- β -N acetylglucosaminidase H (Endo H) of Streptomyces plicatus. PLoS One*, 12, e0183589.
- Mamedov T., Musayeva I., Acsora R., Gun N., Gulec B., Mammadova G., Cicek K., Hasanova G. 2019. *Engineering, and production of functionally active human Furin in N. benthamiana plant: In vivo post-translational processing of target proteins by Furin in plants. Journal Pone*, 03;12, 1-18.
- Mamedov T., Gulec B., Mammadova G. 2020. *Plant molecular pharming is a promising system for cost-effective production of veterinary vaccines. Mediterranean Agricultural Sciences.* 33(3): 375-380.
- Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. 2004. *In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by Agrobacterium. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:6852–6857.
- Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. 2005. *Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. Nat. Biotechnology*, 23:718–723.

- Morimoto K., Hooper D. C., Spitsin S., Koprowski H., Dietzschold B. 1999. *Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. Journal of Virology*, 73:510–518.
- Mukhopadhyay D. Dasso M. 2007. *Modification in reverse: the SUMO proteases. Trends in Biochemical Sciences*, Vol.32 No.6 .
- Preuss A. M., Faber M. L., Tan S. G., Bette M., Dietzschold B., Weihe E., Schnell J. M. 2009. *Intravenous inoculation of a bat-associated rabies virus causes lethal encephalopathy in mice through invasion of the brain via neurosecretory hypothalamic fibers. PLoS Pathog.*, 5(6): e1000485.
- Schnell J. M., McGettigan P. J., Wirblich C., Papaneri A. 2010. *The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. Nature Reviews Microbiology*, 8, 51-61.
- Sheludko Y. V., Sindarovska Y. R., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Kuchuk N. V. 2006. *Comparison of several Nicotiana species as hosts for high-scale Agrobacterium-mediated transient expression. Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 608–614.
- Singh A., Yadav D., Rai K.M., Srivastava M., Verma P.C., Singh P. K., Tuli R. 2012. *Enhanced Expression of Rabies Virus Surface G-Protein in Escherichia coli using SUMO Fusion. Protein J.*, 31:68–74.
- Tatan Y., Oğuzoğlu Ç. T. 2018. *Kuduz Enfeksiyonunun Moleküler Evrimi, Çeşitliliği ve Coğrafik Dağılımı. Etlik Vet. Mikrobiyol Derg.*, 29 (1): 82-86.
- Verma R, Khanna P, Prinja S, Rajput M. 2011. *Intra-dermal administration of rabies vaccines in developing countries: at an affordable cost. Hum. Vaccin.*, 7:792–4.
- Weant A. K., Baker N. S. 2013. *Review of Human Rabies Prophylaxis and Treatment. Crit Care Nurs. Clin. N. Am.*, 25, 225–242. Wilkinson A.K., Henley M. J. 2010. *Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. Biochem. J.*, 428, 133–145.
- Yang Y., He Y., Wang X., Liang Z., He G., Zhang P., Zhu H., Xu N., Liang S. 2017. *Protein SUMOylation modification and its associations with disease. Open Biology*, 7: 170167.
- Zuo X., Li S., Hall J., Mattern MR., Tran H., Shoo J., Tan R., Weiss SR., Butt T.R. 2005. *Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in Escherichia Coli. J. Struct. Func. Genomics*, 6:103–111.

ÖZGEÇMİŞ

Öznur ÜLGEN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ:

Yüksek lisans 2019 – 2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2015 – 2019	Demiroğlu Bilim Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul