

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE G PROTEİN VARYANTLARININ
MÜHENDİSLİĞİ, ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE HAYVANLARDA
İMMÜNOJENİSİTE ÇALIŞMALARI

Gulshan MAMMADOVA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

OCAK 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE G PROTEİN VARYANTLARININ
MÜHENDİSLİĞİ, ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE HAYVANLARDA
İMMÜNOJENİSİTE ÇALIŞMALARI

Gulshan MAMMADOVA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nicotiana benthamiana BİTKİSİNDE G PROTEİN VARYANTLARININ
MÜHENDİSLİĞİ, ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE HAYVANLARDA
İMMÜNOJENİSİTE ÇALIŞMALARI

Gulshan MAMMADOVA
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Tübitak projesi 218S723 tarafından desteklenmiştir.

OCAK 2022

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

***Nicotiana benthamiana* BİTKİSİNDE G PROTEİN VARYANTLARININ
MÜHENDİSLİĞİ, ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE HAYVANLARDA
İMMÜNOJENİSİTE ÇALIŞMALARI**

Gulshan MAMMADOVA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez jüri tarafından 07.01.2022 tarihinde oybirliği ile kabul edildi.

Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Doç. Dr. Hasan PINAR

ÖZET

***Nicotiana benthamiana* bitkisinde G protein varyantlarının mühendisliği, üretimi, karakterizasyonu ve hayvanlarda immünojenisite çalışmaları**

Gulshan Mammadova

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Ocak 2022; 51 sayfa

Kuduz, merkezi sinir sistemini etkileyen ve nihayetinde beyin hastalığına ve ölüme yol açan kuduz virüsünün (Lyssavirus) neden olduğu viral bir hastalıktır. Kuduz genellikle evcil köpekler ve vahşi etçil hayvanlar arasında genellikle ısırık yoluyla bulaşır. Kuduz virüsü (RABV), merkezi sinir sistemini enfekte ederek beyinde hastalığa ve ölüme neden olmaktadır. Kuduz hastalığı tedavi edilmezse %100 ölümcüldür ve sonuçta dünya çapında, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklar arasında yılda 70.000'den fazla ölüme neden olmaktadır. Kuduz aşısı ile önlenir. Kuduz karşı birkaç insan ve hayvan aşısı mevcut olmasına rağmen, bunlar yüksek maliyetli ve nispeten düşük immünojenliğe sahip ve ayrıca üretilmesi de zordur. Bu nedenle, büyük miktarlarda üretilebilen daha ucuz, daha immünojenik ve güvenli kuduz aşılara acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Geçici bitki ekspresyon sistemi, aşılarda, antikorlar, memeli kompleks proteinleri dahil terapötik proteinler gibi çok çeşitli rekombinant proteinlerin ekspresyonu için daha çekici ve umut verici bir platform haline geliştirildi. Bu çalışmada, *Nicotiana benthamiana* bitkisinde ilk kez geçici ekspresyon sistemini kullanarak kuduz virüsünün kesilmiş bir glikoprotein (G proteini) varyantlarının monomerik (RG2) ve trimerik (RG3) formalarını tasarladık ve üretildi. Bitki tarafından üretilen RG2 ve RG3 proteinleri, Ni-NTA kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. RG2 proteinin saflaştırma verimi ~32, RG3 proteinin saflaştırma verimi ise ~ 20 mg/kg bitki yaprağı olmuştur. İmmünojenisite çalışmalarının sonuçları, bitkinin G-protein varyantlarının üretildiğini, farelerde önemli ölçüde yüksek antikor titrelerini ortaya çıkardığını gösterdi. 5 µg RG3 ile aşılanan fareler, aynı miktarda RG2 protein ile aşılanan ile karşılaştırıldığında daha yüksek titreli antikor ortaya çıkardı. Bitki tarafından üretilen G-protein varyantları, uygun maliyetli, güvenli ve yüksek oranda immünojenik bir kuduz aşısı aday olabilecektir.

ANAHTAR KELİMELELER: Alt birim aşısı, G proteini, kuduz virüsü, rekombinant bitki geçici ifade sistemi

JÜRİ: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Doç. Dr. Hasan PINAR

ABSTRACT

Engineering, production, characterization of G protein variants in *Nicotiana benthamiana* and animal immunogenicity studies

Gulshan Mammadova

PhD Thesis, Department of Biotechnology

Adviser: Prof. Dr. Nedim MUTLU

January 2022; 51 pages

Rabies is a viral disease caused by the rabies virus (Lyssavirus) that affects the central nervous system, ultimately leading to death and brain defects. Rabies usually transmitted through a bite among domestic dogs and wild carnivorous animals. The rabies virus (RABV) infects the central nervous system causing disease in the brain and death. Rabies is 100% fatal if untreated and ultimately causing more than 70,000 deaths annually worldwide, especially among children in developing countries. Rabies can be prevented by vaccination and can be cured immediately after infection. Although several human and animal vaccines against rabies are available, they are expensive, have relatively low immunogenicity and also difficult to produce. Therefore, less expensive, more immunogenic and safe rabies vaccines that can be produced in the large quantities are urgently needed. The transient plant expression system has become a more attractive and promising platform for the expression of a wide range of recombinant proteins such as vaccines, antibodies, therapeutic proteins, including mammalian complex proteins. In this study, we engineered and produced truncated forms of glycoprotein (G protein) variants, namely RG2 (monomeric) and RG3 (trimeric) of rabies virus in *Nicotiana benthamiana* plant for the first time, using transient expression system. Plant produced RG2 and RG proteins were purified through Ni-NTA column chromatography. The purification yields of RG2 was about ~32, the purification yield of RG3 was ~20 mg/ kg plant leaf. The results of immunogenicity studies showed that the plant produced G-protein variants elicited significantly high antibody titers in mice. Mice immunized with 5 µg of RG3 elicited higher titer antibody compared to that of RG2 immunized with the same amount of protein. Plant-produced G-protein variants could be a cost-effective, safe and highly immunogenic rabies vaccine candidate.

KEYWORDS: G protein, plant transient expression system, Rabies virus, subunits vaccine

COMMITTEE: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Assoc. Prof. Dr. Hasan PINAR

ÖNSÖZ

Her Őeyden önce, danıŐmanım Prof. Dr. NEDİM MUTLU'ya tez danıŐmanım olduğu için, değerli tecrübeleriyle bana rehberlik ettiği için, tezim boyunca tavsiyeleri ve bilgisi ile bana destek olduğu için Őükranlarımı sunarım.

Her zaman yanımda olan aileme özellikle de sevgili oĐluma teŐekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Kuduz.....	4
2.2. Kuduz aşılırları.....	4
2.3. Bitkilerde Ekspresyon Stratejileri.....	5
2.3.1. Parçacık bombardımanı.....	6
2.3.2. Agroinfiltrasyon.....	7
2.4. N-bağlı glikosilasyon ve deglikosilasyon.....	8
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Tamponlar ve Süspansiyonlar.....	10
3.1.1. Western blot ve SDS –PAGE tamponları.....	10
3.1.2. Bakteri Büyümleri ve Ortamları.....	11
3.1.3. Protein Saflaştırma (His-tag) Tamponları.....	11
3.1.4. Elisa Tamponları.....	12
3.2. G proteininin farklı varyantlarının mühendisliğı, optimizasyonu ve klonlanması... 12	
3.3. Klonlanmış G protein genleri içeren bitki ifade plazmidlerinin <i>Agrobacterium tumafaciens</i> 'e transformasyonu.....	13
3.4. <i>N. Benthamiana</i> 'da bitki bazlı rekombinant G protein varyantlarının ekspresyon tayini.....	14
3.5. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi.....	15
3.6. RG2'nin PNGase F ve Endo H ile birlikte ifade edilmesi.....	16
3.7. <i>N. Benthamiana</i> bitkisinden üretilen RG2 ve RG3 proteininin saflaştırılması.....	16
3.8. Farelerde bitki tarafından üretilen RG2 ve RG3 proteininin immünojenisite çalışmaları.....	16
3.9. Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA).....	17

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1. G proteininin farklı varyantlarının mühendisliği, optimizasyon ve klonlanması.....	19
4.2. <i>N. Benthamiana</i> bitkilerinde RG2'nin ifade edilmesi ve ekspresyon tayini	21
4.3. <i>N. Benthamiana</i> bitkisinde deglikosile RG2 protein formlarının üretimi	22
4.4. <i>N. Benthamiana</i> bitkilerinden rekombinant RG2'nin saflaştırılması.....	23
4.5. <i>N. Benthamiana</i> bitkilerinde RG3'nin ekspresyonu ve ekspresyon onayı.....	24
4.6. <i>N. Benthamiana</i> bitkilerinden rekombinant RG3 proteininin saflaştırılması.....	25
4.7. RG2 ve RG3 proteininin bitki infiltrasyonu, saflaştırılması ve protein miktar belirlemesi	26
4.8. RG2 proteininin farelerde immunojenisite çalışmaları	26
4.9. RG3 proteininin farelerde immunojenisite çalışmaları	28
5. SONUÇLAR	29
6. KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “*Nicotiana benthamiana* bitkisinde G protein varyantlarının mühendisliği, üretimi, karakterizasyonu ve hayvanlarda immünojenisite çalışmaları” adlı bu çalışmanın akademik kurallar ve etik değerler çerçevesinde kaleme alınmış olduğunu beyan ederim. Bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını bu tezde belirttim.

Gulshan Mammadova

07/01/2022



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Derece santigrat

g : Gram

kDa : Kilodalton

kg : Kilogram

l : Litre

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolar

M : Molar

nm : Nanometre

Kısaltmalar

CV	: Kolon hacmi
dpi	: İnfiltrasyon sonrası geçen gün
ELISA	: Enzim bağılı immünosorbent deneyi
G protein	: Kuduz virüsü (RABV) glikoproteini
L	: RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi (L)
M	: Matris proteini
N	: Nükleoprotein
O.D.	: Optik Dansite
P	: Fosfoprotein
pH	: Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi
RABV	: Kuduz virüsü
RG1	: Kuduz G proteininin tam uzunlukta dizisi
RG2	: G proteini varyantının kesilmiş monomerik formu
RG3	: G proteini varyantının kesilmiş trimerik formu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kuduz hastalığına neden olan Rhabdoviridae ailesi Lyssavirus genusunda yer alan zarflı bir RNA virüsünün şematik temsili.	1
Şekil 1.2. Kuduz virüsünü genomunun yapısı.	2
Şekil 3.1. Gene Pulser Xcell modül elektroporasyon sistemleri, ana bölmeyi, iki aksesuar modülünü ve ShockPod™ kuvvet kamerasını içerir.	13
Şekil 3.2. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitki yapraklarına infiltrasyon yapılması	14
Şekil 3.3. Geleneksel Western Blot'un genel anlatımı.	16
Şekil 3.4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) procedurunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 4.1. G protein antijen yapılarının (plazmidler) şematik gösterimi.....	19
Şekil 4.2. Tam uzunlukta G protein geninin (RG1) klonlanması.	20
Şekil 4.3. RG2 geninin klonlanması.	20
Şekil 4.4. RG3 geninin klonlanması.	21
Şekil 4.5. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerinde üretilen RG1 ve RG2'nin Western blot analizi.	22
Şekil 4.6. RG2 proteininin PNGaz F (dP) veya Endo H (dE) deglikosile edici enzimlerle birlikte ifadesinin Western blot analizi.	23
Şekil 4.7. Bitkide üretilmiş RG2 proteininin HisPur™ Ni-NTA Reçine kolonu ile <i>N.benthamiana</i> yapraklarından saflaştırılması.	24
Şekil 4.8. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerinde üretilen RG3 proteininin Western blot analizi.	25
Şekil 4.9. Kısmen saflaştırılmış RG3'ün western blot analizi.	25
Şekil 4.10. Ni-kolon kullanılarak 50-gram <i>N. Benthamiana</i> yaprağından saflaştırılmış RG2 ve RG3 proteinlerinin Western blot analizi.	26
Şekil 4.11. Farelerde bitkide üretilen RG2 antijeninin immünojenite çalışması.	27
Şekil 4.12. Bir adjuvan olarak Alhydrogel kullanılarak bitki tarafından üretilen RG3 proteini ile immunize edilen farelerde ortaya çıkan IgG tepkileri.	28

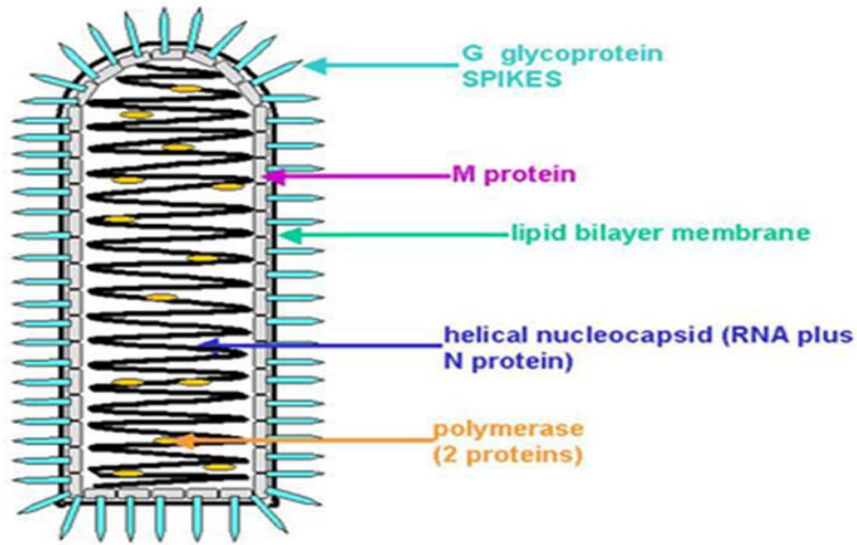
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. %10 jel hazırlama bileşikleri.	11
--	----



1. GİRİŞ

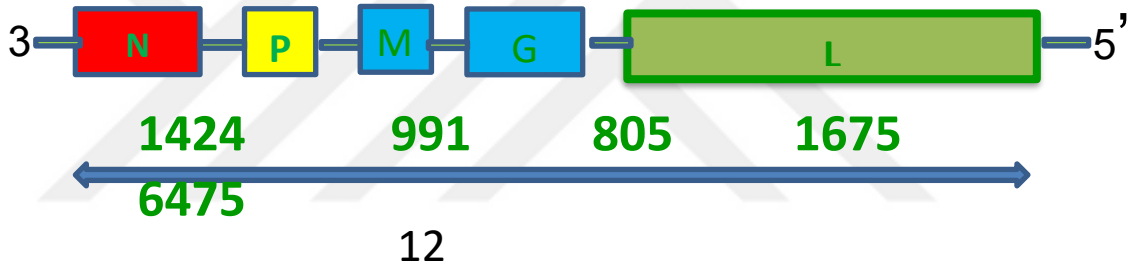
Kuduz Rhabdoviridae ailesi Lyssavirus genusunda yer alır zarflı bir RNA 11dukça 1n neden 11dukç bir hastalıktır. Kuduz Asya, Afrika, Kuzey ve Güney Amerika ve bazı Avrupa ülkeleri dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde yaygındır. Gelişmiş ülkelerde bulaşıcı Kuduz virüsünün (RABV) yanı sıra diğer lyssavirüslerin enfekte hayvanların ısırması yoluyla bulaştığı iyi bilinmektedir. Kuduz, yaklaşık 100 ülkede görülen ve insanlar dahil birçok memeliyi etkileyen viral bir zoonozdur (Dietzschold vd.2005). Köpekler, insan enfeksiyonlarının ana kaynağıdır (%99) ve 3,3 milyondan fazla insanı etkiler (Knobel vd. 2005). Kuduz tedavi edilmezse %100 ölümcüldür, her yıl yaklaşık 70.000 kişiyi öldürür, özellikle Asya ve Afrika ülkelerinin kırsal bölgelerindeki çocuklar arasında. Kuduz virüsü ile enfeksiyon, ciddi nöronal disfonksiyona yol açar (Fletcher vd. 1998; Gillet vd. 1986; Dhingra vd. 2007; Davis vd. 2015). Kuduz aşısı ile önlenebilir ve enfeksiyondan hemen sonra aşısı uygulanması konusunda 11dukça başarılıdır. Bununla birlikte, klinik semptomlar ortaya çıktıktan sonra çoğu hasta enfeksiyondan ölmektedir (Davis vd. 2015). Temel olarak kuduz hastalığının önlenmesi iki ana strateji ile gerçekleştirilebilir. İlk strateji, maruziyetten önce veya hemen sonra uygulandığı insan aşısıdır. İkinci strateji, insan vakalarının %99'undan köpekler sorumlu olduğu için virüsün insanlara bulaşmasını önleyebilen köpeklerin aşılanmasıdır. (<https://www.who.int/activities/human-rabies-prevention-and-management>).



Şekil 1.1. Kuduz hastalığına neden olan Rhabdoviridae ailesi Lyssavirus genusunda yer alan zarflı bir RNA virüsünün şematik temsili

İnsan kullanımı için mevcut kuduz insan diploid hücre aşısı, 1967'den beri kullanımda olan inaktiftipte bir aşısıdır ve Pitman-Moore virüsü suşu L503'ten türetilen atenüe tip bir aşısıdır (Fletcher vd. 1998). Ayrıca saflaştırılmış Vero hücreli ve tavuk embriyo hücreli kuduz aşısı da artık insan kullanımına sunulmuştur. Özellikle, 1960'larda ve 1970'lerde Wistar'ın araştırmacıları tarafından geliştirilen saflaştırılmış Vero hücreli kuduz aşısı, RABV'nin zayıflatılmış Wistar suşunu kullanır. Bu aşısı,

dünya çapında maruziyet öncesi ve sonrası profilaksi için milyonlarca insan tarafından kullanılmaktadır. Kayda değer, inaktive ve atenüe aşular, canlı virüslerden hazırlandıkları için güvenlik endişelerine sahiptir. Farklı üretim teknolojileri ile üretilmiş nispeten güvenli başka aşular da vardır, özellikle hayvan hücresinden üretilen aşular mevcuttur. Bununla birlikte, kültürlenmiş hayvan hücrelerinde aşı üretimi maliyeti ve üretilmesi zordur (Dhankhar vd. 2008; Freuling vd. 2008). Kuduz virüsünün tek sarmallı bir RNA genomu, glikoprotein (G), fosfoprotein (P), nükleoprotein (N), matris proteini (M) ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi (L) dahil olmak üzere beş tane viralyapısal proteini kodlar (Macfarlan vd. 1986). RABV'nin ana antijeni olan glikoprotein G'nin koruyucu bağışıklığı indükleyebildiği gösterilmiştir (Schnell vd. 2010). Virüs nötralize edici antikorlar için ana hedef olarak gösterilen RABV'nin Glikoprotein G'si, RABV'nin yüzeyinde homotrimerler formunu birleştirir ve bağışıklık tepkisini ortaya çıkarır (Gaudin vd. 1992). Bu nedenle, çalışılan rekombinant aşı adaylarının çoğu RABV G proteinine dayanmaktadır. RABV'nin rekombinant G proteini, farklı protein ekspresyon sistemleri (Prehaud vd. 1989; Ashraf vd. 2005; Yokomizo vd. 2007; Ramya vd. 2011; Huang vd. 2011; Koraka vd. 2014) kullanılarak eksprese edilmiştir. G proteininin, tek bir aşı dozundan sonra bile kö'eklerde, kedilerde ve farelerde yüksek RABV'ye özgü virüs nötralize edici antikor titrelerini indüklemek için yeterli olduğu bildirilmiştir (Yang vd. 2014; Koraka vd. 2014).



Şekil 1.2. Kuduz virüsünü genomunun yapısı. Genom, N, P, M, G ve L olarak adlandırılan 5 proteini kodlar. N: nükleoprotein, P: fosfoprotein, M: matris proteini, G: glikoprotein, L: RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi

İnsanlar ve hayvanlar için şu anda mevcut olan kuduz aşuları virüsün etkin bir şekilde kontrol edilmesini sağlar, ancak bunlar ve bazılarının, özellikle de inaktive aşuların nispeten zayıf immünojenitesi vardır (McGettigan vd. 2014; Huang vd. 2015). Ek olarak, yeterli korumayı elde etmek için yüksek dozlarda antijen ve çoklu bağışıklamalara ihtiyaç vardır. Bu nedenle maliyeti ucuz, daha güvenli ve daha immünojenik kuduz aşularına acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Şu anda bakteri, maya, memeli gibi çeşitli ifade sistemleri geliştirilmiştir ve çeşitli rekombinant protein türlerinin ifade edilmesi için kullanılmaktadır. Bitki geçici gen ekspresyonu, özellikle eksprese edilmesi zor proteinlerin üretimi için alternatif bir ekspresyon sistemi haline gelmiştir (Klimyuk vd. 2014; Margolin vd. 2020a; Mamedov vd. 2019a, 2019b, 2021a, 2021b). Bu ekspresyon sistemi, diğer ekspresyon platformlarına göre çeşitli avantajlar sunar; örneğin, bitkiler ökaryotik PTM (post-translasyonel modifikasyon) mekanizmalarına ve yüksek üretim kapasitesine sahiptir. Bir haftadan kısa bir süre içinde, bir kilogram yaprak biyokütlesi başına yüzlerce miligram veya gram rekombinant protein birikir. Diğer avantajlar ise daha düşük maliyet, kolay ölçeklenebilirlik ve endojen insan patojenlerinin

olmaması nedeniyle güvenlidir. Bu teknolojinin karmaşık proteinlerin ekspresyonu için çok faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Aşı antijenleri, terapötik insan proteinleri ve enzimler gibi bitkilerde üretilen bazı farmasötikler, klinik geliştirme aşamalarına çoktan ulaşmıştır. Bu teknolojiyi kullanarak, sıtma (Mamedov vd. 2019b), şarbon (Mamedov vd. 2016; 2017) ve SARS-CoV-2 antijenleri (Mamedov vd. 2021a, 2021b; Siriwattananon vd. 2021) gibi bir dizi aşı adayını ile insan Faktör IX ve Furin gibi terapötik proteinler (Mamedov vd. 2019a) ve ayrıca bakteri ve insan enzimleri (Mamedov vd. 2019a) *N. Benthamiana* bitkisinde üretilmiştir. Son zamanlarda, bitki geçici ekspresyon sistemi kullanılarak, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı güçlü nötralize edici aktiviteye sahip RBD'ye özgü antikorların yüksek titresini indükleyen Reseptör Bağlanma Alanının (RBD) glikozillenmiş (gRBD) ve glikosillenmemiş (dRBD) varyantları, COVID-19'a karşı bir aşı adayını olarak *N. Benthamiana* bitkisinde başarıyla üretilmiş olur. Bu nedenle, bitki geçici ekspresyon platformu, kuduz karşı düşük maliyetli, güvenli, stabil ve yüksek immünojenik aşı üretimi için de ideal olacaktır. ERA kuduz virüsü G proteininin daha önce transgenik bitkilerde üretildiği (McGarvey vd. 1995; Loza-Rubio vd. 2012), ancak G proteininin ekspresyon seviyesinin çok düşük olduğu not edilmelidir. Aynı zamanda rekombinant G proteini transgenik mısırdaki da üretilmiştir (Loza-Rubio vd. 2012). Mısır bitkisinde oral bağışıklamadan sonra üretilen rekombinant kuduz virüsü G proteini koyunlarda koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkardı (Loza-Rubio vd. 2012).

Bu çalışmada, kuduz virüsüne karşı bir aşı adayını olarak G proteininin (RG2, monomerik) kesilmiş bir formu tasarlanmış ve geçici ifade teknolojisi kullanılarak *N. Benthamiana* bitkisinde ifade edilmiştir. İlave olarak, RG3 adı verilen G proteininin PR-1a sinyal sekansından sonra N-terminalinde yapay bir GCN4 bazlı trimerizasyon alanı olan 7-aa uzun bağlayıcı (LIGGGGI) ile G proteininin kesilmiş versiyonu da *N. Benthamiana* bitkisinde üretilmiştir. RG2 (monomerik) ve RG3 (trimerik) antijen varyantlarının *N. Benthamiana* bitkisinde ekspresyonu ve üretimi doğrulanır ve yüksek düzeyde hızla üretilebileceğini gösterilmektedir. Ayrıca farelerde yapılan immünojenite çalışmaları, RG2 ve RG3 proteinlerinin farelerde önemli ölçüde yüksek antikor titrelerini indüklediğini göstermiştir. Bu nedenle, bitki tarafından üretilen RG2 ve RG3 antijenleri, Kuduz virüsüne karşı uygun maliyetli ve güvenli alt birim aşı olarak geliştirilme potansiyeline sahiptir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kuduz

Kuduz Latince'de 'rabere' 'deli olmak' anlamına gelir. Hastalık, medeniyetin ortaya çıkışından beri bilinmektedir. Kuduzun ilk resmî belgeleri, MÖ. 23. Yüzyılda Babil'in mozaik öncesi Eshmuna kodunda ortaya çıkmasına karşın 1880'lerde hastalığın nedeni olarak bir virüsü tanımlayan kişi Louis Pasteur oldu. Kuduz aşularla önlenabilir bir viral zoonoz olmasına rağmen, gelişmekte olan ülkelerde hala önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. (Dietzschold vd. 2003; Kuzmin vd. 2005; Leung vd. 2007). Kapsamlı kontrol planları ve halk sağlığı bilinçlendirme programlarının küresel çapta geniş çaplı girişimlerine ve uygulanmasına rağmen, ölümlerin hala %95'inden fazlası, köpek kuduzunun enzootik olduğu Asya ve Afrika'da gerçekleşmektedir (WHO 2013). Hindistan'da her yıl kuduz köpek ısırması sonucu yaklaşık 20.000 insan ölümü meydana gelmektedir (Sudarshan vd. 2006). İnsanda kuduz, ileri tedavi önlemlerine rağmen her zaman ölümcül bir hastalık olarak ortaya çıkar. İnsanlardaki ölüm oranlarına göre kuduz, dünyada mevcut bulaşıcı hastalıklar arasında yedinci sırada yer almaktadır (Wyatt 2007).

2.2. Kuduz Aşuları

Kuduz, dünya çapında ciddi sağlık sorunlarına ve insanlarda ve hayvanlarda ciddi sinir hasarına neden olan zoonotik bir hastalıktır. Yukarıda bahsedildiği gibi, kuduz virüsü genomu, G proteini de dahil olmak üzere beş proteini kodlayan tek iplikli bir RNA'dan oluşur. G proteininin virüs nötralize edici antikoları indüklemeye ve intraserebral zorlamaya karşı koruma sağlamada önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. RABV glikoproteini bir trimerdir (Gaudin vd. 1992) ve homotrimer formunu virüsün veya enfekte olmuş hücrelerin yüzeyinde birleştirir. G glikoproteini, virüs nötralize edici antikoların bağlanması için bir hedef olarak gösterilmiştir ve bu nedenle virüsün başlıca antijenik belirleyicilerini barındırır. Bu nedenle, şimdiye kadar incelenen rekombinant aday aşuların çoğu RABV-G proteinine dayanmaktadır. Şu anda RABV'ye karşı hazırlanan aşuların çoğu hayvan hücrelerinde üretilmektedir (Starodubova vd. 2018; Rupprecht vd. 2016). Bununla birlikte, bu tür aşuların yüksek maliyet, ölçeklenebilirlik, güvenlik ve depolama ile bağlantılı birkaç dezavantajı vardır. Halihazırda, protein bazlı, yeni nesil alt ünite aşuları olarak adlandırılan çeşitli aşı tiplerini eksprese etmek için birkaç rekombinant ekspresyon sistemi geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Böcek hücresi bazlı sistemler de kuduz virüsünün G proteininin üretimi için kullanılmıştır (Prehaud vd. 1989; Ramya vd. 2009). Bakulovirüs ekspresyon sisteminde üretilen rekombinant G proteininin farelerde immünojenik olduğu gösterilmiştir. Sf9 hücrelerinden üretilmiş ve saflaştırılmış G proteini ile immünize edilmiş fare serumlarının, yüksek virüs nötralize edici antikor titrelerine sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak, rekombinant G proteini üreten Sf9 hücreleri, virulent intraserebral tehdit üzerine %100 koruma göstermiştir (Ramya vd. 2011). Rekombinant G proteininin üretimi için bir diğer ekspresyon sistemi olan maya ekspresyon sistemi kullanılmıştır, ancak muhtemelen maya hücreleri yüksek mannoz glikosilasyonuna sahip olduğu için bu sistem immünojenik G proteini üretimi için uygun görülmemiştir.

Kırk yıldan fazla bir süre önce geliştirilmelerinden bu yana, konsantre ve saflaştırılmış hücre kültürü (CCV) ve embriyonlu yumurta bazlı (EEV) kuduz aşularının (burada ortaklaşa CCEEV'ler olarak anılacaktır) kuduzun önlenmesinde güvenli ve etkili

aşı olarak kullanılmıştır. Bu aşular, temas etme profilaksinin yanı sıra temas sonrası profilaksi için de tasarlanmıştır ve dünya çapında milyonlarca insana uygulanmıştır. Özellikle Asya ve Latin Amerika'da, yüksek kuduz riski altındaki popülasyonlar, maruz kalma profilaksi için halen hayvan sinir dokularından elde edilen kuduz aşularına bağımlıdır. Sinir dokusu aşuları daha şiddetli advers reaksiyonlara neden olur ve CCEEV'lerden daha az immünojeniktir; bu nedenle üretimleri ve kullanımı DSÖ tarafından önerilmemektedir. Afrika ve Asya'da, maruziyet sonrası kuduz profilaksisi mevcut seviyesinde her yıl yaklaşık 272 000 ölümü önlemektedir (Knobel vd. 2005).

Hücre kültürü ve embriyonlu yumurta bazlı aşular uluslararası olarak mevcut olan CCEEV'ler, insan diploid hücreleri, fetal rhesus diploid hücreleri, Vero hücreleri (Afrika yeşil maymunundan böbrek hücreleri), birincil Suriye hamsteri böbrek hücreleri, civciv embriyo hücreleri veya embriyonlu ördek yumurtalarında birincil gibi hücre substratlarında üretilen kuduz virüsünden oluşur. (Plotkin vd. 2008). Civciv embriyo hücrelerine ve Vero hücrelerine dayanan daha yakın zamanda geliştirilen aşular, insan diploid hücre aşularınıninkiyle karşılaştırılabilir güvenlik ve etkinlik kayıtlarına sahiptir ve daha ucuzdur.

İlgili hücre kültürlerinde (veya embriyonik yumurta), viral hücreler konsantre edilir, saflaştırılır, inaktive edilir ve liyofilize edilir. Bazı CCEEV'ler, stabilizatör olarak insan albümini veya işlenmiş jelatin içerir. Kas içi enjeksiyon için çok dozlu flakonlarda kuduz aşısı sağlanmaz. DSÖ tarafından ön yeterlilik verilen kuduz aşuları, timerosal gibi koruyucu maddeler içermez. Bu aşuların raf ömrü +2°C ile +8°C arasında muhafaza edilmeleri ve güneş ışığından korunmaları şartıyla 3 yıldan fazladır. Birlikte verilen steril seyreltici ile sulandırıldıktan sonra, aşular hemen veya doğru sıcaklıkta tutulursa 6-8 saat içinde kullanılmalıdır. Tüm CELEB'ler, tek bir intramüsküler doz (aşı tipine bağlı olarak, sulandırıldıktan sonra 0,5 ml veya 1,0 ml hacim) başına WHO tarafından önerilen $\geq 2,5$ IU potens ile uyumlu olmalıdır.

Kuduz esas olarak bir hayvan hastalığıdır. Enfekte olmuş bir hayvanın ısırmasıyla insanlara kuduz bulaşır. Kuduz virüsü merkezi sinir sistemini enfekte eder ve sonuçta beyinde hastalığa ve ölüme neden olur. Enfeksiyon, çoğunlukla Asya ve Afrika'da her yıl on binlerce insanın ölümüne neden olur. İnsanlardaki kuduz vakalarının büyük çoğunluğunda kaynak kuduz köpeklerdir. Gelişmiş ülkelerde kuduz, enfeksiyonun evcil hayvanlara ve insanlara bulaşabileceği vahşi hayvanlarda bulunur (Rupprecht ve Gibbons, 2004; WHO 2005, 2013). Kuduz, memelilerde ölümcül ensefalite yol açan ve semptomları bir kez ortaya çıktığında tedavi edilemez ise ölümcül olan zoonotik bir hastalıktır (Chernet ve Nejash, 2016).

2.3. Bitkilerde Ekspresyon Stratejileri

Bitkilerde yabancı proteinlerin üretimi için farklı yaklaşımlar vardır. Nükleer veya plastid transformasyon ile geçici veya stabil olarak üretilebilirler. İfade sistemi, kallus, bütün bir bitki veya bir bitki hücresi süspansiyon kültürü olabilir. (Desai vd. 2010). Bitkiden türetilen terapötik proteinlerin çoğu, kararlı dönüştürülmüş transgenik bitkiler tarafından eksprese edilir ve nükleer transformasyon ile üretilir. Hedef gen, bitki genomuna entegre edilir ve genellikle *Agrobacterium tumefaciens* kullanılır. Bitki transformasyonunda, *Agrobacterium* bazlı transformasyon sisteminin basitliği ve ilgilenilen genin kesin transferi ve entegrasyonu, tek kopya yerleştirme ile stabil bir

transformasyon, oldukça düşük transgen susturma insidansı ve uzun T DNA uzantılarını (> 150 kb) transfer etme yeteneği gibi birçok benzersiz avantaj sunar (Veluthambi vd. 2003). *Agrobacterium* kullanarak dönüştürme neredeyse rutin bir süreç haline gelmiş olsa da üretim zaman ölçeği gibi büyük dezavantajları vardır. Bitkilerin eksprese edilen proteini test etmek için hazır olması için stabil bir transformasyon 3-9 ay sürebilir. Bu nedenle araştırmalar, geçici gen ekspresyonu gibi alternatif bitki bazlı üretim teknolojilerine yönelmiştir (Desai vd. 2010). Geçici ekspresyon hızlıdır ve protein ekspresyonu ile ilgili sonuçlar günler içinde elde edilebilir (Kapila vd. 1996). Bu nedenle, geçici ekspresyon sistemi, ekspresyon vektörlerini ve protein stabilitesini önceden test etmek ve büyük ölçekli transgenik bitkiler üretmeden önce gen ürününün fonksiyonunu doğrulamak için kullanılabilir (Yusibov ve Mamedov 2010). Bu kararlı transformasyon için temel bir gerekliliktir, ancak problemler bu sayede belirlenip ortadan kaldırılabilir ve stabil transformasyonlar için yatırımlar yapılmadan önce transgenik hat önemli ölçüde iyileştirilebilir (Kapila vd. 1996; Desai vd. 2010).

Bitkilerde geçici gen ekspresyonu için partikül bombardımanı ve Agroinfiltrasyon olmak üzere iki ana yaklaşım vardır. Dönüştürülen hücrelerin miktarı bu sistemler arasında değişir. Alt transformasyon seviyesine, sadece birkaç hücrenin etkilendiği ve DNA'nın çekirdeğe ulaşması gereken transkripsiyon için partikül bombardımanı ile ulaşılır (Christou, 1996). Agroinfiltrasyon, partikül bombardımanından daha fazla hücreyi hedefler ve ilgilenilen gen, bakteri proteinleri tarafından aktif olarak çekirdeğe aktarılır (Kapila vd. 1996). Whisker transformasyonu, elektroporasyon ve protoplast transformasyonu gibi diğer yöntemler şimdiye kadar moleküler tarım uygulamaları için kullanılmamıştır (Ma vd. 2003).

2.3.1. Parçacık bombardımanı

Parçacık bombardımanı, altın parçacıkları gibi mikro mermilerin ilgili DNA ile kaplandığı ve daha sonra bitki dokularına çarpmak ve doku hücrelerine girmek için hızlandırıldığı bir yöntemdir (Ma vd. 2003). Bu fiziksel yöntem, Bio-Rad Laboratories (Helenius vd. 2013) tarafından profesyonelleştirilmiş ve ticarileştirilmiş olan Helios™ Gen Gun Sistemi ile gerçekleştirilir. Partikül bombardımanı, agroinfiltrasyondan daha az genotip bağımlılığı gösterdiğinden, biyokütlenin çoğunluğunu üreten çiçekli bitkilerin büyük bir grubu olan monokotiledon olan tahıllar için tercih edilen dönüşüm yöntemi olabilir (Reed, 2008). *Agrobacterium* ile infiltrasyon yöntemi olan Agroinfiltrasyon çekirdeği hedef aldığından, DNA'nın kloroplast genomuna dahil edildiği transplastomik bitkilerin üretilmesi için partikül bombardımanı da gereklidir. Bu kloroplast transgenik sistemi, genellikle translasyon sonrası karmaşık modifikasyonlar gerektirmeyen heterolog proteinleri eksprese etmek için kullanılır. Avantajları, tek bir fotosentetik hücredeki birçok kloroplast nedeniyle yüksek bir transgen kopya sayısı, gen susturma olmaması, birden fazla genin eşzamanlı ifadesi ve çoğu mahsulün poleninde fonksiyonel kloroplast DNA'sının olmamasıdır. Bu, doğal transgeninkorunmasını sağlar (Daniel vd. 2009). Bununla birlikte, büyük bir dezavantajı ise ER'de bulunan önemli çeviri sonrası modifikasyonların (PTM) yapamamasıdır (Christou vd. 1996; Ma vd. 2003; Fischer vd. 2020; Desai vd. 2010).

2.3.2. Agroinfiltrasyon

Bitkilerde geçici gen ekspresyonu için kullanılan diğer ana yaklaşım, agroinfiltrasyondur. Tütün, bezelye veya patates gibi çift çenekli bitkilerin çoğunun dönüştürülmesi için hızlı ve kullanışlı bir yöntemdir. Agroinfiltrasyon, monokotiledonlu bitkiler için de kullanılabilir, ancak çoğu kısım için teknoloji, seçilen model çeşitleri için optimize edilmiştir (Ma vd. 2003). Birçok farklı heterolog protein, birçok bitki türü için zor olan transgenik bitkiler üretmeye gerek kalmadan üretilebilir (Fischer vd. 1999, 2004; Horn vd. 2004; Wydro vd. 2006). Agroinfiltrasyon genellikle proses geliştirmenin erken aşamalarında veya belirli bir gram miktarına hızla ihtiyaç duyulduğunda kullanılır. Bununla birlikte, onlarca miligram rekombinant protein üretecek kadar ölçeklenebilir ve hatta kararlı dönüştürülmüş bitkilerin üretimine gerek kalmadan klinik öncesi denemeler için uygun olduğunu kanıtlayabilir (Fischer ve Emans 2000). *Nicotiana benthamiana* bitkisi ile, vektör olarak tütün mozaik virüsü (TMV) kullanılarak yüksek verimli sistemler geliştirilmiştir (Gleba vd. 2004; Marillonnet vd. 2004; Spök ve Karner 2008). Ekspresyon vektörünü taşıyan toprak patojeni *Agrobacterium tumefaciens*, vakum infiltrasyonu ile yaprak dokusuna iletilir (Fischer ve Emans 2000). Bakteriyel proteinler, ilgilenilen genin konakçı hücrelere transferini katalize eder. İlgili proteinin bitki hücrelerinde varlığı infiltrasyondan üç gün sonra tespit edilebilir. Sızma için, ilgili gen uygun *Agrobacterium* suşlarına dönüştürülür ve bir bakteri süspansiyonu yoluyla yapraklara enjekte edilir (An, 1985; Kapila vd. 1996). Dönüşümden sonra aktarılan T-DNA, kopyalanıp ifade edilebileceği çekirdekte bulunur (Kapila vd. 1996; Fischer ve Emans 2000). Genel olarak, Agroinfiltrasyon, gen transferinin basitliği ve ilgili genin kesin transferi ve entegrasyonu gibi birçok avantaja sahiptir. Ayrıca Agroinfiltrasyon, düşük bir transgen süsturma insidansına sahiptir ve uzun T-DNA uzantılarını (> 150 kb) bile aktarabilir (Veluthambi vd. 2003).

Bitki bazlı geçici ekspresyon platformunun, kısa sürede çeşitli rekombinant farmasötik proteinlerin güvenli, hızlı ve düşük maliyetli üretimini sağladığı gösterilmiştir. Bu ekspresyon stratejisini kullanarak, insan Furin, Factor IX, *Bacillus anthracis*'in PA63'ünün heptamerize formu (Mamedov vd. 2019a) *Plasmodium falciparum*'un tam uzunluktaki Pfs48/45 proteini (Mamedov vd. 2019b), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi eksprese edilmesi zor bir dizi protein, gp140 (Margolin vd. 2020b), SARS-CoV-2 Spike proteininin reseptör bağlanma alanları (RBD) (Mamedov vd. 2021a, 2021b) ve fonksiyonel aktif monoklonal antikorlar (Klimyuk vd. 2014) dahil diğer kompleks proteinler *N. benthamiana* bitkisinde başarıyla üretilmiştir. Bu nedenle, bitki geçici ekspresyon stratejisi aynı zamanda kuduza karşı düşük maliyetli, güvenli, stabil ve yüksek immünojenik aşı üretimi için ideal ekspresyon platformu olacaktır. RABV'nin G proteini, bir tip-1 transmembran proteindir ve virüsün yüzeyinde trimerik bir sivri uç olarak birleştirilir. RABV'nin G proteini, virüs nötralize edici antikorları indükleyen ana antijen olarak bilindiğinden, bu nedenle, bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkisinde rekombinant G proteini tasarlandı ve üretildi. Bitkilerde transgenik yaklaşım kullanılarak kuduza ait G proteini üretilmiştir (McGarvey vd. 1995; Loza-Rubio vd. 2012). Bununla birlikte, transgenik bitki yaklaşımı, düşük hedef protein birikimleri, uzun gelişme süresi ve ayrıca transgenik bitkilerden vahşi türlere gen transferi olasılığı ile ilgili birtakım endişelere sahiptir (Messegueur 2003).

2.4. N-bağlı Glikosilasyon ve Deglikosilasyon

N-bağlı glikosilasyon, rekombinant alt birim aşılı ve heterolog ekspresyon sistemlerinde üretilen terapötik proteinler dahil olmak üzere birçok proteinin doğru katlanması, stabilitesi ve biyolojik aktivitesi için kritik olan bir translayon sonrası modifikasyondur (PTM) (Gomord vd. 2010; Wujek vd. 2004). Bir dizi çalışma, glikosilasyonun, böcek, maya, memeli veya bitki ekspresyon sistemlerinde üretilen farmasötik proteinlerin immünojenitesini, biyolojik aktivitesini ve yarı ömrünü önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Bununla birlikte, bazı ökaryotik ve ayrıca bakteriyel proteinler, doğal konakçıda N-glikan içermez, ancak bu proteinler, bu proteinler heterolog ökaryotik ekspresyon sistemlerinde eksprese edildiğinde anormal bir şekilde glikosile edilen, potansiyel olarak azalmış işlevselliğe yol açan çok sayıda potansiyel glikosilasyon bölgesi içiğindenepitopların yanlış/değiştirilmiş katlanması veya maskelenmesi nedeniyle immünojenisite kaybına uğrayabilirler. Bu noktada, *Plasmodium falciparum*'un (Milek vd. 1998) Pfs48/45 proteini veya koruyucu antijeni (PA) herhangi bir N-bağlı glikan taşımamaktadır (Milek vd. 1998; Mett vd. 2011; Frank vd. 2008) ancak yine de proteinler bitki sisteminde ifade edildiğinde anormal şekilde glikosile olabilen potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgeleri içermektedir. Bu nedenle, bu proteinlerin glikosile edilmemiş formlarını üretmek için stratejiler geliştirmek önemlidir. PA83'ün bitki ve memeli hücresi tarafından üretilen proteinindeki fark aynı zamanda N-bağlı glikosilasyondur. Bitkiler ve memeli ekspresyon sisteminde, endoplazmik retikulumda (ER) büyüyen polipeptit zincirinin glikosilasyon bölgesindeki asparajine bir N-asetilglukozamin ve mannoz kalıntıları çekirdeği eklenir. Yüksek mannoz glikoformlarıyla süslenmiş protein ER'den ayrılırken, daha fazla modifikasyonun meydana geldiği Golgi aygıtına taşınır. Hayvanlarda α -1,6-fukoz ve terminal sialik asit kalıntılarına sahip N-bağlı glikanlar eklenirken, bitki hücrelerinde β -1,2 bağlantılı ksiloz ve α -1,3-bağlı fukozlu N-bağlı glikanlar meydana gelir. Bu farklılık biyolojik etkinliğin azalmasına neden olabilir. (Mett vd. 2011; Mamedov vd. 2012; Mamedov ve Yusibov 2013). Bitki ekspresyon sisteminde glikosile edilmemiş rekombinant protein formları üretmek için bazı girişimler vardır. Bunlardan biri, asetilglukozaminfosfatı (GlcNAc-1-P) dolikol fosfat (Dol-P) üzerine N-glikosilasyonu bloke etmek için transfer eden enzimin spesifik bir inhibitörü olan tunikamisin kullanımınıdır (Yoo vd. 2018). Bununla birlikte, bitkilerde proteinlerin düzgün olmayan bir ifadesinde bu yaklaşımın daha önce sonuç verdiği gösterilmiştir. (Hori ve Elbein 1981; Frank vd. 2008). Dolayısıyla, bu strateji, glikosile edilmemiş bir biçimde rekombinant proteinlerin üretimi için pratik olamaz. Son zamanlarda, agroinfiltrasyon yoluyla bakteriyel PNGase F'nin birlikte sokulması ve ardından bitkilerde geçici ekspresyon yoluyla proteinlerin in vivo enzimatik deglikosilasyonuna yönelik bir strateji başarıyla geliştirilmiştir (Mamedov vd 2012; Mamedov vd. 2017). PNGase F ile birlikte ekspresyon yoluyla üretilen deglikosillenmiş proteinler, glikosile edilmiş muadillerine göre üstün fonksiyonel özellikler gösterse de (Mamedov vd. 2012), PNGase F ile in vivo veya in vitro deglikosilasyon asparajinin aspartata deamidasyonu nedeniyle glikosilasyon bölgesinde (N-X-S/T) bir amino asit değişikliğine neden olur (Mamedov vd. 2012; HaEgglund vd. 2014). Diğer bir deglikosilasyon enzimi olan Endo- β -N-asetilglukosaminidaz H (EC 3.2.1.96, Endo H), N-bağlı glikanların diasetilkitobiyoz çekirdeğinde iki N-Asetil-D-glukozamin (GlcNAc) tortusu arasındaki β -1,4 glikosidik bağın bölünmesini deamidasyon olmadan, asparajinlere bağlı tek bir GlcNAc kalıntısı bırakarak büyük verimlilikle katalize eder (Muramatsu 1971; Tarentino ve Maley 1976; Maley vd. 1989; HaEgglund vd. 2014).

Doğal konakçı hücrelerde, bazı proteinler, örneğin bakteriyel proteinler veya sıtma antijenleri bir glikoprotein değildir, ancak bazı potansiyel glikosilasyon bölgelerine sahiptir. Bu glikosilasyon bölgeleri, bitki ekspresyon sistemlerinin yanı sıra ökaryotik ekspresyon sistemlerinde anormal şekilde glikosillenebilir. Anormal glikosilasyon, proteinlerin önemli epitoplarını maskeleyerek uygunsuz katlanmaya yol açabilir. Bu sorun, hedef proteinleri PNGase F (Mamedov vd. 2012) veya Endo H (Mamedov vd. 2017) ile in-vivo deglikosilasyon teknolojisi geliştirilerek çözüldü. Endo H deglikosilasyon stratejisi, *Plasmodium falciparum*'un tam uzunlukta Pfs45/48 (Mamedov vd. 2019b), *Bacillus anthracis*'in PA83 proteininin monomerik ve heptamerik formlarının (Mamedov vd. 2017; 2019a), SARS-CoV-2 virüsünün Spike proteininin Reseptör Bağlanma Alanı (Mamedov vd. 2021a, 2021b) gibi aşı adaylarının ve insan ACE2 (Mamedov vd. 2021c) enzimi gibi kompleks proteinlerin fonksiyonel olarak aktif deglikosile edilmiş formlarının üretimi için başarıyla kullanılmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Tamponlar ve Süspansiyonlar

3.1.1. Western blot ve SDS –PAGE tamponları.

- **Tris HCl (1,5 M, pH: 8,8):** Tris bazlı 92,5 gr; distile su 250 ml. Çözeltinin pH'ı HCl ile 8.8'e ayarlandı, son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 500 ml'ye ayarlandı.
- **Tris HCl (0.5 M, pH: 6.8):** Tris-baz 30 gr; distile su 250 ml. Çözeltinin pH'ı HCl ile 6.8'e ayarlandı, son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 500 ml'ye ayarlandı.
- **Yürütme Tampon (1X):** Tris-baz 3.03 gr; Glisin 14.3 gr; SDS (%10) 10 ml. Son hacim otoklavlanmış distile su ile 1L olacak şekilde düzenlendi.
- **SDS / Western Gel numune yükleme solüsyonu (5X, Laemli Buffer):** Tris-HCl (1 M) 9.375 ml; Gliserol 11.9 ml; SDS 3.33 gr; 2- merkaptotanol (%25) 7.5 ml ve Bromofenol mavi stok süspansiyonu (100 mg/20 ml) 660 µl karıştırıldı. pH, HCl ilavesiyle 6.8'e ayarlandı. Nihai hacim 40 ml olacak şekilde tamamlandı. Protein örnekleri, jel yüklenmeden önce 1/4 hacim (5x) Laemli Tamponu ile kaynatılır.
- **SDS jel boyama solüsyonu (Coomassie boyama):** 500 ml metanol; 100 ml buzlu asetik asit ve 1 gr Coomassie Blue (R250) otoklavlanmış distile su içinde çözüldü ve son hacim 1000 ml olacak şekilde tamamlandı.
- **SDS jel leke giderme solüsyonu:** 700 ml damıtılmış su; 200 ml metanol ve 100 ml asetik asit karıştırıldı.
- **APS (%10):** 60 mg APS, 600 µl distile suda çözüldü. Sadece taze solüsyonlar kullanılır.
- **SDS (%10):** 10 gr SDS 90 ml distile suda çözüldü.
- **Western Blot (1X) için Transfer Tamponu:** 5.8 gr Tris-base; 2.93 gr Glycine; 370 µl SDS (%10) 1000 ml distile su ile karıştırıldı.
- **5XTBS:** 12.115 gr Tris-base; 42.88 gr NaCl 1000 ml'de karıştırıldı ve pH 7.5'e ayarlandı. **1XTBS** ise 200 ml 5xTBS'in son hacim distile su ile 1000 ml olacak şekilde karıştırılmasıyla hazırlandı.
- **I-Block:** 0,5 gr I-blok 100 ml 1X TBS ile tamamen karıştırıldı.
- **Primer Antikor (1: 1000):** 10 µl antikor, 10 ml I-blok içinde karıştırıldı.
- **İkincil Antikor (1: 5000):** 10 ml I-blok içinde 2 µl antikor karıştırıldı.

- **Jellerin Hazırlanması. (%10 jel için):**

Çizelge 3.1. %10 jel hazırlama bileşikleri

Jel içeriği	Yığıma Jeli	Yürütme Jeli
Distile su	2.450 ml	1.98 ml
%40 Akrilamid-Bis solüsyonu	1.250 ml	0.368 ml
Tris-HCl	1.250 ml (1,5 M Tris HCl, pH: 8,8)	0.780 ml (0,5 M Tris HCl, pH: 6,8)
% 10 SDS	50 µl	50 µl
TEMED	2.5 µl	3.125 µl
% 10 APS	25 µl	30 µl

3.1.2. Bakteri büyümeleri ve ortamları

- **SOC ortamı:** 20 gr baktotripton, 5 gr bakto maya özütü, 2 ml 5M NaCl, 2.5 ml 1M KCl, 10 ml 1M MgCl₂, 10 ml 1M MgSO₄ 800 ml otoklavlanmış distile suda çözündürüldü, 30 dakika 121°C'de otoklavlandı. Solüsyon otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklık 50 °C'ye düşürüldü. Ardından steril kabin altına 20 ml 1M glukoz ilave edilerek +4 °C'de bırakıldı.
- **SYS (BBL) medium:** 10 gr soyahidroliyat, 5 gr maya özütü ve 5 gr NaCl, 800 ml otoklavlanmış distile suda çözüldü. 1M KOH veya NaOH ile pH 7.0'a ayarlandı, son hacim otoklavlanmış distile su ile 1000 ml'ye ayarlandı. 121 °C'de 30 dakika otoklavlandı.
- **MMA medium:** 1.952 gr MES ve 10 ml 1M MgCl₂ 800 ml otoklavlanmış distile suda çözüldü. 1M KOH veya NAOH ile pH 5.8'e ayarlandı, son hacim otoklavlanmış distile su ile 1000 ml'ye ayarlandı. 121 °C'de 30 dakika otoklavlandı.
- **100 mM asetosiringon (AS) stok solüsyonu:** 0.3924 gr Asetosiringon tartılarak 12 ml %95 etanol ve 8 ml distile suda çözülerek son hacmi 20 ml olacak şekilde düzenlendi. 1L MMA için 150 µl Asetosiringon gereklidir (15 mM).

3.1.3. Protein saflaştırma (His-tag) tamponları

- **1 M NaH₂PO₄:** 13.8 gr NaH₂PO₄(H₂O) 100 ml distile suda çözüldü.
- **1M Na₂HPO₄:** 28.38 gr Na₂HP0₄ 100 ml distile suda çözüldü.

- **Sodyum fosfat tamponu (20 mM):** 15.48 ml 1 M Na₂HPO₄; 4.52 ml NaH₂PO₄; 17.53 gr NaCl 100 ml distile suda karıştırılır. pH 7.0'a ayarlandı ve nihai hacim 1 L'ye ayarlandı.
- **Dengeleme, Yıkama ve Elüsyon Tamponu:** Purifikasyon tamponları belirli miktarlarda imiazol içeren fosfat buffer olarak hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle bir stok imidazol hazırlanmıştır. **100 mM imidazol stok solüsyonu** 0.34 g imidazolün tartılarak 50 ml sodyum fosfat tamponu (20 mM) içerisinde çözdürülmesiyle hazırlandı.

Dengeleme tamponu (10 mM imidazol) için 5 ml 100 mM imidazol 45 ml sodyum fosfat tamponu ile karıştırıldı.

Yıkama tamponu (25 mM imidazol) için 12.5 ml 100 mM imidazol 37.5 ml sodyum fosfat tamponu ile karıştırıldı.

Elüsyon tamponu (250 mM imidazol) için 0.85 g imidazol 50 ml sodyum fosfat içerisinde çözdürüldü.

3.1.4. Elisa tamponları

- **Kaplama tamponu:** 0.15897 gr Na₂HCO₃ (15 mM) ve 0.29402 gr NaHCO₃ (35 mM) 100 ml distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklanır.
- **Yıkama tamponu:** %0.1 Tween-20, 1xPBS ile karıştırıldı.
- **Engelleme tamponu:** %0,5 Bloklama derecesi, %0.1 tween-20 içeren 1xPBS içinde çözüldü.
- **OPD-Substrat solüsyonu (0,05 M fosfat-sitrik tampon);** 2.8392 gr Na₂HPO₄ 100 ml çift distile su (0.2 M) içinde çözüldü. 2.1014 gr sitrik asit 100 ml çift distile suda (0.1 M) çözüldü. 0.2 M Na₂HPO₄'ten 25.7 ml ve 24.3 ml 0.1 M sitrik asit ve 50 ml çift damıtılmış su karıştırıldı (pH: 5.0).
- **%30 Hidrojen peroksit:** 12 ml Hidrojen peroksit ve 28 ml çift distile su karıştırılarak %30 hidrojen peroksit çözeltisi elde edildi. +4C'de saklanır.

3.2. G-proteininin Farklı Varyantlarının Mühendisliği, Optimizasyonu ve Klonlanması

RABV'nin G protein geni (ERA suşu, GenBank: J02293.1), *N. benthamiana* kodonları kullanılarak kodon optimizasyonu yapılmış, His6 etiketi ve ER tutma peptidi, C-terminalinde KDEL ve PR-1a sinyali ile iki gen de novo sentezlenmiştir. , Bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkisinde ekspresyon için üç çeşit G proteini varyantı aşağıda belirtildiği şekilde oluşturulmuştur:

- i.) RG1 (19-524 AA) olarak adlandırılan tam uzunlukta G proteini,
- ii.) RG2 (19-449 AA) olarak adlandırılmış kesik versiyon,

iii.) RG3 adı verilen G proteinin PR-1a sinyal sekansından sonra N-terminalinde yapay bir GCN4 bazlı trimerizasyon alanı olan 7-aa uzun bağlayıcı (LIGGGGI) ile G proteininin kesilmiş versiyonu.

N. benthamiana bitkisinde G protein varyantlarını eksprese etmek için sinyal peptidi (1-19 amino asitleri), *Nicotiana tabacum* PR-1a sinyal peptidi (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA) ile değiştirildi. Yapıların şematik gösterimleri Şekil 4.1'de de gösterilmiştir.

Tüm genler, klonlama amacıyla Age I ve Xho I restriksiyon bölgeleriyle tasarlanmıştır. G proteini gen varyantlarının klonlanması için, genler, Age I ve Xho I restriksiyon enzimleri ile kesildi. Bu işlem için 5 ul plazmit, 2 ul nükleaz içermeyen H₂O, 1 ul NE tampon 1-1, 1 ul Xho I ve 1 ul Age I 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından DNA fragmanları, (G protein genleri) %1 agaroz jel üzerinde çalıştırıldı. Üç G varyantı, pEAQ-RG1-His6-KDEL, pEAQ-RG2-His6-KDEL ve pEAQ-RG3-His6-KDEL oluşturmak için bitki ekspresyon vektörü olan pEAQ vektörüne (Sainsbury vd. 2009) klonlandı. Plazmitler daha sonra bitki yapraklarına verilmek için *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin AGL1 suşuna transforme edildi.

3.3. Klonlanmış G-protein Genleri İçeren Bitki İfade Plazmidlerinin *Agrobacterium tumefaciens*'e Transformasyonu



Şekil 3.1. Gene Pulser Xcell modül elektroporasyon sistemleri, ana bölmeyi, iki aksesuar modülünü ve ShockPod™ kuvvet kamerasını içerir

pEAQ-RG1-His6-KDEL, pEAQ-RG2-His6-KDEL ve pEAQ-RG3-His6-KDEL plazmidleri kompetent hücre olan *E. coli* DH5 α suşuna, ısıtma şoku (heat-shock) yöntemi ile transforme edildi. Tüp, 5 dakika buz üzerinde saklandı ve sonra 42°C'de 50 saniye boyunca bir su banyosunda bekletildi. Son olarak tüp buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi ve ısıtma şoku işlemi tamamlandı. Tüpe, 400 μ l LB medium ilave edildi ve bir saat 37°C'lik bir çalkalayıcıda inkübe edildi. 1 saat sonra hücreler, 50 μ l /ml kanamisin ile agar plakalarına inokule edildi. Ertesi gün, birkaç koloni seçildi ve bu koloniler, 50 μ g/ml kanamisin içeren LB ortamına dahil edildi. Ertesi gün ilgili genleri içeren plazmitler *E. coli* DH5 α hücrelerinden saflaştırıldı.

Tüpler tekrar santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpler, 400 µl yıkama tamponu 1 ve yıkama tamponu 2 ile temizlendi ve santrifüj edildi. Artık sıvı tüplerde kaldı ve kolon toplama tüplerine aktarıldı. 30 µl elüsyon tamponu eklendi ve 3 dakika tutuldu ve plazmitler elde edildi. pEAQ-RG1-His6-KDE, pEAQ-RG2-His6-KDEL ve pEAQ-RG3-His6-KDEL plazmitleri kullanılarak, bir kompetent hücre olan *Agrobacterium* suşu olan EHA 105 'e Gene Pulser Xcell elektroporasyon cihazı (2500V, 25 µF, 400 Ω) kullanılarak transforme edildi . EHA 105 ve ilgili genleri içeren plazmitler elektroforez küvetlerine koyuldu ve bir elektrik şoku verildi. Hemen ardından, 1 ml SOC solüsyonu (%2 tripton, %0,5 maya özütü, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ve 20 mM glukoz) ilave edildi ve pipetlendi. Ortak karışım küvetlerden alınarak eppendorf tüpe eklendi ve 2 saat 28 °C'de çalkalayıcıda tutuldu. Numuneler daha sonra petri kaplarına yayıldı ve 28 °C'de 3 gün inkübe edildi.

3.4. *N. benthamiana*'da Bitki Bazlı Rekombinant G-protein Varyantlarının Ekspresyon Tayini

N. benthamiana'da rekombinant G protein varyantlarının (RG1, RG2 ve RG3) üretimi için, RG1, RG2 ve RG3 protein genlerini barındıran pEAQ-RG1-His6-KDEL, pEAQ-RG2-His6-KDEL veya pEAQ-RG3-His6-KDEL plazmitleri, Gene Pulser Xcell Total System (BioRad, ABD) kullanılarak elektroporasyon yoluyla *Agrobacterium tumefaciens* suşu AGL1'e aktarıldı. RG1, RG2 ve RG3 genlerini barındıran *A. tumefaciens* suşu, gece boyunca 28°C'de BBL ortamında (5 g/L NaCl, 5 g/L maya özü, 10 g/L soya hidrolizatı ve 50 mg/L kanamisin) büyütüldü. RG1, RG2 ve RG3 genlerini barındıran *Agrobacterium*'un yetiştirilen kültürü daha sonra *N. benthamiana* bitki yapraklarına (6-7 haftalık) şiringayla manuel sızma veya vakumlu sızma yoluyla verildi. Yaprak örnekleri, daha önce tarif edildiği gibi pEAQ-RG1-His6-KDEL, pEAQ-RG2-His6-KDEL veya pEAQ-RG3-His6-KDEL plazmitleri ile infiltre edildi.



Şekil 3.2. *Nicotiana benthamiana* bitki yapraklarına infiltasyon yapılması

Yaprak numuneleri 5 dpi'de (infiltasyon sonrası gün) hasat edildi ve daha sonra 1X fosfat ekstraksiyon tamponunda öğütüldü. Ham ekstrakt 13.000 g'de 20 dakika santrifüjlendi. 40 µl berrak ham özüt, 10 µl 5XSDS-Örnek tamponu ile karıştırıldı ve

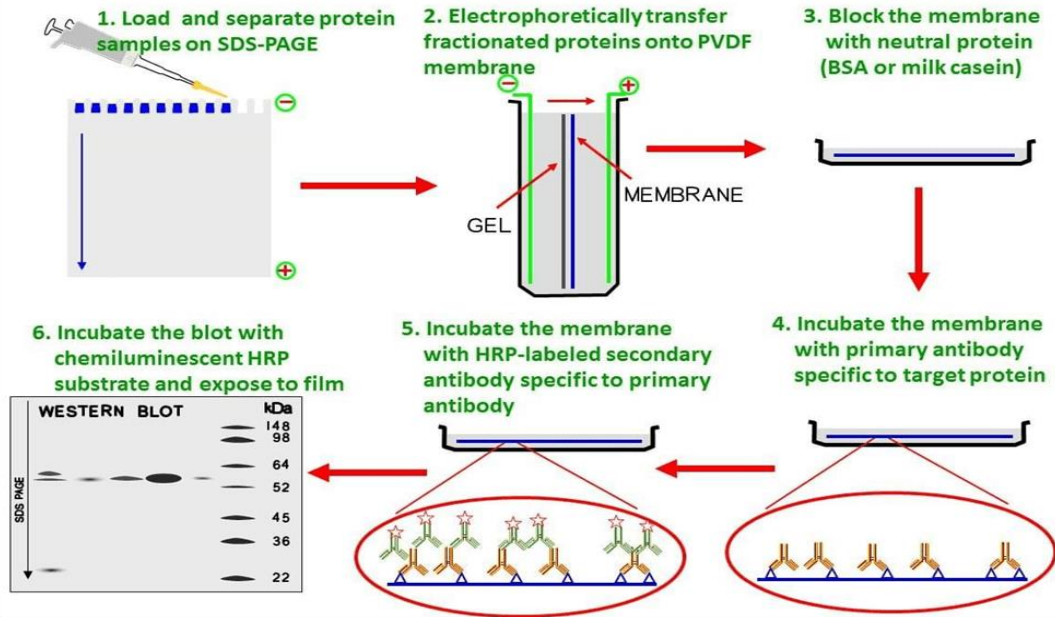
100°C'de 5 dakika inkübe edildi ve ardından örnekler SDS-PAGE üzerinde çalıştırıldı ve Western blot analizi için hidrofobik poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarıldı. Bitki tarafından üretilen rekombinant RG1, RG2 ve RG3 proteinleri membran üzerinde birincil antikor olarak anti-His-tag antikor (kat # 652502, BioLegend) ve ikincil antikor olarak HRP konjuge keçi anti-fare IgG (kat # 405306, BioLegend, ABD) antikor kullanılarak görüntülendi.

3.5. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

Süzme işleminden 6 gün sonra bitki yaprakları toplandı ve özütleme tamponu içinde ağırlıklarından üç kat daha fazla ekstrasyon tamponu (2 mM sodyum dietilditiokarbamat (DIECA) içeren 1xPBS) içinde hasat edildi. Ekstraksiyonun ardından ezilen bitki yaprakları 13.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant 5xLaemmli Tamponu (100 mM Tris, %2 SDS, %20 gliserol, %4 β-merkaptotetanol, pH 6.8) ile 4:1 oranında karıştırıldı ve 100°C'de 5 dakika kaynatılır. Kaynatılan numuneler %10 akrilamid jellere (10 µl/kuyu/her numune) yüklendi. SDS-PAGE analizini gerçekleştirmek için jeller 15 dakika boyunca 200V ve 45 dakika boyunca için 100 V'ta yürütme tamponunda yürütüldü. Jeller çalıştırdıktan sonra jel distile su ile 5 dakika yıkandı. Yıkamanın ardından jel, 1 saat Comassie boyama tamponu ile boyandı ve 15-20 dakikalık aralıklarla boya giderme tamponu ile boyandı.

Western Blot analizlerinde iki adımda gerçekleştirildi; ilk adım çalıştırma SDS-PAGE analizi ile aynıdır ve ikinci adım proteinlerin jelden poliviniliden florür membranlara (Millipore, Billerica, MA) transferidir. Proteinler transfer tamponu yardımıyla membrana aktarıldıktan sonra, membran bloke etme tamponuyla (1xTBS içinde %0,5 I-Block (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. (Şekil 3.2). 1 saat sonra membran, oda sıcaklığında 1 saat boyunca birincil antikor olan anti-His6 tag monoklonal antikor (Kat. no. 652502, BioLegend) ile işleme tabi tutulur. Daha sonra, membranlar 5 dakika boyunca 3 kez %0,5 I-Blok ile 5 dakika yıkandı ve daha sonra (HRP)-konjuge sekonder antikor (Cat. No., Abcam) ile işlendi. Sekonder antikordan sonra membran 3 kez 5 dakika %0,5 I-Blok ile 5 dakika ve 1 kez 1xTBS ile yıkandı. Son olarak SuperSignal West Pico Stable Peroxide ve Luminol / Enhancer solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY), ile kemilüminesans tespiti yapıldı. Jel fotoğrafları, bir GeneGnome XRQ kemilüminesans görüntüleme sistemi (Syngene Corp., ABD) kullanılarak elde edildi.

Western Blotting Procedure



Şekil 3.3. Geleneksel Western Blot'un genel anlatımı. (A) (PAGE) ile proteinlerin ayrılması; (B) lekelenmiş proteinlerin bir zara transferi (PVDF/nitroselüloz); (C) Hedef proteinlere özgü birincil antikor, ardından bir enzim konjuge ikincil antikor. Enzim (yaban turpu peroksidaz, HRP), ışık yaymak için bir substrat (elektro-kemilüminesans, ECL) üzerinde hareket eder; (D) sinyaller kemilüminesans görüntüleme sisteminde yakalandı (düzenlendi ve alıntılındı) (<https://microbeonline.com/western-blot-technique-principle-procedures-advantages-and-disadvantages/>)

3.6. RG2'nin PNGase F ve Endo H İle Birlikte İfade Edilmesi

RG2'yi PNGase F veya Endo H deglikosilasyon enzimleri ile birlikte eksprese etmek için, *N. benthamiana* bitkisi yapraklarına pEAQ-RG2 ve pGeenII-PNGase F veya pGeenII-Endo H yapılarını barındıran AGL1 suşu ile birlikte infiltre edildi (Mamedov vd. 2017).

3.7. *N. benthamiana* Bitkisinden Üretilen RG2 ve RG3 Proteininin Saflaştırılması

Rekombinant RG2 ve RG3 Ni-NTA Resin (kat. no. 88221, ThermoFisher) kullanılarak afinite kolon kromatografisiyle, pEAQ-RG2-His6-KDEL veya, pEAQ-RG3-His6-KDEL ile infiltre edilmiş 25 g *N. benthamiana* bitki yaprağından saflaştırıldı (Mamedov vd. 2017). Saflaştırılmış RG2 ve RG3 proteinlerinin saflaştırma verimi Western blot analizi ile tespit edildi.

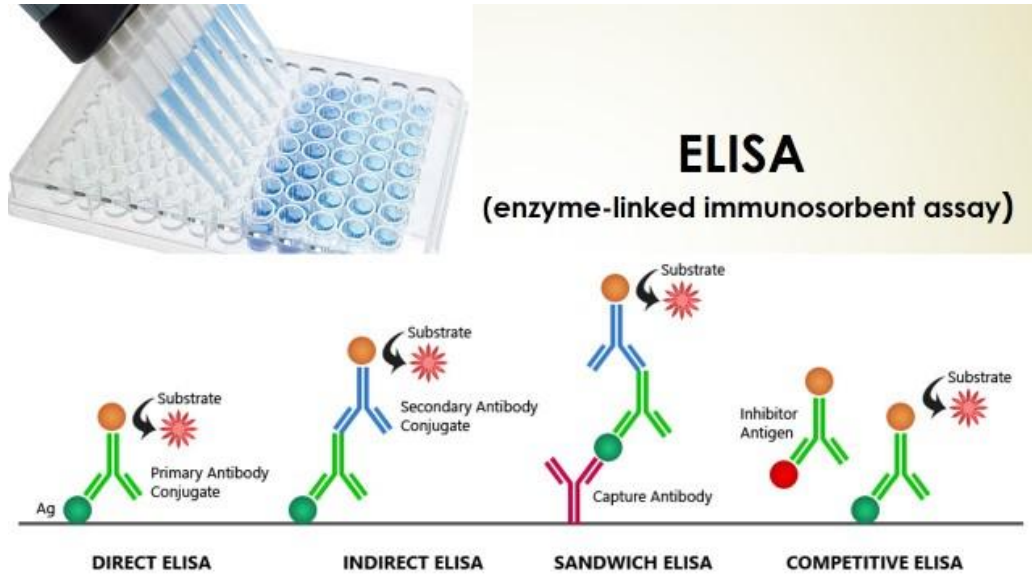
3.8. Farelerde Bitki Tarafından Üretilen RG2 ve RG3 Proteininin İmmünojenisite Çalışmaları

Bitki tarafından üretilen RG2 ve RG3 proteininin immünojenisite çalışmaları farelerde değerlendirildi. Yedi haftalık bir fare (BALB/c suşu, grup başına 6 fare), 0 ve 21. günlerde %0,3 Alhidrojele adsorbe edilmiş RG2 ve RG3 proteini ile kas içinden (IM) iki doz olacak şekilde (her dozda 5 µg) aşılandı. 21 ve 42. günlerde kan alınarak serumlar

elde edildi ve ardından anti-RG2 veya anti-RG3 antikor yanıtları için ELISA yöntemi ile değerlendirildi. ELISA için, oyuklar 200 ng saflaştırılmış RG2 veya RG3 proteini ile gece boyunca 4°C'de 100 mM karbonat tamponu içinde kaplanmıştır. Ertesi gün, oyuklar bloke edildikten sonra, oyuklara çeşitli serum dilüsyonları aktarıldı ve daha sonra plaka oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, plaka üç kez 1X PBST ile yıkandı ve ardından antikor seviyelerini değerlendirmek için anti-fare IgG+HRP (Cat. no. MBS440122, MyBioSource, ABD) eklendi. Plaka 1X PBST ile yıkandıktan sonra, O-fenilendiamin dihidroklorür tabletleri (Kat. no. P8287, Sigma) kullanılarak hazırlanan 200 µl substrat solüsyonu her bir oyuğa ilave edildi. Plaka daha sonra karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plak 450 nm'de okundu. Fare çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Fare çalışmaları için kullandığımız hayvan protokolü (protokol numarası: 1156/2020.07.002) Yerel Etik Kurul tarafından onaylanmıştır.

3.9. Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

Serum örneklerindeki anti-RG2 ve anti-RG3 antikor seviyeleri, daha önce tarif edildiği gibi enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) ile tespit edildi (Miura vd. 2008). İlk olarak, tampon çözeltiler hazırlandı. Distile su içinde 15 mM sodyum karbonat ve 35 mM sodyum bikarbonat içeren kaplama tamponu oda sıcaklığında (RT) muhafaza edildi PBS'de %0,1 Tween-20'de %5 (w/v) süt tozu içeren blokaj tamponu ihtiyaç duyulduğu kadar +4°C'de tutuldu. PBS içeren seyreltme tamponu, ihtiyaç duyulana kadar +4°C'de tutuldu. PBS içinde %0,1 Tween-20 içeren yıkama tamponu, ihtiyaç duyulana kadar +4 °C'de tutuldu. Durdurma tamponu 0.05 M fosfat-sitrat tamponu içeriyordu, pH 5.0, ihtiyaç duyulana kadar +4 °C'de tutuldu. Düz tabanlı 96 oyuklu ELISA plakaları, kaplama tamponu ile seyreltilmiş test proteininin oyuk başına 0.5 µg/ml'si ile kaplandı ve 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.



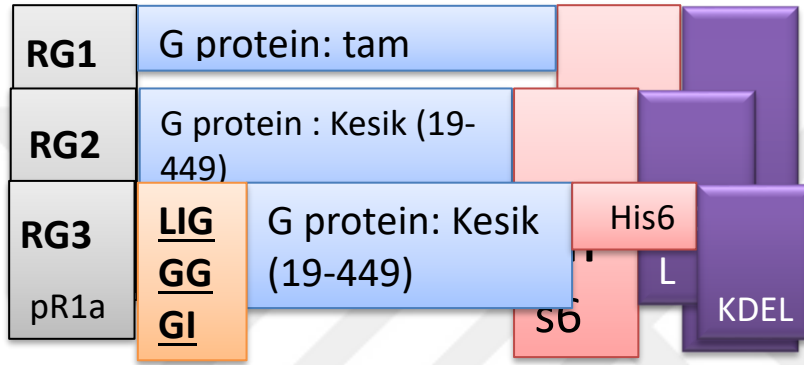
Şekil 3.4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) procedurunun şematik gösterimi

Hedef proteinler ile kaplanan plakalar, oda sıcaklığında 3 tekrar ile 5 dakika boyunca 200 µl/kuyu yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra plakalar, oda sıcaklığında (RT) 2 saat boyunca 200 µl/oyuk bloklama tamponu ile bloke edildi. Kaplanmış oyuklara (100 µl/oyuk) seyreltilmiş serum ilave edildi ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloke edildilen plakalar, 100 µl/kuyucuk yaban turpu peroksidaz (HRP) konjuge anti-fare sekonder antikor (Cat. No. ab98790, Abcam) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Yıkama işlemlerinden sonra, OPD konsantrasyonu 0,4 mg/ml olan substrat tableti/tabletleri %30 hidrojen peroksit içeren 0.05 M fosfat-sitrat tamponu, pH 5.0 eklenerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. 450 nm'de bir spektrofotometrik ölçüm ile IgG titreleri saptandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

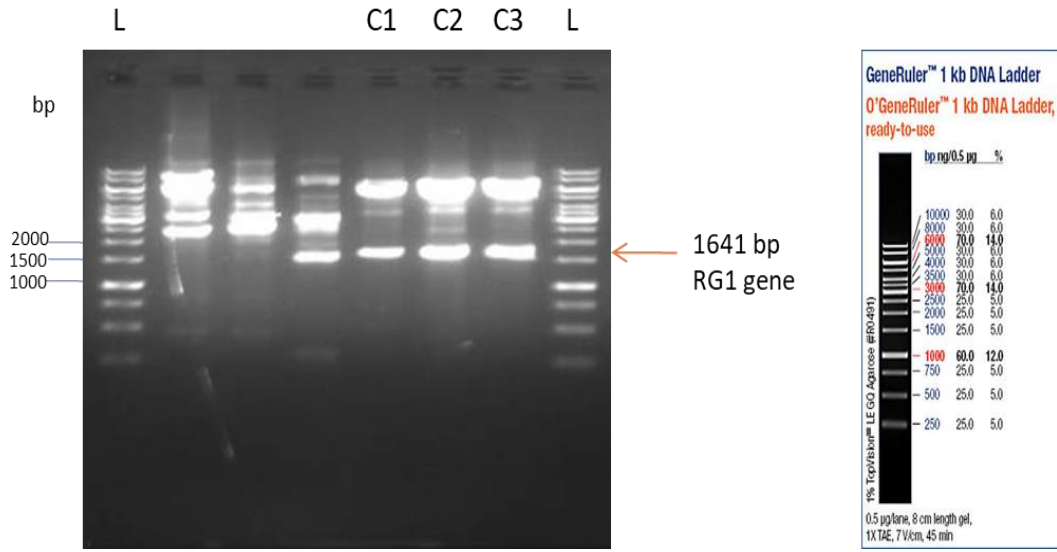
4.1. G-proteininin Farklı Varyantlarının Mühendisliği, Optimizasyon ve Klonlanması

CVS dahil çeşitli diğer RABV suşlarına %97 ila %98 özdeşlik gösteren kuduz virüsünün (PV suşu) G protein genleri tasarlandı. *N. benthamiana* kodonları kullanılarak kodon optimize edildi ve bu genlerin PR-1a sinyal peptidi, His6 etiketi ve C-terminalinde KDEL olan bir ER tutma peptidi ile de novo sentezi yapıldı. Bu çalışmada üretilen G protein antijen yapılarının (plazmidler) şematik Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

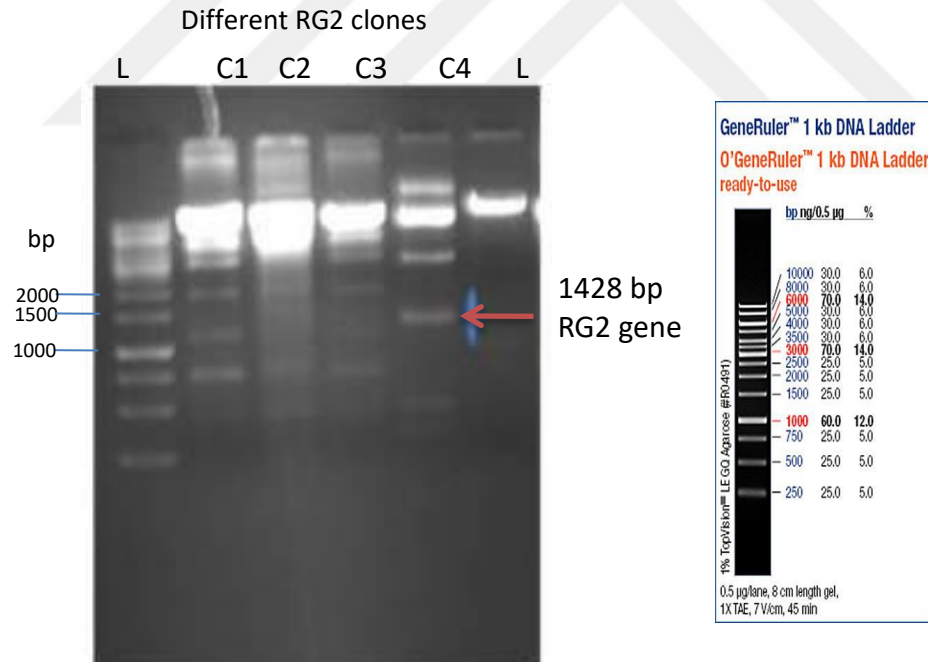


Şekil 4.1. G protein antijen yapılarının (plazmidler) şematik gösterimi. RG1: Kuduz G proteininin tam uzunlukta dizisi; RG2: G proteini varyantının kesilmiş monomerik formu; RG3: G proteini varyantının kesilmiş trimerik formu. PR-1a: Sinyal peptidi (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA). His6 etiketi: 6 tane histidine amino asidinden meydana gelmiş dizi motifi. LIGGGGI: yapay bir GCN4 tabanlı trimerizasyon alanı olan 7-aa (LIGGGGI) uzunluğunda bir bağlayıcıdır

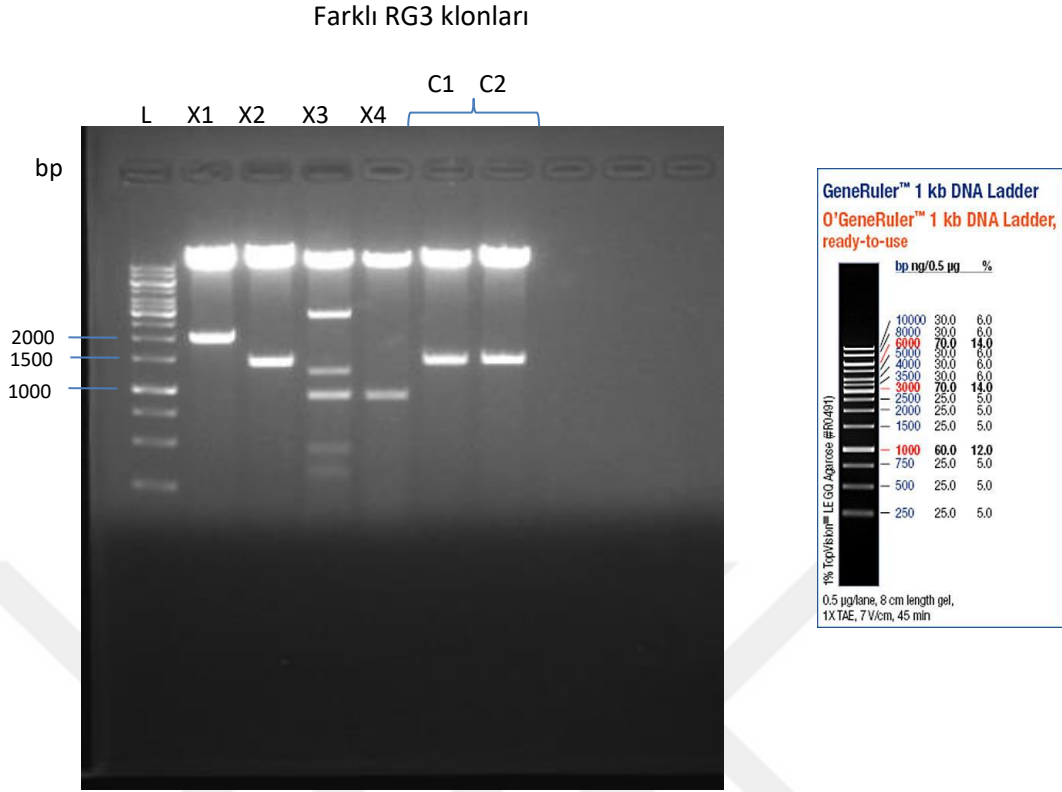
Toplamda, *N. benthamiana* bitkisinde ekspresyon için üç çeşit G proteini üretildi. RG1 (19-524 AA) olarak adlandırılan tam uzunlukta G proteini, ii) RG2 (19-449 AA) olarak adlandırılmış kesik versiyon ve iii) trimerik yapıya sahip RG3 adı verilen G protein. Bu trimerik yapıya sahip olan G proteinini üretmek için PR-1a sinyal sekansı ile G proteinin amino asitler (19-449 aa) dizisi arasında PR-1a sinyal sekansından (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA) sonra N-terminalinde yapay bir GCN4 bazlı trimerizasyon alanı olan 7-aa uzun bağlayıcı olan LIGGGGI dizisi ile üretim için tasarlandı. G protein varyantlarının *N. benthamiana*' daifadesi için sinyal peptidi (1-19 amino asitleri), *Nicotiana tabacum* PR-1a sinyal peptidi (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA) ile değiştirildi. Tüm genler, klonlama amacıyla Age I ve Xho I restriksiyon enzimi bölgeleri ile tasarlanmıştır. G proteini gen varyantlarının klonlanması için, Age I ve Xho I restriksiyon enzimleri ile kesildi ve laboratuvarımızda mevcut olan pEAQ-RG1, pEAQ-RG2 ve pEAQ-RG3 plazmitlerini üretmek için bitki ekspresyon vektörüne klonlandı (Mamedov vd. 2017). Şekil 4.2,4.3 ve Şekil 4.4'ten görülebileceği gibi, tüm genler beklenen boyutlarda bulunmuştur. Plazmidler, bitki yapraklarına daha fazla infiltrasyon için *Agrobacterium* suşu olan AGL1 içinde transforme edildi.



Şekil 4.2. Tam uzunlukta G protein geninin (RG1) klonlanması. Tam uzunlukta RG1 geni, bitki ekspresyon plazmiti olan pEAQ plazmitine klonlandı. pEAQ-RG1 plazmidinin AgeI ve Xho I restriksiyon enzimleri ile ikili kesiminden sonra beklenen bir boyutta, klonlanmış RG1 geninin doğru büyüklüğünü doğrulayan bir 1641 bp (şekilde C1, C2 ve C3 olarak etiketlenmiş) üretildi



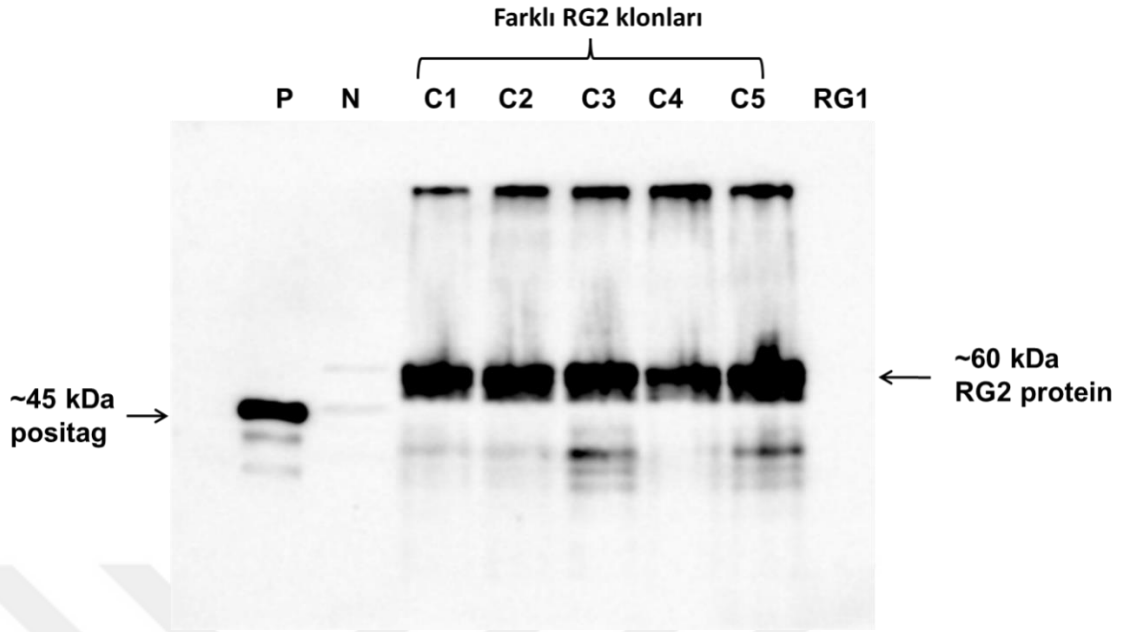
Şekil 4.3. RG2 geninin klonlanması. RG2 geni, bitki ekspresyonu pEAQ plazmiti içine klonlandı. pEAQ-RG2 plazmidinin AgeI ve Xho I restriksiyon enzimi ile ikili kesilmesinden sonra, klonlanmış RG2 geninin doğru büyüklüğünü doğrulayan beklenen boyutta bir 1428 bp, klon N4 (şekilde C4 olarak etiketlenmiş) üretildi ve tez süresi boyunca yapılan deneylerde kullanıldı. C1, C2 ve C3 analiz edilen diğer ve doğru büyüklükte DNA içermeyen kolonilerdir



Şekil 4.4. RG3 geninin klonlanması. RG3 geni, bitki ekspresyonu pEAQ plazmitlerine klonlandı. pEAQ-RG3 plazmidinin AgeI ve Xho I restriksiyon enzimleri ile beklenen bir boyutta ikili kesiminden sonra, klonlanmış RG3 geninin doğru büyüklüğünü teyit eden 1452 bp (şekilde C1 ve C2 olarak etiketlenmiş) üretildi. X1, X2, X3 ve X4 analiz edilen diğer kolonilerdir. Doğru boyutta DNA fragmanına sahip olan C1 ve C2 koloniler agroinfiltrasyon transfer için kullanıldı

4.2.N. *benthamiana* Bitkilerinde RG2'nin İfade Edilmesi ve Ekspresyon Tayini

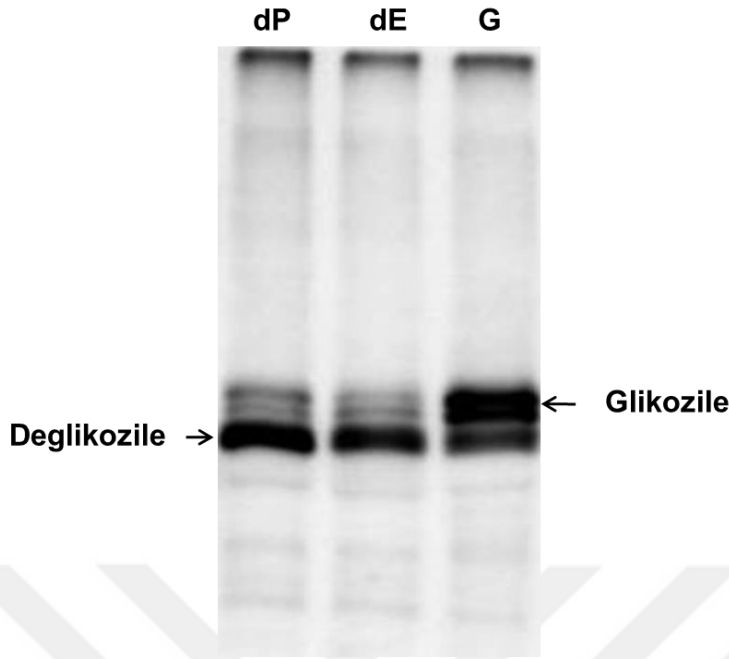
Yukarıda da belirtildiği gibi, bu çalışmada, G protein geni üç farklı şekilde tasarlanmış ve üretilmiştir. *N. benthamiana* bitkisinde tam uzunlukta RG1 proteini eksprese edildiğinde, western blot'ta spesifik bir G protein bandı gözlemlenmedi (Şekil 4.5, şerit 8). Bu nedenle, *N. benthamiana*'da yüksek oranda çözünür ve immünojenik bir rekombinant G proteini üretmek için kesilmiş bir G proteini (RG2) formu tasarlandı. Western blot analizi ile RG2 proteininin *N. benthamiana* bitkisinde başarıyla eksprese edildiği gösterildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde üretilen RG1 ve RG2'nin Western blot analizi. Bitkiler 5 dpi'de hasat edilmiştir. Numuneler, Materyal ve Metot bölümünde açıklandığı gibi hazırlandı. Şeritler: P: 25 ng rekombinant Posi-Tag Epitop Etiket Proteinini ~45 kDa (Positag, BioLegend, kat no: 931301) standart bir protein; N: infiltre edilmemiş bir kontrol bitkisinden hazırlanan ham özüt; G1-G5: RG2 genini taşıyan çeşitli *Agrobacterium* kolonileri (AGL suşu) ile infiltre bitkilerden hazırlanan ham özler. RG1: RG1 genini taşıyan *Agrobacterium* (AGL suşu) ile infiltre edilmiş bitkilerden hazırlanan ham özüt

4.3. *N. benthamiana* Bitkisinde Deglikosile RG2 Protein Formlarının Üretimi

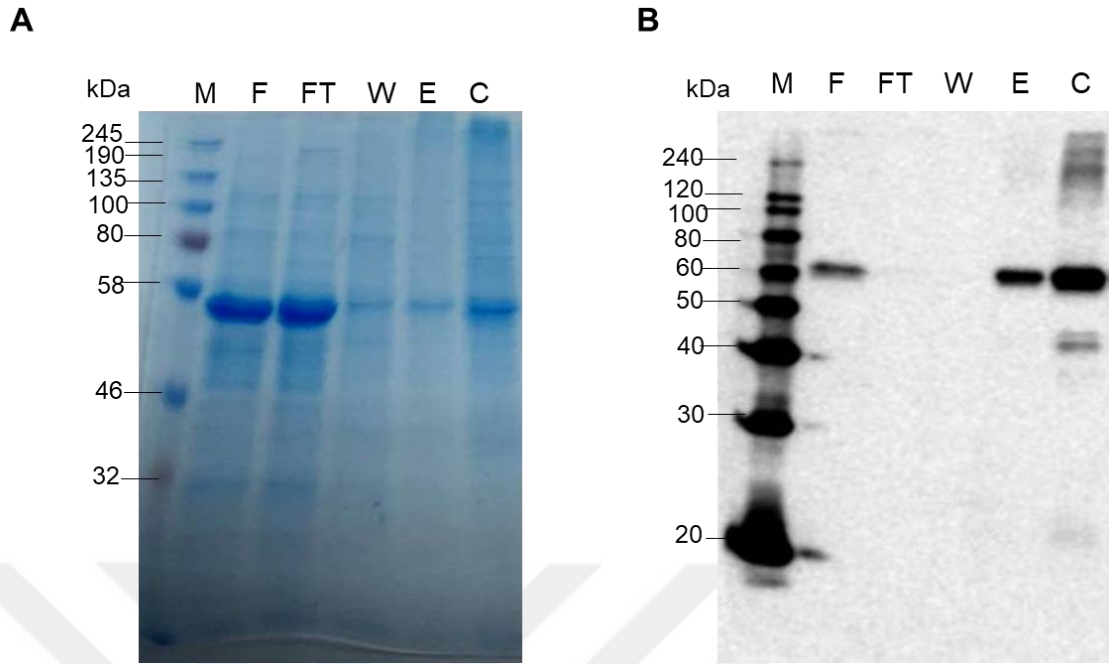
G proteini üç potansiyel N-glikosilasyon bölgesine sahiptir. Bitkiye özgü glikosilasyonun etkisini test etmek için RG2, deglikosilasyon enzimleri olan PNGaz F ve Endo H ile birlikte eksprese edildi (Mamedov vd. 2017). Şekil 4.6'den görülebileceği gibi, Western blot analizi ile PNGaz F veya Endo H enzimleri ile ekspresyon yoluyla RG2'nin deglikosilasyonu teyit edilmiştir. Analiz sonucuna göre, glikosile edilmiş RG2 (G) ile deglikolize formları karşılaştırıldığında dP ve dE numunelerinde bant kayması gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, bitki tarafından üretilen RG2 proteininin glikosile edildiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.6. RG2 proteininin PNGaz F (dP) veya Endo H (dE) deglikosile edici enzimlerle birlikte ifadesinin Western blot analizi. G: glikosile RG2; dP: PNGaz F enzimi ile deglikosile edilmiş RG2; dE: Endo H enzimi ile deglikosile edilmiş RG2

4.4.N. *benthamiana* Bitkilerinden Rekombinant RG2'nin Saflaştırılması

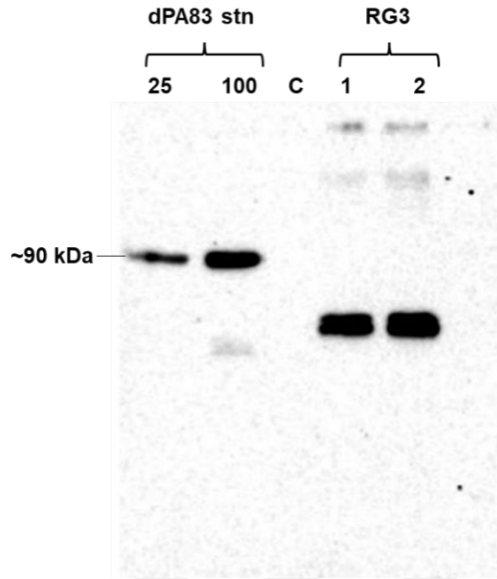
Bitki tarafından üretilen RG2 proteini, Ni kolon afinite kromatografi metodu ile saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için, HisPur™ Ni-NTA Rezini (ThermoFisher, Kat. No. 8822) kullanılarak saflaştırıldı. 20 gr donmuş bitki yaprakları homojenize edildi ve üç katı hacimde bir ekstraksiyon tamponunda (20 mM sodyum; fosfat, 0.3 M NaCl, 20 mMimidazol, pH 7.4) ekstrakte edildi. Ekstrakt 20000g'de 13 dakika +4°C'de santrifüj edilerek berraklaştırıldı. Filtrelenen süpernatant, dengelenmiş (20 mM sodyum fosfat, 0.3 M NaCl, 10 mMimidazol, pH 7.4) kolondan geçirildi. Kolon, 10 kolon hacminde (CV) yıkama tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0.3 M NaCl, 25mMimidazol, pH 7.4) ile yıkandı. Proteinler 10 CV elüsyon tamponu (20 mM sodyum; fosfat, 0.3 M NaCl, 250 mMimidazol, pH 7.4) ile kolondan ayrıldı. Protein (~ 0.5 CV) içeren fraksiyonlar birleştirildi ve 10 k MWCO Millipore konsantratör ile 300 µl nihai hacme konsantre edildi ve fosfat tamponuna (PBS) karşı tampon değiştirildi. Konsantre protein -80°C'de saklandı. Saflaştırılmış RG2 proteini SDS-PAGE ve Western blot analizi ile incelendi. Şekil 4.7'de görüldüğü gibibitki tarafından üretilen RG2 proteini, ~60 kDa'lık bir MM'ye sahip tek bir protein olarak görünmektedir. RG2'nin saflığı yaklaşık %50 idi. RG2 proteininin saflaştırma verimi ~32 mg/kg bitki yaprağı olmuştur.



Şekil 4.7. Bitkide üretilmiş RG2 proteininin HisPur™ Ni-NTA Reçine kolonu ile *N. benthamiana* yapraklarından saflaştırılması. Saflaştırılan RG2 proteini, SDS-PAGE (A) ve Western blot (B) ile analiz edilmiştir. F: Ham ekstrakt fraksiyonundan (HisPur™ Ni-NTA Resin kolonuna yüklenen) alınan örnek; FT: Kolondan geçirildikten sonra elde edilen akıntı; W: Yıkama fraksiyonu; E: Elute edilmiş, birleştirilmiş fraksiyon (10 µl); C: Konsantre edilmiş elute fraksiyon (2 µg) bir jele yüklendi. M: önceden boyanmış protein standardı (SDS-PAGE için); M: MagicMark XP Protein Standardı (Western Blot) Fraksiyonlar (F, Ft ve W) jele SDS-PAGE analizi için 10 µg olacak şekilde yüklenirken Western Blot için 200 ng şeklinde yüklendi

4.5.N. benthamiana Bitkilerinde RG3'nin Ekspresyonu ve Ekspresyon onayı

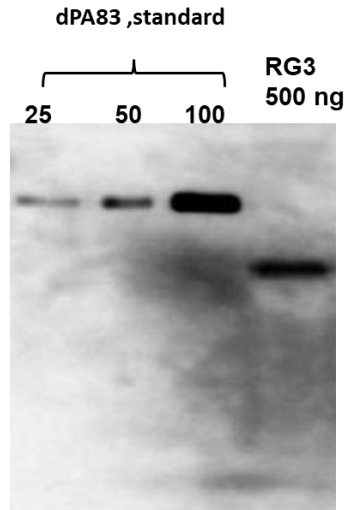
Trimerik yapıya sahip olacak şekilde tasarlanmış G proteini olan RG3 proteini *N. benthamiana* bitkisi kullanılarak üretilmiş ve Western blot analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.8'de görüleceği gibi, RG3 (trimerik) proteini *N. benthamiana* bitkisinde başarıyla eksprese edilmiştir.



Şekil 4.8. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde üretilen RG3 proteininin Western blot analizi. Bitki tarafından üretilen ve Endo H enzimi ile deglikosile edilmiş PA83 (Mamedov vd. 2017) proteini 25 ng ve 100 ng olacak şekilde yüklenerek standard protein olarak kullanılmıştır. C: İnfiltrate edilmemiş kontrol bitkisi. Şerit 1 ve 2 ise farklı seçilen *Agrobacterium* kolonileri ile infiltrate edilen bitki özütleri

4.6.N. *benthamiana* Bitkilerinden Rekombinant RG3 Proteininin Saflaştırılması

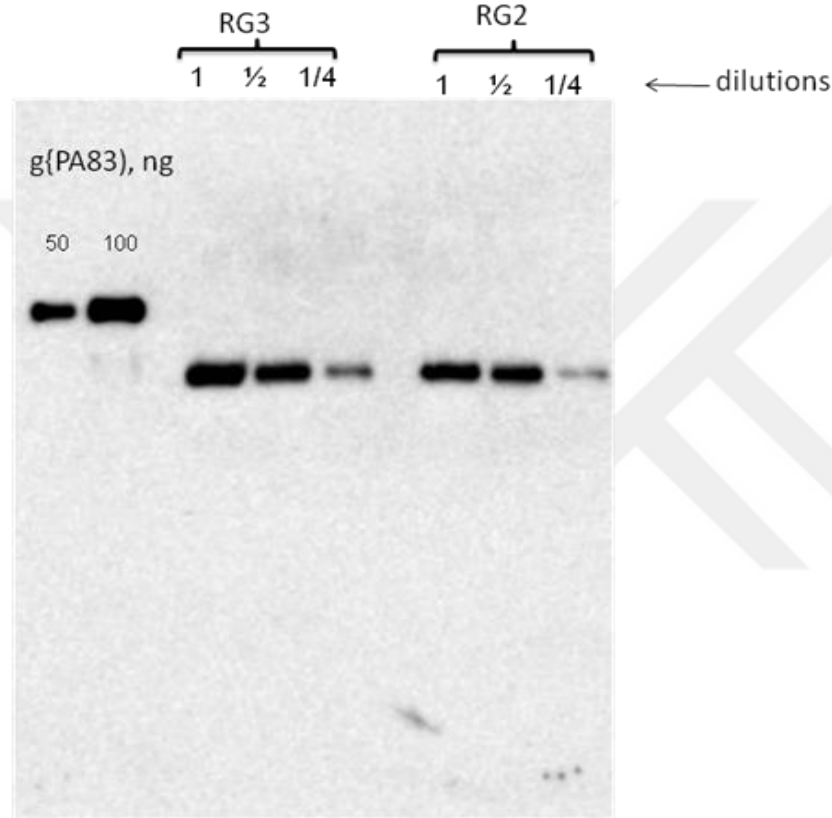
RG3 proteini yukarıda tarif edilen RG2 proteininde olduğu gibisaflaştırıldı. RG3 proteininin kısmen saflaştırılmış, toplanmış ve konsantre edilmiş fraksiyonunun Western blot analizi Şekil 4.9 'te sunulmuştur. RG3 proteinin saflaştırma verimi ~ 20 mg/kg bitki yaprağı olmuştur.



Şekil 4.9. Kısmen saflaştırılmış RG3'ün western blot analizi. dPA83, standart protein olarak kullanılan bitki tarafından üretilen bir protein; RG3 proteini ise kuyuya 500 ng olarak yüklendi

4.7. RG2 ve RG3 Proteininin Bitki İnfiltrasyonu, Saflaştırılması ve Protein Miktar Belirlemesi

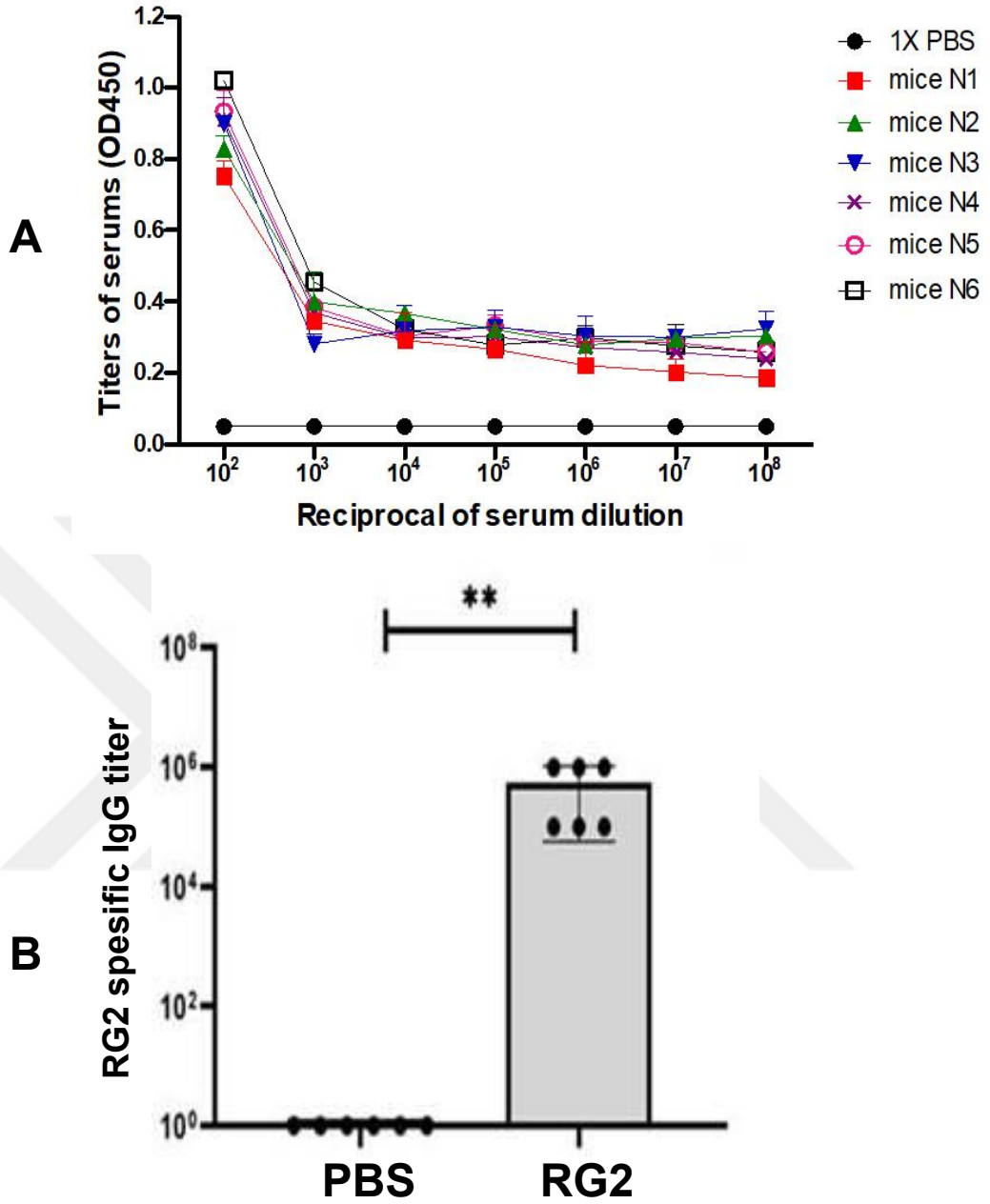
RG2 ve RG3 proteinlerinin saflaştırılması için, bitkide üretilen RG2 ve RG3 proteinleri Ni-resin kolon kullanılarak pürifiye edilmiştir. RG2 ve RG3 proteinleri yeterince saf olmadığı için, immunojenisite çalışmalarında kullanılmak üzere protein miktarını tayin etmek için RG2 ve RG3 proteinlerine Western Blot analizi yapıldı (Şekil 4.10). Şekil 4.10'da görüldüğü gibi hem monomerik RG2 hem de trimerik RG3'ün moleküler kütlelerinin birbirine çok yakın olduğunu bulunmuştur.



Şekil 4.10. Ni-kolon kullanılarak 50-gram *N. benthamiana* yaprağından saflaştırılmış RG2 ve RG3 proteinlerinin Western blot analizi. Western Blot analizi için seyreltilmemiş, $\frac{1}{2}$ ve $\frac{1}{4}$ seyreltilmiş örnekler kullanılmıştır. Proteinlerin miktarı, yüksek hassaslıkta Gene Tools (SyngeneBioimaging, UK) ve ImageJ(<https://imagej.nih.gov/ij>) programı kullanılarak belirlenmiştir

4.8. RG2 Proteininin Farelerde İmmunojenisite Çalışmaları

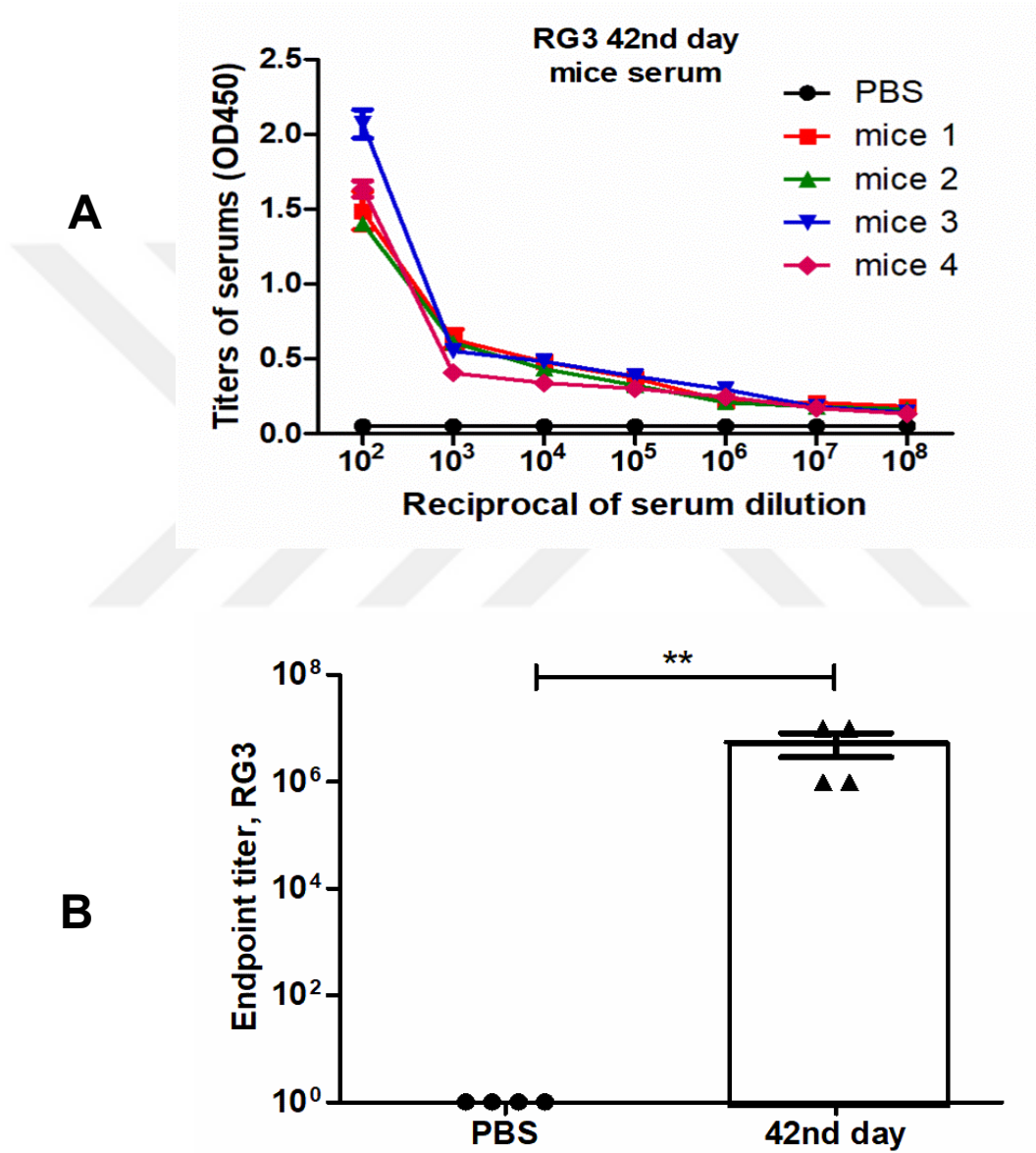
Fareler, üç haftalık aralıklarla (0, 21 gün) %0,3 Alhidrogel'e adsorbe edilmiş saflaştırılmış RG2 proteininden (5 μ g) iki doz aldı. Örnekler 42.günde (2. aşılama sonrası) toplandı ve bir IgG ELISA ile anti-RG2 antikor tepkileri açısından değerlendirildi. ELISA sonucuna göre, bitkide üretilen RG2 antijeninin farelerde oluşturduğu IgG yanıtları, farelerde alum adjuvanı ile önemli ölçüde daha yüksek antikor titrelerini indükleyebildiğini gösterdi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farelerde bitkide üretilen RG2 antijeninin immünojenite çalışması. Fareler, 0 ve 21 çalışma günlerinde IM olarak 5 ug (alumn ile) bitki tarafından üretilen RG2 proteini ile aşılandı. Çalışmanın 42. gününde (2. aşılardan sonra) örnekleri toplandı ve ELISA ile anti-RG2 IgG tepkileri için analiz edildi. A: 42. günden itibaren elde edilen bütün fare serumlarının farklı dilüsyonlarında RG2'ye özgü IgG'nin saptanması. B: 42. günde RG2'ye özgü farklı seyreltmelerle fare serumunda IgG titrelerinin saptanması. Grafikteki her nokta, her biri için üç kopyadan türetilmiştir. RG2 ile indüklenen serumların ve kontrol olarak PBS ile indüklenen serumların antikor tepkisini karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ($n=6$ fare/grup)

4.9.RG3 Proteininin Farelerde İmmunojenisite Çalışmaları

Bitkide üretilen RG3 proteini ile bağışıklaştırılmış farelerden elde edilen serumlarda üretilen anti-RG3 antikor tepkileri ELISA ile değerlendirildi. Bitkinin ürettiği RG3 antijeninin farelerde oluşturduğu IgG yanıtları önemli ölçüde daha yüksek antikor titrelerini indükleyebildiğini gösterdi (Şekil 4.12). 5 µg RG3 ile aşılanan fareler, aynı miktarda RG2 protein ile aşılanan ile karşılaştırıldığında daha yüksek titreli antikor ortaya çıkardı.



Şekil 4.12. Bir adjuvan olarak Alhydrogel kullanılarak bitki tarafından üretilen RG3 proteini ile immunize edilen farelerde ortaya çıkan IgG tepkileri. Fareler; 0. ve 21. çalışma günlerinde 5 µg bitki tarafından üretilen RG3 proteini ile aşılanmıştır. ELISA ile bitki tarafından üretilen RG2 proteinine özgü farklı seyreltmelerle fare serumundaki IgG titreleri tespit edildi. Grafikteki her nokta, her seyreltme için üç kopyadan türetilmiştir * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001

5. SONUÇLAR

G proteini membrane domainli bir protein olduğu için, ekspresyon sistemlerinde proteinin çözünür formunu üretmek çok zordur. Bu nedenle bu çalışmada G proteininin hem tam boyutlu kesilmemiş hemde kesik formlarını *N. benthamiana* bitkisinde başarıyla üretildi. Sonuçları: bitkilerde yüksek seviyede ve yüksek saflaştırma verimi ile kesilmiş G proteini formunun eksprese edilmesinin uygulanabilirliğini göstermektedir. Önemli olarak, bitki tarafından üretilen saflaştırılmış kesilmiş G proteini formu, önemli ölçüde daha yüksek antikor titreleri ortaya çıkarmaktadır. Trimerik RG3 ile immünize edilmiş fareler, aynı miktarda aşılanmış monomerik RG2 proteini ile karşılaştırıldığında daha yüksek titre antikoruna sahiptir. Bu nedenle, çalışmanın bulguları, *N. benthamiana* bitkisinde üretilen G proteininin kesilmiş formunun, kuduz virüsüne karşı umut verici, uygun maliyetli, yüksek oranda immünojenik ve güvenli bir aşı adayı olabileceğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

- An, G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol*, 79,568–570.
- Ashraf, S., Singh, P.K., Yadav, D.K. et al. 2005. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol*, 119(1):1-14.
- Chernet, B., Nejash, A. 2016. Review of rabies preventions and control. *Int. J. Life Sci*, 4(2): 293-301.
- Christou, P. 1996. Transformation technology. *Trends Plant Sci*, 1:423–431.
- Daniell, H.S., Chebolu, S., Kumar, S., Singleton, M., Falconer, R. 2005. Chloroplast derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*, 23(15): 1779.
- Davis, B.M., Rall, G.F., Schnell, M.J. 2015. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annu Rev Virol*, 2(1):451-71.
- Desai, P.N., Shrivastava, N., Padh, H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 28: 427–435
- Dhankhar, P., Vaidya, S.A., Fishbien, D.B., Meltzer, M.I. 2008. Cost effectiveness of rabies post exposure prophylaxis in the United States. *Vaccine*, 26: 4251–4255.
- Dhingra, V., Li, X., Liu, Y., Fu, Z.F. 2007. Proteomic profiling reveals that rabies virus infection results in differential expression of host proteins involved in ion homeostasis and synaptic physiology in the central nervous system. *J Neurovirol*, 13(2):107-17.
- Dietzschold, B., Faber, M., Schnell, M.J. 2003. New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert Rev Vaccines*, 2(3): 399–406.
- Dietzschold, B., Schnell, M., Koprowski, H. 2005. Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 292: 45-56.
- Fischer, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Means, N., Commandeur, U. 1999. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol Appl Biochem*, 30: 113–116.
- Fischer, R., and Emans, N. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, 9: 279–299.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R. M. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 152-158
- Fischer, R., and Buyel, J.F. 2020. Molecular farming - The slope of enlightenment. *Biotechnol Adv*,40:107519.
- Fletcher, M.A., Hessel, L., Plotkin, S.A. 1998. Human diploid cell strains (HDCCS) viral vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 93:97-107.
- Frank, J., Kaulfürst-Soboll, H., Rips, S., Koiwa, H., von Schaeuwen, A. 2008. Comparative analyses of Arabidopsis complex glycan1 mutants and genetic interaction with staurosporin and temperature sensitive3a. *Plant Physiol*, 148(3):1354-67.

- Freuling, C., Selhorst, T., Batza, H.J., Muller, T. 2008. The financial challenge of keeping a large region rabies-free the EU example. *Dev Biol*, 131:273–282.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Tuffereau, C., Knossow, M., Flamand, A. 1992. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*, 187:627–632.
- Gillet, J.P., Derer, P., Tsiang, H. 1986. Axonal transport of rabies virus in the central nervous system of the rat. *J Neuropathol Exp Neurol*, 45(6):619-34.
- Gleba, Y., Marillonnet, S., Klimyuk, V.Y. 2004 Engineering viral expression vectors for plants: the ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies. *Current opinion in Plant Biotechnology*, 7:182-188
- Gomord, V., Fitchette, A.C., Bouaouiche, M.L., Dupas, S.J.R., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (5): 564–587.
- HaÈgglund, P., Bunkenborg, J., Elortza, F., Jensen, O.N., Roepstorff, P. 2004. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J Proteome Res*, 3:556-66.
- Helenius, E., Boije, M., Niklander-Teeri, V., Tapio-Palva, E., Teeri, T. [online] Optimization of Gene Delivery into Arabidopsis, Tobacco and Birch Using the Helios™ Gene Gun System. *BioRad laboratories Tech Note*, 2453.
- Hori, H., and Elbein, A. D. 1981. Tunicamycin inhibits protein glycosylation in suspension cultured soybean cells. *Plant physiology*, 67(5): 882–886.
- Horn, M.E., Woodard, S.L., Howard, J. A. 2004. Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep*, 22: 711–720.
- Huang, H., Xiao, S., Qin, J. et al. 2011. Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice. *Arch Virol*, 156(5):753-8.
- Huang, F., Ahmad, W., Duan, M. et al. 2015. Efficiency of live attenuated and inactivated rabies viruses in prophylactic and post exposure vaccination against the street virus strain. *Acta Virologica*, 59:117–124.
- Kapila, J., De Rycke, R., van Montagu, M., Angenon, G. 1996. An Agrobacterium mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 122: 101 108
- Klimyuk, V., Pogue, G., Herz, S., Butler, J., Haydon, H. 2014. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magniffection' technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing. *Curr Top Microbiol Immunol*, 375:127-54.
- Knobel, D.L., Cleaveland, S., Coleman, P.G. et al. 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ*, 83(5):360-8
- Koraka, P., Bosch, B.J., Cox, M. et al. 2014. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. *Vaccine*, 32(36):4644-50.

- Kuzmin, I.V., Hughes, G.J., Botvinkin, A.D., Orciari, L.A., Rupprecht, C.E. 2005. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for Lyssavirus genotype definition. *Virus Res*, 111, 28–43.
- Leung, A.K., Davies, H.D., Hon, K.L. 2007. Rabies: Epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. *Advances in Therapy*, 24(6): 1340-1347
- Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., López, J. et al. 2012. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine*, 30: 5551-5556.
- Ma, J.K., Drake, P.M.W., Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews – Genetics*, 4:794-805.
- Macfarlan, R.I., Dietzschold, B., Koprowski, H. 1986. Stimulation of cytotoxic T lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Mol Immunol*, 23(7):733-41.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H. 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry*, 180:195-204.
- Mamedov, T., Gosh, A., Jones, R.M., Mett, V., Farrance, C.E., Musiychuk, K., et. al. 2012. Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnol. Journal*, 10 (7): 773-782.
- Mamedov, T., 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, J.A., Jones, R.M., Ghosh, A., Coffin, M.V., et al. 2016. Production of functionally active and immunogenic non-glycosylated protective antigen from Bacillus anthracis in *Nicotiana benthamiana* by co-expression with peptide-glycosidase F (PNGase F) of *Flavobacterium meningosepticum*. *PLoS One*, 11 (4): e0153956.
- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R., Hasanova, G. 2017. In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *Plos One*, 12 (8): e0183589.
- Mamedov, T., Musayeva, İ., Akcora R., Gun, N., Güleç, B., Mammadova G., Çiçek, K., Hasanova, G. 2019a. Engineering, and production of functionally active human Furin in *N. benthamiana* plant: In vivo post-translational processing of target proteins by Furin in plants. *Plos One*, 14 (3): e0213438.
- Mamedov, T., Cicek, K., Miura, K., Gulec, B., Akinci, E., Mammadova, G., Hasanova, G. 2019b. A Plant-Produced in vivo deglycosylated full-length Pfs48/45 as a Transmission-Blocking Vaccine Candidate against malaria. *Scientific Reports, Nature*, 9: 9868.
- Mamedov, T., Yuksel, D., Ilgin, M., Gurbuzaslan, I., Gulec, B., et al. 2021a. Plant Produced Glycosylated and In Vivo Deglycosylated Receptor Binding Domain

- Proteins of SARS-CoV-2 Induce Potent Neutralizing Responses in Mice. *Viruses*, 12;13(8):1595.
- Mamedov, T., Yuksel, D., Ilgin, M., Gürbüzasan, I., Gulec, B., Mammadova, G., Ozdarendeli, A., Yetiskin, H., Kaplan, B., Islam Pavel, S. T., Uygut, M. A., Hasanova, G. 2021b. Production and Characterization of Nucleocapsid and RBD Cocktail Antigens of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* Plant as a Vaccine Candidate against COVID-19. *Vaccines*, 9(11), 1337.
- Mamedov, T., Gurbuzaslan, I., Yuksel, D., Ilgin, M., Mammadova, G., Ozkul, A., Hasanova, G. 2021c. Soluble Human Angiotensin- Converting Enzyme 2 as a Potential Therapeutic Tool for COVID-19 is Produced at High Levels In *Nicotiana benthamiana* Plant With Potent Anti-SARS-CoV-2 Activity. *Front. Plant Sci*, 12:742875.
- Margolin, E.A., Strasser, R., Chopman, R., Williamson, A.M., Rybicki, E.P. 2020a. Engineering the Plant Secretory Pathway for the Production of Next-Generation Pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*. 38 (9): 1034-1044.
- Margolin, E., Oh, Y.J., Verbeek, M., Naude, J., Ponndorf, D. et al. 2020b. Co expression of human calreticulin significantly improves the production of HIV gp140 and other viral glycoproteins in plants. *Plant Biotechnol J*, 18:2109–2117
- Marillonnet, S., Giritich, 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. *PNAS*, 101:6852-6857
- McGarvey, P.B., Hammond, J., Dienelt, M.M. et al. 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, 13(13):1484-7.
- McGettigan, J.P., David, F., Figueiredo, M.D. et al. 2014. Safety and serological response to a matrix gene-deleted rabies virus-based vaccine vector in dogs. *Vaccine*, 32:1716–1719.
- Messeguer, J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. *PCTOC*, 73,201–212.
- Mett, V., Chichester, J.A., Stewart, M.L., Musiychuk, K., Bi, H. et al. 2011. A non-glycosylated, plant-produced human monoclonal antibody against anthrax protective antigen protects mice and non-human primates from *B. anthracis* spore challenge. *Human Vaccines* 7:183-190.
- Milek, R.L., DeVries, A.A., Roeffen, W.F., Stunnenberg, H., Rottier, P.J., Konings, R.N. 1998. Plasmodium falciparum: heterologous synthesis of the transmission blocking vaccine candidate Pfs48 / 45 in recombinant vaccinia virus-infected cells. *Exp. Parasitol*, 90, 165–174.
- Miura, K., Orcutt, A.C., Muratova, O.V., Miller, L.H., Saul, A., Long, C.A. 2008. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine*, 26(2):193-200.
- Muramatsu, T. 1971. Demonstration of an endoglycosidase acting on a glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 246(17): 5535-5537.
- Plotkin, S. et al. 2008. Rabies vaccines. *Vaccines*, 5th edition, 687–714.

- Prehaud, C., Takehara, et al. 1989. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology*, 173(2):390-399.
- Ramya, R., Verma, P.C., Chaturvedi, V.K., Gupta, P.K., Pandey, K.D., Madhanmohan, M., Kannaki, T.R., Sridevi, R., Anukumar B. 2009. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres: a potent oral delivery system to elicit systemic immune response against inactivated rabies virus. *Vaccine*, 27(15):2138-43.
- Ramya, R., Subramanian B. M., Sivakumar, V. et al. 2011. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. *Clin Vac Immunol*. 18(10).
- Reed, B. 2008. Plant cryopreservation a practical guide. *Springer*, 241.
- Rupprecht, C.E. and R.V. Gibbons. 2004. Prophylaxis against Rabies. *N. Engl. J. Med.*, 351: 2626-2635.
- Rupprecht, C.E., Nagarajan, T., Ert, H. 2016. Current Status and Development of Vaccines and Other Biologics for Human Rabies Prevention. *Expert Rev Vaccines*, 15(6):731-49.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., Lomonosoff, G.P. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J.*, 7;682–93.
- Schnell, M.J., McGettigan, J.P., Wirblich, C., Papaneri, A. 2010. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol*, 8(1):51-61.
- Spök, A., and Karner, S. 2008. Plant molecular Pharming – Opportunities and Challenges. *JRC Scientific and Technical Reports*, pp:14-23,37-49.
- Starodubova, E.S., Kuzmenko, Y.V., Pankova, E.O. et al. 2018. Rabies Virus Glycoprotein with a Consensus Amino Acid Sequence and a Lysosome Targeting Signal Causes Effective Production of Antibodies in DNA-Immunized Mice. *Mol Biol*, 52(2):314-317.
- Sudarshan, M.K., Mahendra, B.J., Madhusudana, S.N., et al. 2006. An epidemiological study of animal bites in India: results of a WHO sponsored national multi-centric rabies survey. *J Commun Dis*. 38(1):32–39.
- Tarentino, A.L., and Maley, F. 1976. Purification and properties of an endo-beta-N acetylglucosaminidase from hen oviduct. *Journal of Biological Chemistry*, 251(21): 6537-6543.
- Veluthambi, K., Gupta, A.K., Sharma, A. 2003. The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84(3):10.
- WHO (2005). World Health Organization, Expert consultation on rabies 1st report (No.931)
- WHO (2013). World Health Organization Expert consultation on rabies, 2nd Report (No. 982)
- Wujek, P., Kida, E., Walus, M., Wisniewski, K.E., Golabek, A.A. 2004. N glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem*, 26;279(13):12827-39.

- Wyatt J. 2007. Rabies-update on a global disease. *Pediatr Infect Dis J*, 26(4):351-2.
- Wydro, M., Kozubek, E., Lehmann, P. 2006. Optimization of transient *Agrobacterium* mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica*, 53(2): 289–298.
- Yang, D.K., Nakagawa, K., Ito, N. et al. 2014. A single immunization with recombinant rabies virus (ERAG3G) confers complete protection against rabies in mice. *Clin Exp Vaccine Res*, 3(2): 176–184.
- Yokomizo, A.Y., Jorge, S.A., Astray, R.M., Fernandes, I., Ribeiro, O.G. et al. 2007. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J*, 2(1):102-9.
- Yoo, J., Mashalidis, E.H., Kuk, A.C.Y., Yamamoto, K., Kaeser, B., Ichikawa, S., Lee, S.Y. 2018. GlcNAc-1-P-transferase-tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation. *Nat Struct Mol Biol*, 25(3):217-224.



ÖZGEÇMİŞ

GULSHAN MAMMADOVA

EĞİTİM BİLGİSİ

Doktora 2016-2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2003-2005	Azerbaycan Devlet Ekonomi Üniversitesi Emtia araştırması. Tüketim mallarının kalite incelemesi Fakültesi Kırmızı diploma ile mezun oldu
Lisans 1998-2001	Azerbaycan Devlet Ekonomi Üniversitesi Emtia araştırması. Tüketim mallarının kalite incelemesi Fakültesi Kırmızı diploma ile mezun oldu

YAYINLAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- Mammadova, G.**, Gurbuzaslan, I., Yuksel, D., Gun, N., Mutlu, N., Hasanova, G., Mamedov, T. 2021. Engineering, production, and immunogenicity studies of a truncated form of rabies virus glycoprotein produced in *Nicotiana benthamiana* plant. *Medicine Science/International Medical Journal*, Kabul edildi, Yayımlanmadı.
- Mamedov T, Yuksel D, Ilgin M, Gurbuzaslan I, Gulec B, Yetiskin H, Uygut MA, Islam Pavel S.T, Ozdarendeli A, **Mammadova G**, Say D, Hasanova G. 2021a. Plant-

- Produced Glycosylated and In Vivo Deglycosylated Receptor Binding Domain Proteins of SARS-CoV-2 Induce Potent Neutralizing Responses in Mice. *Viruses*, 12;13(8):1595.
3. Mamedov, T., Yuksel, D., Ilgin, M., Gürbüzaslan, I., Gulec, B., **Mammadova, G.**, Ozdarendeli, A., Yetiskin, H., Kaplan, B., Islam Pavel, S. T., Uygut, M. A., Hasanova, G. 2021b. Production and Characterization of Nucleocapsid and RBD Cocktail Antigens of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* Plant as a Vaccine Candidate against COVID-19. *Vaccines*, 9(11), 1337.
 4. Mamedov, T., Musayeva, İ., Akcora R., Gun, N., Güleç, B., **Mammadova G.**, Çiçek, K., Hasanova, G. 2019a. Engineering, and production of functionall yactive human Furin in *N. benthamiana* plant: *In vivo* post-translational processing of target proteins by Furin in plants. *Plos One*, 14 (3): e0213438.

