

## ARAŞTIRMA MAKALESİ

Potato virus S (PVS)-Bitlis izolatının Kılıf Proteinin *in silico* Karakterizasyonu ve Konak Proteini ile Docking AnaliziGülüstan KORKMAZ<sup>1</sup>  | Mustafa USTA<sup>1</sup>  | Serap DEMİREL<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye

Sorumlu Yazar  
Serap DEMİREL, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye  
Email:  
[serapdemirel@yyu.edu.tr](mailto:serapdemirel@yyu.edu.tr)

Bu çalışma Gülüstan Korkmaz'ın Doktora tezinden üretilmiştir.

## Özet

Patates virus S (PVS) dünya çapında yaygın olan virüslerden biridir ve patates bitkilerinde genellikle orta düzeyde belirtiler oluşturur. Viral proteinlerin konakçılarıyla etkileşimleri başarılı bir enfeksiyon oluşturmada ve sistemik yayılmayı sağlamada oldukça önemlidir. Bu çalışmada PVS'nün kılıf proteini (CP) ve patates bitkisi tarafından kodlanan savunma sisteminde yer alan PSH-RGH6 proteini arasındaki interaksiyon homoloji modelleme ve protein-protein docking yaklaşımı kullanılarak araştırılmıştır. PVS-Bitlis izolatının CP geni gen spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltıldı. İlgili gen pGEM-T Easy vektöre klonlandı ve PVS-Bitlis CP genini taşıyan plazmid sekanslandı. Elde edilen sekansa ait amino ait dizisi kullanılarak I-TASSER programı ile homolojiye ait protein modeli oluşturuldu. PSH-RGH6 proteini için Swiss-model programı kullanılarak proteine ait model oluşturuldu. Her iki proteine ait modeller arasında interaksiyon Chimera 1.15 programında AutoDock yaklaşımı ile araştırıldı. Docking sonucuna göre PVS-Bitlis CP ve PSH-RGH6 proteinleri arasında interaksiyon varlığı belirlenmiş olup bu interaksiyonun ayrıntılı analizler ile doğrulanması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** PVS, patates, protein-protein interaksiyonu, docking

***In Silico* Characterization of Coat Protein of PVS-Bitlis Isolate and Docking Analysis with Host Protein**

## Abstract

Potato virus S (PVS) is one of the common viruses worldwide and usually produces moderate symptoms in potato plants. The interactions of viral proteins with their hosts are very important in establishing a successful infection and ensuring systemic spread. In this study, the interaction between the PVS coat protein (CP) and the PSH-RGH6 protein in the defense system encoded by the potato plant was investigated using homology modeling and protein-protein docking approach. The CP gene of the PVS-Bitlis isolate was amplified by RT-PCR using gene-specific primers. The gene of interest was cloned into the pGEM-T Easy vector and the plasmid carrying the PVS-Bitlis CP gene was sequenced. By using the amino subsequence of the obtained sequence, I-TASSER program created a protein model based on homology. For the PSH-RGH6 protein, a model of the protein was created using the Swiss-model program. The interaction among both proteins was investigated with the AutoDock approach in Chimera 1.15 program. According to the docking results, the existence of interaction between PVS-Bitlis CP and PSH-RGH6 proteins has been determined and this interaction needs to be confirmed with further analysis.

**Key words:** PVS, potato, protein-protein interaction, docking

## GİRİŞ

Patates bitkisi yaklaşık 37 bitki virüsü tarafından enfekte edilmektedir (Valkonen, 2007). *Potato virus Y* (PVY) ve *Potato leaf roll virus* (PLRV) dünya çapında patates bitkisini enfekte eden iki önemli virüs iken, *Potato virus X* (PVX), *Patoto virus A* (PVA), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Potato mop-top virus* (PMVT) ve *Beet curly top virus* (BCTV) gibi farklı familyadaki virüsler tarafından da patates bitkileri enfekte edilmektedir (Kreuze ve ark., 2020). PVY, PLRV, PVS, ve AMV gibi bazı virüslerin Türkiye’de patateslerde varlığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 1990; Topkaya, 2020; Bostan ve Haliloğlu, 2004; Sertkaya ve ark., 2017). *Betaflexiviridae* familyasının *Carlavirus* cinsinin bir üyesi olan Patates virüs S (*Potato virus S*: PVS) patates bitkilerini dünya çapında enfekte eden yaygın virüslerden biridir (Gutiérrez ve ark., 2013). PVS tek başına patates bitkisinde tuber boyutunda azalmalara neden olurken, sebep olduğu verim kaybı az olmasına rağmen %20'lere kadar ulaşabilmektedir (Loebenstein ve ark., 2001). PVS genellikle patates bitkilerinde orta derecede semptomlara neden olurken bazen semptom göstermeksizin de patates bitkilerini latent olarak enfekte etmektedir (Lin ve ark., 2014). PVS patates bitkilerinde yapraklarda klorotik beneklenme ve alt yaprak yüzeyinde buruşukluğa neden olurken, PVS'nin bazı izolatları Petland Javelin gibi duyarlı patates çeşitleri üzerinde çok güçlü semptomlara neden olmaktadır (Salari ve ark., 2011; Rose, 1983).

PVS 3' ucunda bir poli A kuyruğu ve 5' ucu başlıklı (capped) yaklaşık 8.5 kb'lık tek iplikli pozitif-sens genomik RNA'ya sahiptir (Matousek ve ark., 2005). Genom 34 kDa'lık bir kılıf proteini (CP) ile kapsidlenmiştir (Monis ve ark., 1987; Foster, 1992). PVS, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis fabae* ve *A. nasturtii* de dahil olmak üzere birçok yaprak biti türü tarafından kalıcı olmayan (non-persistent) tarzda taşınmaktadır (Jones, 1980). Ancak mekanik yollarla veya vejetatif üreme ile etkili bir şekilde taşındığı rapor edilmiştir (Stevenson ve ark., 2001).

PVS'nin şimdiye kadar PVS<sup>0</sup> (ordinary) ve PVS<sup>A</sup> (Andean) olmak üzere iki ırkı tanımlanmıştır. PVS<sup>0</sup> *Chenopodium* türlerinde sistemik olmayan enfeksiyona neden olurken, PVS<sup>A</sup> ise sadece lokal lezyonlar ile sistemik enfeksiyona yol açmaktadır (Foster ve Mills, 1992). Bu farklılık PVS genomunda N-terminalde 7-kDa proteini kodlayan bölge, CP'nini kodlayan bölge (kılıf proteini) ve 3' ucunda 11-kDa'lık proteini kodlayan bölgedeki bazı değişimlerinden kaynaklanmaktadır (Cox ve Jones, 2010).

Bitkiler, patojen türevli efektörlerin tanınması üzerine konakçıya özgü savunma tepkilerini tetikleyen, dayanıklılık (R) genleri tarafından kodlanan hücre dışı ve hücre içi bağışıklık reseptörlerinden oluşan hücre otonom çok katmanlı bir bağışıklık sistemi geliştirmiştir (Dodds ve Rathjen, 2010). Bilinen R genlerinin çoğu patojenin direkt ya da indirekt olarak tanınmasından sorumlu nükleotit bağlanma dizisi (nucleotide-binding site; NB), lösince zengin tekrar domaini (leucine-rich-repeat domain; LRR) ve sarmal bobin domaini (coiled-coil domain) içeren hücre içi NB-LRR reseptörlerini kodlamaktadır (DeYoung ve Innes, 2006). Gpa2 ve Rx1 patatesin aynı R gen kümesinde yer alan CC-NB-LRR'ye oldukça benzer iki gendir (Slootweg ve ark., 2017). Rx1 geninin *Potato virus X* (PVX)'e karşı dayanıklılık sağladığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Bendahmane ve ark., 1999; Van Der Vossen ve ark., 2000).

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte virüs ve bitki arasındaki rakabetin moleküler düzeyde anlaşılması virüslere dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi için bitki ıslah programlarına yeni stratejilerin kazandırılmasına olanak sağlamıştır (Akhter ve ark., 2021). Birçok araştırma virüs tarafından kodlanan proteinler ile konukçu bitki tarafından kodlanan proteinler arasındaki etkileşimin konukçu dayanıklılığını arttırdığını ortaya koymuştur (Maiti ve ark., 2012; Uchiyama ve ark., 2014; Koeda ve

ark., 2021). Bilgisayar tabanlı teknoloji ile birlikte biyoinformatik yaklaşımları içerisine alan *in silico* analizler birçok organizmaya ait nükleotit veya protein sekans verilerinin kullanımına olanak sağlayarak genlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına, yeni genlerin ortaya çıkarılmasına ya da moleküler arası etkileşimin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Demirel, 2021). Farklı araştırmacılar çeşitli virüslerin kılıf proteini ile R genleri arasındaki etkileşim sayesinde bitkide patojene karşı dayanıklılık sağlandığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada patates bitkisini doğal olarak enfekte eden PVS'nin kılıf proteini ve konukçusu olduğu patates bitkisi tarafından kodlanan Rx1/Gpa2 resistance-like protein grubundan olan PSH-RGH6 direnç proteini arasındaki etkileşim araştırılmış olup, PVS'nin kılıf proteinine ait bazı biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Bitki materyali ve Total RNA ekstraksiyonu

Türkiye'nin Bitlis ili Ahlat ilçesinden virüs symptomu gösteren ve göstermeyen patates bitkilerinin yaprakları toplanarak soğuk zincir içerisinde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarına getirilerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Yapraklardan total RNA izolasyonu Foissac ve ark. (2001) tarafından geliştirilen silika temelli metoda göre gerçekleştirilmiştir.

### PVS kılıf protein (CP) geninin çoğaltılması ve klonlanması

cDNA sentezi daha önce elde edilen total RNA kullanılarak ticari kit prosedürüne göre gerçekleştirildi (RevertAid First Strand cDNA kit, Vilnius, Thermo-Fermentas). Gen spesifik PVS-CP F-5'CCTTTAGGTTACAGGTAA-3' ve PVS-CP R-5'TCATTGGTTGATCGCATT-3' primerler, PVS CP geninin çoğaltılması için kullanıldı. PCR reaksiyonu toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi; 1 µl Forward primer, 1 µl Revers primer, 5 µl 10X reaksiyon buffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 3 µl cDNA, 0.5 Thermo Taq DNA polimeraz ve 34.5 µl nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O. PCR reaksiyonu döngü koşulları sırasıyla; 1 döngü 94 °C'de 2 dk ön denaturasyon ile başlayarak 35 döngü 94 °C'de 30 sn denaturasyon, 55 °C'de 30 sn bağlanma, 72 °C'de 30 sn uzama olacak şekilde ve son olarak 1 döngü 72 °C'de uzama şeklinde gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda PCR ürünleri %1'lik (w/v) agaroz jel elektroforezinde koşuturuldu ve beklenen bant uzunluğu jelden kesilerek GeneJet agaroz jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırıldı (Kat. No: K0691, Thermo). Saflaştırılan DNA parçaları pGEM-T Easy vektöre üretici firmanın belirttiği şekilde klonlandı. Klonlama sonrasında oluşan kolonilerden mavi-beyaz seleksiyona dayalı olarak rekombinant olduğu varsayılan bakteri klonileri seçilerek GeneJet Plasmid Miniprep ticari kite (Thermo Scientific, USA) göre plazmidler saflaştırıldı. Seçilen plazmidlerde genin varlığı gen spesifik primerler ile doğrulandı. (Şekil 1). Plazmidler ticari bir firma aracılığıyla yeni nesil sekanslama (NGS) ile dizilendi (Sentebiolab, Ankara).

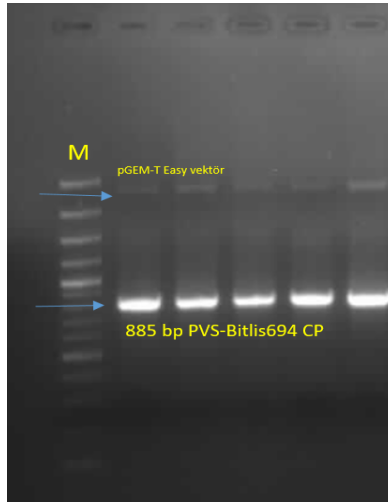
### *In silico* Analizler ve Protein-Protein Docking

Bitlis-PVS CP nükleotit sekansı ile EXPASY (Expert Protein Analysis System) aracı (<https://web.expasy.org/translate/>) kullanılarak amino asit sekansı elde edildi. CP nükleotid sekansı kullanılarak NCBI web sitesinde BLASTn'de (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analiz edildi. Bitlis-PVS CP'ye ait amino asit sekansı, COBALT çevirim içi program'da NCBI veri bankasından elde edilen patates bitkisini enfekte eden bazı PVX, PVY, PVA, PVS ve PLRV izolatlarının CP sekansı çoklu sekans hizalama (Multiple sequence alignment) ile hizalandı ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)) ve Prosite'da (<https://prosite.expasy.org/>) protein motifi araştırıldı. Bitlis-PVS CP'nin kimyasal kompozisyonu ProtPatram programı

(<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanılarak analiz edildi. Bitlis-PVS CP'nin protein homoloji modellemesi I-TASSER aracı (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) kullanılarak sekans homolojisine dayalı olarak model oluşturuldu. Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) aracı kullanılarak patatese ait NCBI'dan elde edilen "ABY61745.1" kodlu resistance protein PSH-RGH6 için de model geliştirildi. Geliştirilen modellerin pdb dosyası Rasmol programı (<http://www.openrasmol.org/doc/rasmol.html>) kullanılarak oluşturuldu. Bitlis-PVS CP ve PSH-RGH6 proteinine ait pdb. uzantılı dosyalar ile Chimera 1.15 programı kullanılarak protein-protein interaksiyonları belirlenmeye çalışıldı.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Bitlis'den toplanan PVS izolatının RT-PCR sonucunda CP genine ait yaklaşık 885 bp uzunluğunda DNA bandı elde edildi ve klonlandı. Klonlama sonrası rekombinant plazmidler gen spesifik primerler ile insörtü içermesi bakımından PCR ile doğrulandı ve sekanslandı. (Şekil 1).



**Şekil 1.** PVS-Bitlis 694 izolatının kılıf proteini genine ait PCR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü  
**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis image of coat protein gene of PVS-Bitlis 694 isolate after PCR

Blastın sonucuna göre Bitlis PVS izolatı Çin'den PVS izolatı (KU896945.1) ile %98.76 maksimum benzerlik gösterirken, Tanzania'dan PVS izolatı (KC866620.1) ile %95.70 minimum benzerlik göstermiştir (Çizelge 1). Bitlis PVS izolatının kılıf protein genine ait nükleotit sekansı NCBI veri tabanına *Potato virus S* Bitlis 694 izolat adı altında MZ543312 erişim numarası ile girilmiştir (Şekil 2).

```

ATGCCGCCAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGACACCACAACTGTGCCGCTTGCGCCGCCGCCAGG
AATGTAGAGGAGCATAGAGCTGGCCAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAG
GCTCATCAGATTGATTGAACCTATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTGAGATAG
GTAGGCCCTCACTTGAGCCGACCCCTGAAATGCGGAGGAATCCGGAGAACCATACTCGCGGTTTTCAATAGA
TGAGCTGTTCAAGATGGAGATCCGATCTGTGTCCAACAACATGGCGAACCCGAGCAAATGGCACAGATCACT
GCTGACATCGCTGGACTTGGGGTCCCACTGAACATGTTGCAGGGGTCATACTGAAAGTGGTGATCATGTGCG
CAAGCGTGAGTAGTTCGGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTGGAGTTCCTCAACGGGCGCAGTGCCTTGGGA
CTCGATCATTGCAATTATGAAGAATCGCGGGGATTGAGGAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCGGTCTGTGG
AATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCCAATGGAATGCACGCTTCG
CCGATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGAGCTGCAATCCAGCCGTAGAGGGGCTCATACTAGGCC
CACACCTGAGGAAACAATAGCTCACAATGCCACAAGAGTATGGCAATTGACAAGTCAACAGAAATGAGCG
ATTGGCCAACACTAATGTTGAGTACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCG
ATCAACCAATGA

```

**Şekil 2.** PVS-Bitlis 694 izolatının CP geninin nükleotit sekansı  
**Figure 2.** Nucleotide sequence of the CP gene of PVS-Bitlis 694 isolate

*Potexvirus*'lerde ve *Carlavirus*'lerde kılıf proteinini kodlayan bölgede (R/K)FA(G/A)FDXFXVXXXAA motifi oldukça korunmuştur (Abouhaidar ve Lai, 1989; Rupazov ve ark., 1989). Protein hizalama ve Prosite sonuçları bu motifin NCBI'dan alınan bazı PVS izolatları ve bu çalışmada karakterize ettiğimiz PVS-Bitlis izolatında da korunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3).

PVS (AUR45184.1)	MPPKPDPTSSGEIPQAVLAPPPRNVEE	HRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIG	73
PVS (QNQ79391.1)	MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPRNVEE	HRVGPSQGHGPNNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIG	156
PVS (QTZ21729.1)	MPPKPDPTSSGETPQATPLVPPRNVEE	HRVGPSEGPRQNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIG	73
PVS (QTZ21728.1)	MPPKPDPTSSGETPQAIPLVPPRNVEE	HRVGPNEGPRQNEETMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIG	73
PVS-Bitlis	MPPKPDPTSSGETPQTVLAPPPRNVEE	HRAGPNQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIG	73
PVX (QTZ21735.1)	-----	-----GSTTSTTTKTAG	12
PVX (Q85249)	-----	-----MTTPASTTQAAGSTTSTNTATAG	23
PVY (Q99026_9POTV)	-----	[2]DTIDAGGSTKDAKQEQGSIQPNLNGG---KEKDVNVGTSGHTV	44
PLRV (CAA32106.1)	-----	MST[5]NVNGGVQPPRRRRRQLRRRANRVQPVVMTASGQPPRRRRRRGG	53
PVA (CAA63031.1)	LYTNVHPTSTELEKYSIQFDEQMEEDD[6]ETLDASEALAQKSEGRKKEGESNSSKAVAVKDKDVLGTAGTHSV		82
PVS (AUR45184.1)	RPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSI-DELFKMEIRSV--SNNMANTEQMAQ-ITADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVS		149
PVS (QNQ79391.1)	RPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSI-DELFKMEIRSV--SNNMANTEQMAQ-ITADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVS		232
PVS (QTZ21729.1)	RPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSI-DELFKMEIRSV--SNNMANTEQMAQ-ITADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVS		149
PVS (QTZ21728.1)	RPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSI-DELFKMEIRSV--SNNMANTEQMAQ-ITADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVS		149
PVS-Bitlis	RPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSI-DELFKMEIRSV--SNNMANTEQMAQ-ITADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVS		149
PVX (QTZ21735.1)	ATPAT-----ASGLFTIpDGDFFSTARAIVASNAVATNEDLSK-IEAIWKDMKVPDPTMAQAAWDLVRHCADVG		80
PVX (Q85249)	ATPATISTTAGATSAQASGLFTVpDGDFFSTAKAVVASNAVATNEDLTK-IQEIKWDMKVPDPTMAQAAWDLVRHCADVG		102
PVY (Q99026_9POTV)	PRIKAITSKMRMPKSKGAAVLNL-KHLLIYAPQQIDISNTRATQSQFDtwYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCIENG		123
PLRV (CAA32106.1)	NRRSRRGTGVPGRGSSSETFVFTK-DNLMGNSQGSFTFGPSLSDCPAFKD-----GILKAYHEYKITSILLQFVSEA		123
PVA (CAA63031.1)	PRLKSMTSKLTLPLMKGKSVVNL-DHLLSYKPKQVDSLNRATHEQFQnWYDGVMASYELEESSMEIILNGFMVRCIENG		161
PVS (AUR45184.1)	SSVYLDPAGTVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNR	FA--AFD	223
PVS (QNQ79391.1)	SSVYLDPAGTVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNR	FA--AFD	306
PVS (QTZ21729.1)	SSVYLDPAGTVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNR	FA--AFD	223
PVS (QTZ21728.1)	SSVYLDPAGTVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNR	FA--AFD	223
PVS-Bitlis	SSVYLDPAGTVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNR	FA--AFD	223
PVX (QTZ21735.1)	SSAQTEIDTGPYSNG-ISRRARLAAAIKEVCTLRQFCMKYAPVVWNYMLTNNSPANWQAQGFKEPHK	FA--AFD	153
PVX (Q85249)	SSAQTEIGTGPYSNG-VSRARLAAAIKEVCTLRQFCCKYAPVVWNYMLTNNSPASWQAQGFKEPHK	FA--GFD	175
PVY (Q99026_9POTV)	TSPNINGVWMMMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNL	lgsIA-ryAFD	202
PLRV (CAA32106.1)	SSTSSGSIAYELDPHC--KVSSLQSYVNFQITKGGAKTYQARMINGVEWHDSSEDQCRIL-WKGNKG---SSdta--GS		195
PVA (CAA63031.1)	TSPDINGVWTMMDNEEQVSYPLKPMLDHAKPSLRQIMRHSALAEAYIEMRSREKPYMPRCGLQRNL	lgsIA-ryAFD	240
PVS (AUR45184.1)	FDYVTNCAAVQPVVEGLIRRPTPEETIAHNAHKSMAIDKSN-RNERLANTNVEYTGGMGLGAEIVRNHRNAINQ-		294
PVS (QNQ79391.1)	FDYVTNCAAVQPVVEGLIRRPTPEETIAHNAHKSMAIDKSN-RNERLANTNVEYTGGMGLGAEIVRNHRNAINQ-		377
PVS (QTZ21729.1)	FDYVTNCAAIQPVVEGLIRRPTPEETIAHNAHKSMAIDKSN-RNERLANTNVEYTGGMGLGAEIVRNHRNAINQ-		294
PVS (QTZ21728.1)	FDYVTNCAAIQPVVEGLIRRPTPEETIAHNAHKSMAIDKSN-RNERLANTNVEYTGGMGLGAEIVRNHRNAINQ-		294
PVS-Bitlis	FDYVTNCAAIQPVVEGLIRRPTPEETIAHNAHKSMAIDKSN-RNERLANTNVEYTGGMGLGAEIVRNHRNAINQ-		294
PVX (QTZ21735.1)	FNGVTNFAAIMPKEGLIRPPSEAMN-----		179
PVX (Q85249)	FDYVTNFAAIMPKEGLMRPPSEAMNAAQTAAFVKITKARaQSSDFASLDAAVTRGRITGTTVAEAVVTLPpp		248
PVY (Q99026_9POTV)	YE-VTSRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGISTqEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM-----		267
PLRV (CAA32106.1)	FRVTIRVAQNPK-----		208
PVA (CAA63031.1)	YE-ITATPIRAKEAHLQMKAALKNSNTNMFGLDGNVTTsEEDTERHTATDVNRNMHLLGVKGV-----		305

**Şekil 3.** Cobalt çoklu protein sekans hizalama (Mavi çizgili kutucuklar *Potexvirus* ve *Carlavirus*lerde kılıf proteinine ait motif dizisini göstermektedir)

**Figure 3.** Cobalt multiprotein sequence alignment (Boxes with blue lines indicate the motif sequence of the coat protein in *Potexvirus* and *Carlavirus*es)

**Çizelge 1.** Bitlis PVS izolatu ile diğ er izolatlar arasındaki Blast sonucu**Table 1.** Blast result between Bitlis PVS isolate and other isolates

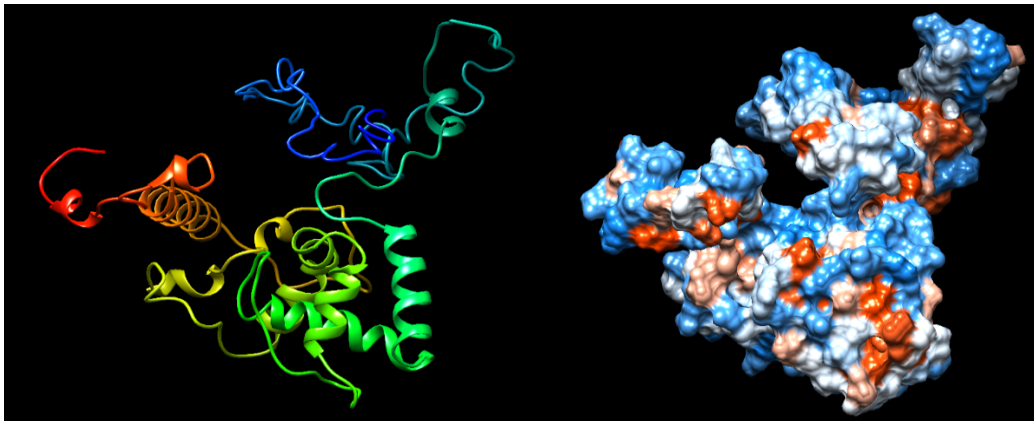
Örnek No	Erişim Numarası	Konak	Ülke	Sorgulama Kapsamı	Benzerlik
1	MZ543312	Patates	Türkiye	referans	referans
2	KU896945	Patates	Çin	%100	%98.76
3	FJ813512.1	Patates	Amerika Birleşik Devletleri	%100	%98.08
4	LC511874.1	Patates	Rusya	%100	%97.85
5	LC511880.1	Patates	Rusya	%100	%97.74
6	MN966671.1	Patates	Kanada	%100	%97.74
7	JX183950.1	Patates	Amerika Birleşik Devletleri	%100	%97.63
8	HG518649.1	Patates	Macaristan	%100	%97.51
9	AB451180.2	Patates	Japonya	%100	%97.40
10	LN794161.1	Patates	Macaristan	%100	%97.29
11	GU144325.1	Patates	Birleşik Krallık	%100	%96.84
12	MF773981.1	Kızılback	İran	%100	%96.61
13	LC513152.1	Patates	Rusya	%100	%96.27
14	MF773980.1	Kazayağı	İran	%99	%96.15
15	MF418030.1	Patates	Hollanda	%100	%96.05
16	MK442089.1	Patates	Kazakistan	%100	%95.93
17	MN689451.1	Patates	Kenya	%100	%95.93
18	GU319954.1	Patates	Avustralya	%100	%95.93
19	MN689450.1	Patates	Kenya	%100	%95.82
20	KY523839.1	Patates	İran	%100	%95.71
22	MN689463.1	Patates	Kenya	%100	%95.71
23	KC866620.1	Patates	Tanzanya	%99	%95.70

Cobalt hizalama sonucu patates bitkisini enfekte eden *Potexvirus* ve *Carlavirus* cinsine ait virüslerde amino asit sekansları N-terminal ve C-terminal bölgede farklılıklar gösterse de çoğunlukla korunmuş olduğunu ortaya koymuştur. Mackenzie ve ark. (1989) *Potexvirus*lerde kılıf protein sekansının merkezi kısmının yüksek homolojiye sahip olduğunu belirtmiştir. PVS-Bitlis izolatu nın 150. amino asitinden başlayan ve 223. amino asit sekansına kadar olan bölge *Potyvirus*lerden olan PVY ve PVA ile *Polerovirus*lerden olan PLRV viruslerinde de büyük oranda homoloji göstermektedir. PVS-Bitlis izolatu nın kılıf proteini ProtParam'a göre kimyasal kompozisyonu ele alındığında 294 amino ait içermektedir. Toplam negatif (Asp + Glu) ve pozitif yüklü (Arg + Lys) residue sırasıyla 31 ve 29 dur. PVS-Bitlis CP'nin teorik izoelektrik noktası (pI) ve toplam atom sayısı sırasıyla 6.40 ve 4547 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 2). PVS-Bitlis izolatu nın CP sekansı çoğunlukla alanin (%9.2), prolin (%8.5), asparajin (%7.8), glutamik asit (%7.5) ve arjinin (%7.1) amino asitlerinden oluşmaktadır.

**Çizelge 2.** PVS-Bitlis izolatına ait CP proteininin tahmin edilen fizyolojik ve kimyasal parametereleri**Table 2.** Predicted physiological and chemical parameters of CP protein of PVS-Bitlis isolate

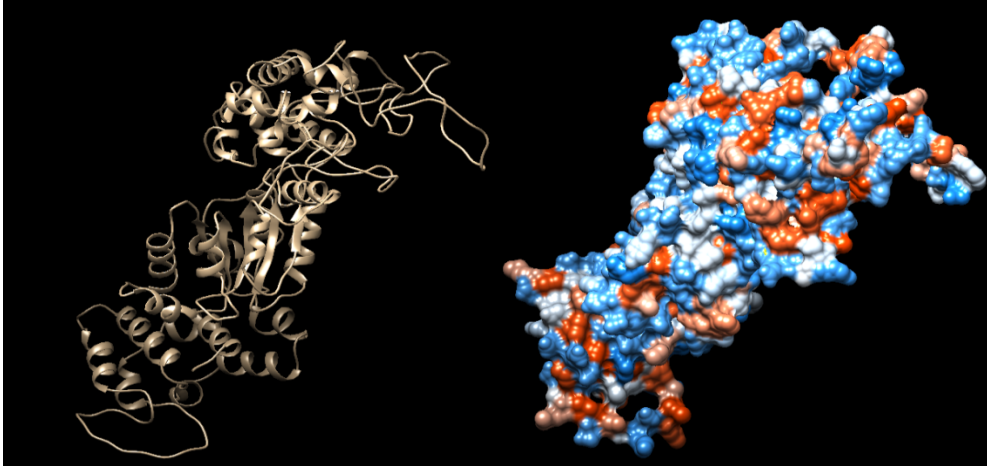
Fizyolojik ve kimyasal parametreler	Değer
Amino asit sayısı	294
Moleküler ağırlığı	32579.03
Teoriksel pI	6.40
Negatif yüklü residue'lerin toplam sayısı (Asp + Glu)	31
Pozitif yüklü residue'lerin toplam sayısı (Arg + Lys)	29
Yok olma katsayısı:	0.785, tüm Cys kalıntılarının azaldığı varsayıldı
İnstabilite indeksi	50.89 (Bu değer proteini kararsız olarak nitelendirmekte)
Alifatik indeks:	77.99
Hidropatisite (Grand average of hydropathicity; GRAVY)	-0.411
Toplam atom sayısı	4547

I-TASSER'de sekans homolojisine dayalı model oluşturmada kullanılan kalıplar (templates) ve özellikleri Çizelge 3'de verilmiştir. I-TASSER'de bu kalıplara dayalı olarak model oluşturulmuştur. PVS-Bitlis CP'nin homoloji modellemesinde program tarafından tahmin edilen 5 modelden en yüksek C-skor ve TM-skor değerlerine sahip model ele alınmıştır. -2.72 C-skor ve  $0.40 \pm 0.14$  TM-skor değerlerine sahip model-1 seçilerek Rasmol programında pdb. uzantılı dosya oluşturulduktan sonra Chimera 1.15 programında protein yapısı görselleştirilmiştir (Şekil 4). PSH-RGH6 proteini için Swiss-model programında oluşturulan modeller arasında GMQE değeri en yüksek olan model seçilerek pdb. uzantılı dosyası elde edilmiştir. Oluşturulan modeller arasında model-1 0.53 ile en yüksek GMQE değerine sahiptir. Seçilen bu model kodu 6j5t.1C olan hastalık direnci ilişkili protein 4 (disease resistance RPP13-like protein 4) isimli kalıp kullanılarak oluşturulmuştur. Rx1/Gpa2 dayanıklılık benzeri protein grubundan PSH-RGH6 proteinine ait pdb. uzantılı dosya Chimera 1.15 programı ile görselleştirilmiştir (Şekil 5).



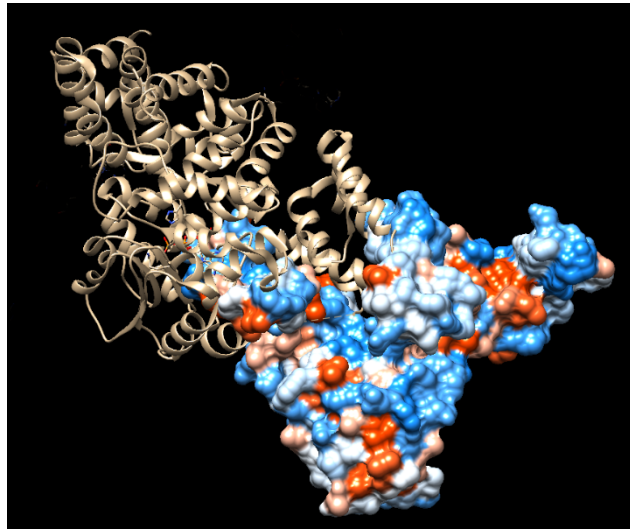
**Şekil 4.** PVS-Bitlis CP'ye ait sekans homolojisine bağlı olarak oluşturulan 3D protein yapısı; A: Ribbon diyagramına dayalı gösterim, B: Hidrofobik yüzeye bağlı gösterim

**Figure 4.** 3D protein structure created depending on the sequence homology of PVS-Bitlis CP; A: Ribbon diagram based representation, B: Hydrophobic surface dependent representation



**Şekil 5.** PSH-RGH6 (ABY61745.1) proteininin sekans homolojisine dayalı olarak oluşturulan 3D protein yapısı; A: Ribbon diagramına dayalı gösterim, B: Hidrofobik yüzeye bağlı gösterim  
**Figure 5.** 3D protein structure created based on the sequence homology of the PSH-RGH6 (ABY61745.1) protein; A: Ribbon diagram based representation, B: Based on hydrophobic surface

Son zamanlarda geliştirilen bilgisayar tabanlı araçlar moleküller arasında interaksiyonun araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Docking yaklaşımı protein-protein, ligand-reseptör, hormon-reseptör gibi moleküller arasındaki interaksiyonu açığa çıkarmaktadır. Mevcut çalışmada Chimera 1.15 programı kullanılarak PVS-Bitlis CP ve PSH-RGH6 proteinleri arasında bir interaksiyon olup olmadığı AutoDock ile araştırılmıştır. Şekil 6 'da her iki proteine ait docking sonucu gösterilmiştir.



**Şekil 6.** PVS-Bitlis CP ve PSH-RGH6 proteinlerinin Docking sonucunun 3D görüntüsü  
**Figure 6.** 3D image of Docking result of PVS-Bitlis CP and PSH-RGH6 proteins

Bitki ve bitkiyi enfekte eden virüsler arasında moleküler düzeyde interaksiyonun ortaya çıkarılması adına çalışmalar literatürde sınırlı sayıdadır. Rashid ve ark. (2020) *Sesbania mosaic virus* (SeMV)'ün kılıf proteini konukçusu olduğu bitkilerde interaksiyonu *in silico* olarak araştırmıştır. Çalışmada viral enfeksiyonun erken aşamasında virüsün CP proteini ile lektin proteinin yüksek oranda interaksiyon gösterdiği rapor edilmiştir. Amirnia ve ark. (2016) domatesi enfekte eden *Beet curly top Iran virus*'ünün genomu ve domateste bulunan microRNAlar arasındaki interaksiyonu çalışmış olup, mir319, mir1919 ve mir159'un virüsün genomu ya da transkriptlerini hedef alabileceğini *in silico* olarak göstermişlerdir. SnRK1 proteini ve Begomovirüsler tarafından kodlanan BC1 proteini arasındaki interaksiyonun bitki dayanaklığında, virüsün enfeksiyon döngüsünde ve begomovirüslerin



taşınımında rol oynadığı rapor edilmiştir (Mandadi ve ark., 2013; Rizvi ve ark., 2014). Nova ve Jamsari (2019), docking yaklaşımı ile *Pepper yellow leaf curl virus* (PepYLCV-BC1) ve pepper-SnRK1 proteini arasında interaksiyonun mevcut olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada da docking sonucuna göre PVS-Bitlis CP ve PSH-RGH6 proteini arasında interaksiyonun mevcut olduğu görülmektedir.

## SONUÇ

Rx1/Gpa2 direnç protein benzeri olan PSH-RGH6 proteini farklı amino asit dizileri arasında farklı domainleri içermektedir. 2-115 amino asit bölgesi PVX dayanıklılığında sorumlu coiled-coil domainini kodlarken, 143-240 amino asit bölgesi ATPase domainini ve 150-422 amino asit bölgesi NB-ARC domainini kodlamaktadır. 729-744, 754-778, 779-801 ve 802-825 amino asit bölgeleri proteinin leucine-rich repeat yapısal motif bölgesini oluşturmaktadır. Çalışmada iki protein arasında etkileşim olduğu gösterilmiş olup, PSH-RGH6 ve PVS-Bitlis CP arasındaki bağlanma noktalarının ayrıntılı olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular konukçu ve virüs arasında moleküler düzeyde etkileşimin anlaşılmasında ve dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde kullanılan genlerin manipülasyonuna olanak sağlayan CRISPR/cas teknolojisi için bilgi sağlayabilir.

## YAZAR KATKILARI

Yazarların her biri makaleye eşit olarak katkı sağlamışlardır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gülüstan Korkmaz'ın Doktora tezinden üretilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abouhaidar, M. G., & Lai, R. (1989). Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of clover yellow mosaic virus RNA. *Journal of general virology*, 70(7), 1871-1875.
- Akhter, M., Nakahara, K. S., & Masuta, C. (2021). Resistance induction based on the understanding of molecular interactions between plant viruses and host plants. *Virology journal*, 18(1), 1-12.
- Amirmia, F., Eini, O., & Koolivand, D. (2016). In silico analysis of microRNA binding to the genome of Beet curly top Iran virus in tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(17-18), 434-444.
- Bostan, H., & Haliloglu, K. (2004). Distribution of PLRV, PVS, PVX and PVY (PVYN, PVYO and PVYC) in the seed potato tubers in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(7), 1140-1143.
- Cox, B. A., & Jones, R.A. (2010). Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archives of virology*, 155(7), 1163-1169.
- Demirel, F. (2021). Soyada Protein Disülfit İzomeraz'ların İn Silico Analizi. *Journal of Agriculture*, 4(1), 48-56.
- DeYoung, B. J., & Innes, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature immunology*, 7(12), 1243-1249.
- Dodds, P.N., & Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548.

- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit P., Dulucq, M.J. & Candresse T. (2001). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo, and Foveaviruses by nested RTPCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *ActaHorticulturae*, 550:37–44.
- Foster, G.D. (1992). The structure and expression of the genome of carlaviruses. *Research in Virology*, 143, 103-112.
- Foster, G.D., & Mills, P.R. (1992). The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of potato virus S. *Virus genes*, 6(3), 213-220.
- Gutiérrez, P.A., Alzate, J.F., &Marín-Montoya, M.A. (2013). Complete genome sequence of a novel Potato virus S strain infecting Solanum phureja in Colombia. *Archives of virology*, 158(10), 2205-2208.
- Jones, R.A.C. (1980). The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean region of South America. *Proceedings... Pest, pathogens, and vegetations*.
- Koeda, S., Onouchi, M., Mori, N., Pohan, N. S., Nagano, A. J., & Kesumawati, E. (2021). A recessive gene pepy-1 encoding Pelota confers resistance to begomovirus isolates of PepYLCIV and PepYLCAV in Capsicum annum. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-18.
- Lin, Y.H., Abad, J. A., Maroon-Lango, C.J., Perry, K.L., & Pappu, H.R. (2014). Molecular characterization of domestic and exotic potato virus S isolates and a global analysis of genomic sequences. *Archives of virology*, 159(8), 2115-2122.
- Loebenstein, G., Berger, P.H., & Brunt, A.A. (Eds.). (2001). *Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*. Springer Science & Business Media.
- Mackenzie, D.J., Tremaine, J.H., & Stace-Smith, R. (1989). Organization and interviral homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA. *Journal of general Virology*, 70(5), 1053-1063.
- Maiti, S., Paul, S., & Pal, A. (2012). Isolation, characterization, and structure analysis of a non-TIR-NBS-LRR encoding candidate gene from MYMIV-resistant Vigna mungo. *Molecular biotechnology*, 52(3), 217-233.
- Mandadi, K.K., &Scholthof, K.B.G. (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease?. *The plant cell*, 25(5), 1489-1505.
- Matoušek, J., Schubert, J., Ptáček, J., Kozlová, P., & Dědič, P. (2005). Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome. *ActaVirol*, 49, 195-205.
- Monis, J., Daniels, S., Dezoeten, G., & Slack, S.A. (1987). Characterization of Potato VIRUS-S (PVS) Genomic RNA. In *Phytopathology* (Vol. 77, No. 12, pp. 1742-1742).
- Nova, B., & Jamsari, J. (2020, April). In silico analysis of PepYLCV-βC1 protein interaction with pepper-SnRK1 for pathogenicity prediction. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 497, No. 1, p. 012027). IOP Publishing.
- Rashid, M., Mittal, S., & Venkataraman, S. (2020). Analysis of host protein interactions in plant viruses: an in silico study using Sesbania mosaic virus. *Virus genes*, 56(6), 756-766.
- Rizvi, I., Choudhury, N.R., & Tuteja, N. (2015). Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Archives of virology*, 160(2), 375-387.
- Rose, D. G. (1983). Some properties of an unusual isolate of potato virus S. *Potato research*, 26(1), 49-62.
- Rupazov V.V., Morozov S. Yu., Kanyuka K.V., Zavriev S.K. (1989). Partial nucleotide sequence of potato virus M RNA shows similarities to potexviruses in gene arrangement and the encoded amino acid sequences. *Journal of General Virology* 70:1861–1869

- Salari, K., Massumi, H., Heydarnejad, J., Pour, A. H., & Varsani, A. (2011). Analysis of Iranian Potato virus S isolates. *Virus Genes*, 43(2), 281-288.
- Sertkaya, G., Çarpar, H., & Sertkaya, E. (2017). Hatay ili patates üretim alanlarında yonca mozaik virüsü (Alfalfa Mosaic Virus: AMV)'nün araştırılması. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(1), 23-29.
- Slootweg, E., Koropacka, K., Roosien, J., Dees, R., Overmars, H., Lankhorst, R. K., ...& Goverse, A. (2017). Sequence exchange between homologous NB-LRR genes converts virus resistance into nematode resistance, and vice versa. *Plant physiology*, 175(1), 498-510.
- Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D., & Weingartner, D.P., eds. (2001). *Compendium of Potato Diseases*, 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Topkaya, Ş. (2020). Determination of some viruses by serological and molecular techniques in potato production areas in Tokat Province. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37(1), 53-59.
- Uchiyama, A., Shimada-Beltran, H., Levy, A., Zheng, J.Y., Javia, P.A., & Lazarowitz, S.G. (2014). The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Frontiers in plant science*, 5, 584.
- Valkonen, J. P. (2007). Viruses: economical losses and biotechnological potential. In *Potato biology and biotechnology* (pp. 619-641). Elsevier Science BV.
- Van Der Vossen, E.A., Van Der Voort, J.N.R., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C., ... & Klein-Lankhorst, R. M. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant Journal*, 23(5), 567-576.
- Yılmaz, M. A., Baloğlu, S., & Nas, Z. (1990). Çukurova Bölgesi'nde Yetiştirilen Turfanda Patateslerde Patates Yaprak Kıvrıcıklığı Virüsünün (PLRV) ELISA Testiyle Surveyi. *J. Faculty Agri. Çukurova Univ*, 5(3), 95-106.