



## Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences

### Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi

## Ribozom İnaktive Eden Proteinlerin Bitki Virüs Hastalıklarının Kontrolünde Kullanılma Olanakları

Nihan GÜNEŞ<sup>1</sup>, Hikmet Murat SİPAHİOĞLU<sup>2</sup>, Mustafa GÜMÜŞ<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Malatya, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

Geliş tarihi: 15.12.2017

Kabul tarihi: 07.06.2018

Anahtar Kelimeler:

Ribozom inaktive eden proteinler (RIP)

Antiviral aktivite

Bitki virüs hastalıkları

### ÖZET

Ribozom inaktive eden proteinler (RIP'ler) olarak adlandırılan bir grup protein, enzimatik yolla geri dönülmez bir şekilde ribozomlara zarar verme yeteneğindedir. RIP'ler Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Poaceae ve Caryophyllaceae gibi familyalara ait bazı bitki türlerinde yaygın olarak bulunmakla beraber bazı fungus ve deniz yosunlarında da saptanmıştır. RIP'ler genel olarak moleküler yapısına göre Tip1, Tip2 ve Tip3 olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır. Doğadaki rolleri henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber, bazı özelliklerinin ortaya koyulması tarımsal uygulamalarda onlardan faydalanmak konusunda umut verici olmuştur. Bu proteinlerin bitkiler için patojenik olan bazı fungus ve virüslere karşı etkili olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Yapı, fonksiyon ve biyolojik aktiviteleri göz önüne alındığında bitkilerden izole edilen RIP'lerin gösterdikleri antiviral aktivitenin bitki virüs hastalıklarıyla mücadelede yeni gelişmeler açısından potansiyel taşıdığı görülmektedir.

## Possible Use of Ribosome Inactivating Proteins for the Control of Plant Viruses

### ARTICLE INFO

Article history:

Received date: 15.12.2017

Accepted date: 07.06.2018

Keywords:

Ribosome inactivating

proteins (RIPs)

Antiviral activity

Plant virus diseases

### ABSTRACT

A group of proteins called ribosome inactivating proteins (RIPs) are capable of damaging ribosomes enzymatically in an irreversible manner. RIPs have been found to be prevalent in some plant species which belongs to Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Poaceae and Caryophyllaceae families and have been identified in some fungi and marine algae. RIPs are generally classified into three groups as Type 1, Type 2 and Type 3 according to their molecular structure. Although their role in nature is not fully understood yet, revealing of some features has been promising to benefit from them in agricultural practices. Several studies have reported that these proteins are effective against some fungi and viruses which are pathogenic for plants. Given the structure, function and biological activities, the antiviral activity of RIP isolated from plants appears to have potential for new developments in combating plant virus diseases.

### 1. Giriş

Ribozom inaktive eden proteinler (RIP'ler) son 40 yıldır üzerinde çalışmalar yapılan ve tanımlanan bir sınıf proteindir. Belirli bitki proteinlerinin, *in vitro* protein sentezine geri dönülmez bir şekilde zarar verdiğinin keşfedilmesiyle 'Ribozom inaktive eden proteinler' terimi açığa çıkmıştır. RIP terimi, protein sentezi sırasında mesajcı RNA'dan polipeptit translasyonunu enzimatik yolla inhibe etme yeteneğinde olan proteinler için kullanılmaktadır (Barbieri et al., 2001).

RIP'ler, antiviral ve antitümör aktiviteye sahip biyolojik özelliklerinden dolayı öncelikle insan ve hayvan hücreleri için tedavi edici uygulamalarda onlardan faydalanmak amacı ile çalışılmıştır. Bitki fizyolojisi, biyokimya ve moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler RIP'lerin bitkilerdeki rolü hakkında da araştırmalar yapılmasını sağlamıştır. RIP'lerin bitkilerde hastalıklara, kuraklığa ve tuzluluğa karşı dayanıklılığı arttırdığının keşfedilmesiyle bitki koruma alanındaki kullanımına yönelik olarak bu proteinlere olan ilgi artmıştır (Stirpe, 2013).

\*Sorumlu yazar email: [mustafa.gumus@ege.edu.tr](mailto:mustafa.gumus@ege.edu.tr)

Bu proteinlerin bitki patojeni olan bazı fungus ve virüslere karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Park et al., 2002; Picard et al., 2005).

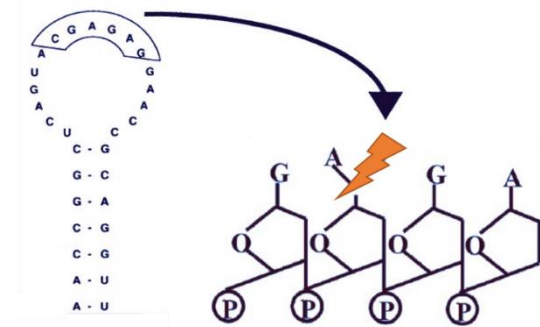
## 2. RIP'lerin doğada bulunma durumu

RIP'ler ilk olarak bitkilerde tespit edilmiş olup çoğu bitki türünde bulunmaktadır. Monokotiledon ve dikotiledonlar dahil olmak üzere 13 bitki familyasına ait yaklaşık 50 bitki türünde farklı RIP'ler tanımlanmıştır. Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Poaceae ve Caryophyllaceae gibi bazı familyalar RIP üreten çok sayıda tür içermektedir. Bu türler arasında tropik ağaçlar, tek yıllık bitkiler, çöl sukulentleri ve parazit bitkilere ait çeşitli türler yer almaktadır. Bu proteinler özellikle tahıllarda olmak üzere bazı kültür bitkilerinde de tanımlanmıştır (Stirpe, 2004). RIP'lerin bitki dokularındaki miktarı oldukça değişkendir; bazılarında iz miktarda bulunurken bazılarında 100g'da 100'lerce mg miktarda olabilmektedir. RIP'ler bazı bitkilerde incelenen dokuların çoğunda ya da hepsinde bulunabilmektedir. Örneğin endosperm, meyve, çiçek, kök, gövde, yaprak ve ağaç kabuğu gibi birçok bitki kısmında, aynı zamanda lateks gibi bazı bitki salgılarında da tespit edilebilmektedir. Üzerinde en çok çalışılan RIP'lerden Ricin, Hint yağı bitkisinin (*Ricinus communis*) tohumlarının endospermünde oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. *Mirabilis jalapa* L. bitkisinde Mirabilis antiviral protein (MAP) içeriği köklerde bitkinin diğer kısımlarına göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bazı bitkilerde ise sadece bir dokuda bulunabilmektedir (Kubo et al., 1990; Stirpe, 2004). RIP'lerin farklı formları aynı bitkide bulunabildiği gibi farklı formlar aynı dokuda da bulunabilmektedir (de Benito et al., 1995). Örneğin Saporin'in çeşitli formları *Saponaria officinalis*'in yaprak, tohum ve köklerinde tespit edilmiştir (Ferrerias et al., 1993). Ayrıca *Sambucus* türlerinin çeşitli dokularında farklı RIP'ler tespit edilmiştir (Girbés et al., 2003). Bazı bitki türlerinde hem Tip1 hem de Tip 2 RIP'ler tanımlanmıştır (Hao et al., 2001). Çoğu bitki RIP aktivitesi yönünden incelenmiştir. Çalışmalar RIP'lerin dağılımını tespit etmekten ziyade yüksek seviyede RIP içeren bitkileri bulmak amacıyla yapıldığı için araştırmalar RIP'lerin daha önceden tespit edildiği bitki familyalarında yoğunlaşmıştır. Bazı bitkilerde RIP aktivitesinin tespit edilememiş olması bu bitkilerde RIP bulunmadığı anlamı taşımamalıdır. Çalışmalarda genellikle tohumlar incelendiği için RIP içeren diğer dokular gözden kaçırılabilir. Ayrıca bazı RIP'ler dokularda saptama eşiğinin altındaki miktarlarda aktivite gösterdiği için tespit edilememektedir. RIP'ler bitkiler aleminde sanıldığı gibi daha yaygın bulunmaktadır (Stirpe, 2004). Ancak bu her bitkide bulunabilir anlamı taşımamaktadır. Örneğin *Arabidopsis thaliana* genomunda bu protein ile ilişkili gen tespit edilememiştir (Stirpe, 2013). Bununla beraber, bitki dokularında bazı RIP'lerin ekspresyonu yaşlanmayla, stres koşullarıyla ve viral enfeksiyonlardan sonra artmaktadır (Barbieri et al., 2001).

RIP'ler sadece bitki dokularında bulunmamaktadır. Hayvan hücre ve dokularında da RIP'lere benzer enzimatik aktiviteler tespit edilmiş olup strese maruz kalmış ve virüslerle enfekte olmuş hücrelerde yüksek miktarda bulunmuştur (Barbieri et al., 2001). RIP'ler bazı fungus ve deniz yosunlarında da tanımlanmıştır (Lam and Ng, 2001; Liu et al., 2002). RIP'lerin doğadaki varlığı sanıldığı gibi aksine daha yaygındır (Stirpe, 2004).

## 3. RIP'lerin etki mekanizması

RIP'lerin doğadaki rolleri tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber özellikle ökaryotik ve prokaryotik protein tranlasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Çoğu bitkinin ve bakterinin RIP'leri ökaryotik ribozomların büyük 60S ribozom alt birimlerine bağlanarak etki göstermektedir (Endo et al., 1987). RIP'ler, ökaryotik ribozomların 28S rRNA'larında N-glikosidaz aktivitesi göstererek GAGA nükleotid dizisine sahip korunmuş Sarcin/Licin halkasından tek bir adenin bazı uzaklaştırmaktadır (Şekil 1). Prokaryotik ribozomlarda ise büyük 50S ribozomun 23S rRNA'larındaki korunmuş bölgede etki göstermektedir (Hartley et al., 1991). Adenin bazı, ribozomun uzama (elongasyon) faktörü için gerekli olup uzaklaştırılması ribozomun uzama faktörüne bağlanmasını engelleyerek tranlasyonu sonlandırmaktadır (Endo et al., 1987). Ayrıca Pokeweed antiviral protein (PAP), Gelonin ve Risin gibi bazı RIP'ler her ribozomdan birden fazla adenin bazı uzaklaştırabildiği gibi DNA, tRNA, mRNA, viral RNA ve diğer polinükleotidlerden de Adenin uzaklaştırabilmektedir (Barbieri et al., 2001; Girbés et al., 2004). Bazı RIP'lerin kimi RNA moleküllerindeki Poly(A) kuyruğundan adenin uzaklaştırdığı tespit edilmiştir (Barbieri et al., 2003).

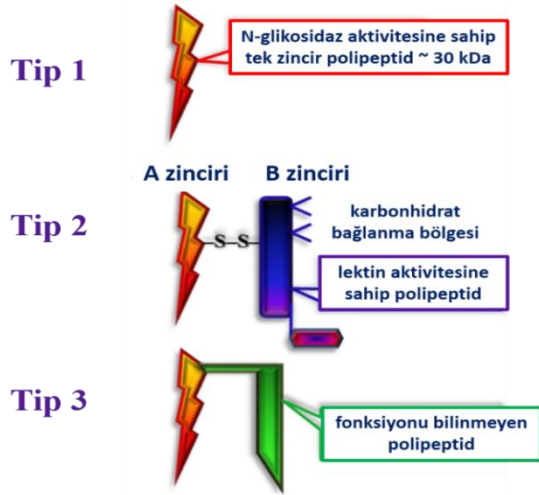


Şekil 1

Ribozom inaktive eden proteinlerin (RIP) 28S ribozom alt ünitesi üzerine enzimatik etki mekanizmasını gösteren şema (Stirpe, 2004'ten uyarlanmıştır)

## 4. RIP'lerin sınıflandırılması

RIP'ler genel olarak moleküler yapısına göre Tip1, Tip2 ve Tip3 olmak üzere 3 grupta toplanmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2

Ribozom inaktive eden proteinlerin yapısının şematik gösterimi (Stirpe, 2004'ten uyarlanmıştır).

Tek zincirden oluşan Tip1 RIP'ler N-glikosidaz aktivitesine sahip tek zincir protein ya da glikoproteinlere sahiptir ve yaklaşık 30 kDa büyüklüğündedir (Barbieri et al., 2001; Hao et al., 2001; Stirpe, 2013). Genel olarak Gelonin, PAP, Saporin ve Trikosantin Tip1 RIP olarak bilinmektedir (Stirpe, 2004). Tip1 RIP'ler çoğunlukla Asparagaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae ve Poaceae bitki familyalarından izole edilmiştir. Tip1 RIP'ler Tip2 RIP'lere göre daha sık görülmektedir.

## Çizelge 1

Tip1 Ribozom inaktive eden proteinlere örnekler (Hong et al., 1996; Balasaraswathi et al., 1998; Stirpe, 2004; Picard et al., 2005; Sipahioğlu et al., 2017).

Bitki familyası	Tür	Organ	RIP
Amaranthaceae	Spinacia oleracea (Ispanak)	Kök Kallus Yaprak	SOP
Asparagaceae	Asparagus officinalis (Kuşkonmaz)	Tohum	Asparin
	Dianthus caryophyllus (Yabani karanfil)	Yaprak	Dianthin 30 Dianthin 32
Caryophyllaceae	Dianthus barbatus(Hüsünüyusuf)	Yaprak	Dianthin 29
	Saponaria officinalis(Sabunotu)	Kök Tohum	Saporin-R1 Saporin-S6
Cucurbitaceae	Cucurbita pepo (Sakız kabağı)	Sarcocarp	Pepocin
	Cucurbita moschata (Bal kabağı)	Sarcocarp	Cucurmosin
	Trichosanthes kirilowii (Çin hıyarı)	Kök	Trikosantin TAP 29
	Mamordica charantia (Kudret narı)	Tohum	Momordin
Euphorbiaceae	Gelonium multiflorum	Tohum	Gelonin
Irideae	Iris hollandica (Süsen)	Soğan	IRIP
	Bougainvillea spectabilis willd.	Yaprak	Boganin BAP
Nyctaginaceae	Mirabilis jalapa(Akşam sefası)	Kök	(Bougainvillea Antiviral Protein) MAP (Mirabilis Antiviral Protein)
Phytolaccaceae	Phytolacca americana(Şekerçi boyası)	Yaprak Tohum	PAP PAP II (Pokeweed Antiviral Proteins)
Poaceae	Hordeum vulgare (Arpa)	Tohum	Barley RIP JIP 60
	Secale cereale (Çavdar)	Tohum	Secale cereale RIP
	Triticum aestivum (Ekmeklik buğday)	Yaprak Tohum	Tritin-L Tritin-S
	Zea mays (Mısır)	Tohum	Maize RIP

Tip2 RIP'ler ise iki zincire sahip olup N-glikosidaz aktivitesine sahip A zinciri, lektin aktivitesine sahip olan B zincirine disülfid köprüsü ile bağlıdır ve B zinciri karbonhidrat bağlanma bölgesi taşımaktadır (Barbieri et al., 2001; Girbés et al., 2004). A zinciri Tip1 RIP'e benzer olup 30 kDa büyüklüğündedir. B zinciri biraz daha büyük olup 35 kDa büyüklüğündedir (Chen et al., 2002). Bu proteinler Euphorbiaceae, Fabaceae, Passifloraceae, Sambucaceae ve Viscaceae familyalarına ait türlerden izole edilmiştir (Girbés et al., 2004). Saporin, PAP, Trikosantin gibi Tip1 RIP'ler, abrin ve risin gibi Tip2 RIP'lere göre daha az sitotoksiktir. Doğada toksik olmayan Tip2 RIP'ler de bulunmaktadır. Tip1'lerin daha az toksisite göstermesinin sebebi hücre bağlayan B zincirine sahip olmamasıdır (Stirpe, 2013). Tip3 RIP'ler ise proenzim olarak sentezlenip kısa internal peptid segmentinin çıkarılmasıyla aktif hale gelmektedir ve Tip1'e benzer bir zincir ile benzer büyüklükte fonksiyonu bilinmeyen ikinci bir zincir içermektedir. Molekül ağırlığı yaklaşık 60 kDa büyüklüğünde olan Tip3 RIP'ler diğer Tip1 ve Tip2 RIP'lere göre daha az tespit edilmiştir. Bugüne kadar karakterize edilen Tip3 ribozom inaktive eden proteinler sadece tahıllardan elde edilmiş olup bunlardan birisi mısırdaki b-32 RIP ve diğeri arpada Jasmonate induced protein 60 (JIP 60)'dır (Walsh et al., 1991; Chaudhry et al., 1994). Bitki patojenlerine karşı ribozom inaktive etme özelliğinde olan bu proteinlerden bazıları, bulunduğu bitkiler ve bitki organları Çizelge 1 ve 2'de verilmiştir.

## Çizelge 2

Tip2 Ribozom inaktive eden proteinlere örnekler (Stirpe, 2004).

Bitki familyası	Tür	Organ	RIP
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> (Hint yağı bitkisi)	Tohum	Risin
Fabaceae	<i>Abrus precatorius</i>	Tohum	Abrin
Passifloraceae	<i>Adenia digita</i>	Kök	Modeccin
	<i>Adenia volkensii</i>	Kök	Volkensin
Viscaceae veya Loranthaceae	<i>Viscum album</i> (Ökseotu)	Yaprak	Viscumin

## 5. RIP'lerin antiviral aktivitesi

Bazı bitki türlerinin virüs enfeksiyonlarını inhibe eden antiviral proteinlere sahip olduğu *in vitro* ve mekanik inokulasyon yöntemiyle yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Bu antiviral protein özelliğini taşıyan ribozom inaktive eden proteinler bitki virüs hastalıklarına karşı en fazla *Phytolacca americana*, *Mirabilis jalapa*, *Dianthus caryophyllus*, *Celosia cristata* ve *Bougainvillea* spp. türlerinde çalışılmıştır (Stirpe et al., 1981; Kubo et al., 1990; Picard et al., 2005; Bhatia and Lodha, 2005; Roy et al., 2006). RIP'ler, antiviral moleküller olarak işlev göstermekle beraber protein sentezini engelleyen mekanizmaya sahiptir. Antiviral aktiviteleri virüsün türünden bağımsız olduğu için bitki virüs hastalıklarının önlenmesi açısından potansiyel taşımaktadır. Bitkilerde RIP'lerin antiviral aktivitesinin, virüs tarafından hücre enfeksiyonu gerçekleşmeden önce virionlar üzerindeki direkt etkisinden dolayı meydana gelmediği bildirilmektedir. Buna göre araştırmacılar

RIP'lerin infekteli hücrelere girip ribozomları inaktif hale getirerek virüs replikasyonunu önlediğini belirtmektedir (Endo et al., 1987; Lodge et al., 1993). Bununla beraber, RIP'lerin yeni biyolojik özelliklerinin keşfedilmesiyle birlikte antiviral aktivitelerinin virüs genomuna karşı viral RNase ve DNase aktivitelerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Bhatia and Lodha, 2005).

## 6. RIP'lerin bitki virüs hastalıklarının kontrolünde kullanıma olanakları

*Phytolacca americana* (şekerçi boyası) bitkisi RIP aktivitesinin keşfedildiği ilk bitkidir. *P. americana* bitkisinden purifiye edilen Pokeweed antiviral proteininin (PAP) 0.4 µg/ml konsantrasyonu, *Tobacco mosaic virus* (TMV) enfeksiyonunun tütün yapraklarında neden olduğu lokal lezyonları tamamen engellemiş olup 25 ng/ml konsantrasyonunda ise %68 oranında önleme saptanmıştır. PAP'ın bitkileri ayrıca TMV, *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Potato virus X* (PVX) ve *Potato virus Y* (PVY) gibi RNA virüsleri ile *African cassava mosaic virus* (ACMV) (ssDNA) ve *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (dsDNA) gibi DNA virüslerinin enfeksiyonlarından koruduğu tespit edilmiştir. PAP yaprakların alt yüzeyinden bitkiye infiltre edildiğinde yaprakların üst

yüzeyinden bitkiye inokule edilen virüslerin enfeksiyonunu engellemekle beraber PVY'nin yaprak bitleriyle taşınmasını kısmen engellemiştir (Chen et al., 1991). PAP'ın cDNA klonu izole edilip *Agrobacterium tumefaciens* ile *Nicotiana tabacum* ve *Solanum tuberosum* (patates) bitkilerine entegre edildiğinde PVX ve PVY virüslerine karşı dayanıklılık göstermiştir. Dayanıklılık, virüslerin hem mekanik inokulasyonla hem de afit ile taşınmasına karşı etkili bulunmuştur (Lodge et al., 1993). *Escherichia coli* bakterisine aktararak eksprese edildikten sonra izole edilen PAP proteini arpa bitkisinin hücrelerinde *Brome mosaic virus* (BMV) etmeninin RNA'sını depurine edip transkripsiyonu engelleyerek viral protein translasyonunu azaltmış ve replikasyonunu önlemiştir (Picard et al., 2005). PAP preparasyonu, TMV mekanik inokulasyonundan 3 gün önce *Nicotiana benthamiana* bitkisine 0.1 mg/ml oranında uygulandığında sistemik dayanıklılık sağlamıştır (Zhu et al., 2016). Aynı yöntemle üretilen ve saflaştırılan PAP I proteini, kabak bitkisi yapraklarına harici olarak düzenli biçimde uygulandığında 2 µg/ml konsantrasyonunun *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) enfeksiyonunu engellediği görülmüştür. Tek başına uygulandığında, purifiye PAP I'ın aynı zamanda bitkilerde cüceleşmeye neden olduğu rapor edilmiştir (Sipahioğlu et al., 2017).

*Dianthus caryophyllus* L. (karanfil) bitkisinin yapraklarından izole edilen Dianthin 30 ve Dianthin 32 isimli iki RIP'in TMV replikasyonu üzerinde inhibe edici aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Dianthin 30 0.5 µg/ml ve Dianthin 32 1 µg/ml miktarında TMV ile karıştırılarak *Nicotiana glutinosa*'ya inokule edildiğinde meydana gelen lokal lezyonlarda %50'den fazla düşüş gözlenmiştir (Stirpe et al., 1981). *Dianthus caryophyllus* bitkisinden izole edilen Dianthin, *Nicotiana benthamiana* bitkisinde eksprese edildiğinde transgenik *Nicotiana benthamiana* bitkisi *African cassava mosaic virus* etmenine karşı dayanıklılık göstermiştir (Hong et al., 1996).

Cucurbitaceae familyasına ait *Trichosanthes kirilowii* bitkisine ait trikosantin antiviral protein geni domatese aktararak eksprese edildiğinde transgenik bitkinin TMV ve CMV etmenlerine karşı dayanıklılık gösterdiği saptanmıştır (Guo et al., 1999).

*Mirabilis jalapa* L. (akşam sefası) bitkisinden elde edilen MAP (Mirabilis Antiviral Protein) proteini TMV, *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), PVY, *Turnip mosaic virus* (TuMV) ve CMV etmenlerinin mekanik inokulasyon ile taşınmala-

rını engellemede önemli aktivite göstermiştir. TMV inokulasyonundan 24 saat önce *Nicotiana tabacum* L. *xanthi* yapraklarının üst yüzeyine 0.8 µg/ml oranında MAP süspansiyonu uygulandığında lokal lezyonlar neredeyse %100 oranında önlenirken yaprakların alt yüzeyine 10 µg/ml oranında uygulandığında %50 oranında engellenmiştir. MAP, tütün bitkilerinde TMV inokulasyonundan 24 saat önce primer yapraklara uygulandığında TMV enfeksiyonuna karşı sistemik dayanıklılığı uyarır. MAP, TMV inokulasyonundan 1 saat sonra uygulandığında engelleme göstermemiştir. *Nicotiana tabacum* L. Cv. Bright Yellow bitkisinin yapraklarına MAP preparasyonu uygulandıktan 24 saat sonra CMV ve TuMV ile ayrı ayrı inokule edildiğinde CMV'yi yaprakların alt yüzeyine uygulandığında %95 ve üst yüzeyine uygulandığında %100 oranında önlenen TuMV'yi %75 ve %97 oranında engellemiştir. MAP aynı şekilde *Datura stramonium* yapraklarının alt yüzeyine uygulandığında CGMMV kaynaklı lezyonlar %54 oranında engellenirken üst yüzeyine uygulandığında %98 oranında engellemiştir. MAP preparasyonu 1 mg/ml oranında uygulandığında *Nicotiana tabacum* L. Burley bitkisinde PVY enfeksiyonunu tamamen engellemiştir (Kubo et al., 1990).

*Bougainvillea spectabilis* Willd. bitkisinin yaprakları yerine köklerinde daha fazla antiviral aktivite bulunduğu saptanmış ve köklerden elde edilen *Bougainvillea* Antiviral Protein I (BAP I) proteininin *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)'üne karşı antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada begonvil bitkisinden elde edilen ekstrakt 5-6 günlük börülce bitkilerinin birincil yapraklarına sprey ile püskürtülmüş ve 24 saat sonra domates yapraklarından elde edilen TSWV ırkı mekanik olarak inokule edilmiştir. İnokulasyondan 3-5 gün sonra oluşan lokal lezyonların beklenenden az olduğu tespit edilmiştir (Balasaraswathi et al., 1998). *Bougainvillea xbutiana* cv. Mahara bitkisinin yapraklarından purifiye edilen RIP'lerin TMV ve *Sunhemp rosette virus* (SRV)'ünün viral RNA'sına karşı RNase aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. RIP'lerin 1.6 µg ve 2.4 µg konsantrasyonları TMV RNA'larında doğrudan depurinasyona neden olurken 0.8 µg konsantrasyonunun degradasyona neden olmadığı saptanmıştır. 1.6 µg RIP konsantrasyonu ise SRV RNA'sını tamamen degrade edemez iken 2.4 µg konsantrasyonu depurinasyona ve degradasyona neden olmuştur. Bu bulgular doğrultusunda TMV RNA'sının RIP'lere SRV RNA'sına göre daha hassas olduğu belirlenmiştir (Bhatia and Lodha, 2005). *Bougainvillea xbutiana* bitkisinden elde edilen *Bougainvillea xbutiana* antiviral protein1 (BBAP1) geni *E. coli* bakterisine transforme edilerek eksprese edilmiştir. BBAP1'in antiviral etkisi SRV için *Cyamopsis tetragonoloba* ve TMV için *Nicotiana glutinosa* bitkilerinin her yaprağına 50 µg protein uygulandıktan sonra virüs ile inokule edilerek araştırılmıştır. Yapılan çalışmada BBAP1 antiviral aktivite göstererek SRV ile infekteli *Cyamopsis tetragonoloba* yapraklarında lokal lezyonların %95 oranında azalmasına neden olurken, TMV ile enfekteli *Nicotiana glutinosa* yaprak-

larında ise lezyonların yaklaşık %94 oranında azalmasına neden olmuştur (Choudhary et al., 2008a; Choudhary et al., 2008b). Ülkemizde yapılan bir çalışmada *Bougainvillea spectabilis* Willd. bitkisinden izole edilen Boganin antiviral proteini (BAP) *Escherichia coli* BL21 bakterisinde eksprese edildikten sonra purifiye edilmiştir. Protein sakız kabağının (*Cucurbita pepo* L.) kotiledon yapraklarına 4 gün boyunca periyodik olarak mikropipet yardımı ile uygulandıktan sonra ZYMV etmeninin şiddetli bir izolatu mekanik inokülasyon yolu ile bitkilere bulaştırılmıştır. BAP uygulanan virüslü bitkilerdeki hastalık şiddeti 2 µl için % 68.2, 4 µl için % 61.4, 8 µl için % 58.7 olarak tespit edilmiş olup sadece ZYMV bulaştırılan kabak bitkilerindeki hastalık şiddeti ise % 72.9 olarak hesaplanmıştır. Bu durum BAP proteininin virüsün gelişimini tamamen engellemediğini ancak artan miktarlarının hastalık şiddetini azalttığını ortaya koymuştur. Sadece BAP proteini uygulanan kabak bitkilerinin, hiçbir uygulama yapılmayan kontrol gruplarına göre daha düşük yaş ve kuru ağırlığa sahip olduğu ve gelişim geriliği ile cücelik belirtileri gösterdiği belirlenirken proteinin ZYMV ile birlikte uygulandığında kuru ve yaş ağırlıkta daha fazla kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Güller, 2015).

Amaranthaceae familyasına ait *Celosia cristata* (horoz ibiği) bitkisinin kurutulmuş yapraklarından elde edilen CCP-25 ve CCP-27 isimli ribozom inaktive eden proteinlerin 20-30 µg/ml konsantrasyonları TMV, SRV ve *Citrus ringspot virus* (CRSV) etmenlerinin oluşturduğu lezyonları %90'dan fazla oranda engellemiştir. Lokal lezyonların çıkış oranının araştırıldığı mekanik inokülasyon aşamasında TMV için *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Samsun NN ve SRV için *Cyamopsis tetragonoloba* bitkileri test bitkisi olarak kullanılmıştır. Ayrıca ribozom inaktive eden proteinlerin 60 µg/ml konsantrasyonlarının SRV ve CRSV etmenlerinin inokulumu ile karıştırılarak uygulanmıştır. Bu uygulama etmenlerin sırasıyla sistemik konukçuları olan *Crotalaria juncea* ve *Phaseolus vulgaris* bitkilerinde dayanıklılığı uyararak belirti oluşmasını engellemiştir. Ayrıca bu proteinlerin konsantrasyonlarının *Celosia cristata* bitkisinin çiçeklenme öncesi ve sonrası dönemlerinde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Balasubrahmanyam et al., 2000). *Celosia cristata* bitkisinin yapraklarından izole edilen CCP-25 ribozom inaktive eden proteini *Brome mosaic virus* (BMV) ve *Pokeweed mosaic virus* (PMV) etmenlerinin transkripsiyonlarını engellemiştir (Baranwal et al., 2002). *C. cristata* bitkisinin CCP-27 isimli ribozom inaktive eden proteinini kodlayan cDNA'sı RT-PCR ile çoğaltılmış, uygun bir vektöre aktarıldıktan sonra *E. coli* bakterisine transforme edilerek rekombinant protein olarak eksprese edilmiştir. Rekombinant proteinin tütün ribozomlarında TMV'ye ve guar bitkisinde (*Cyamopsis tetragonoloba*) SRV'ye karşı N-glikosidaz aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada saflaştırılan CCP-27 proteini 100 µg/ml kadar düşük konsantrasyonda kullanıldığında dahi TMV ile infekte edilen tütünde ve SRV ile infekte edilen guar bitkisinde lokal lezyonların %95 oranında

azalmasına neden olmuştur (Begam et al., 2006). Amaranthaceae familyasına ait *Amaranthus tricolor* bitkisinden saflaştırılan AAP-27 isimli ribozom inaktive eden proteini yaklaşık 30 µg/ml konsantrasyonda SRV'nin guar bitkisinde meydana getirdiği lokal lezyonlarda yaklaşık %98 oranında azalmaya neden olmuştur. Proteinin N-glikosidaz ve RNase aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Roy et al., 2006).

Caprifoliaceae familyasına ait *Sambucus nigra* (kara mürver) bitkisinden izole edilen SNA-I' ribozom inaktive eden proteininin cDNA klonu tütün bitkilerine transforme edilerek transgenik bitki elde edilmiştir. Transgenik bitkinin TMV'e karşı dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca proteinin ekspresyonunun transgenik bitkinin gelişimi ve üremesi üzerine olumsuz etki yapmamıştır (Chen et al., 2002).

Acanthaceae familyasına ait *Strobilanthes cusia* bitkisinden izole edilen Cinchonaglycoside C (CIP31) ribozom inaktive eden proteini TMV'nin kılıf proteini sentezine zarar vererek etmenin *Nicotiana tabacum* bitkilerinde uzun mesafe hareketini ve çoğalmasını engellemiştir. CIP31 proteinin kullanılan konsantrasyon miktarı arttıkça TMV'nin kılıf proteininin oluşumu daha çok engellenmiştir. Minimum konsantrasyon 100 nmol/L iken 500 nmol/L konsantrasyonda engelleme oranı %92 olarak saptanmıştır. TMV enfeksiyonu nedeniyle tütün bitkilerinde oluşan lezyon sayısını yüksek oranda azaltan proteinin bitkinin büyümesi ve üremesi üzerine toksik etkisi tespit edilmemiştir (Li et al., 2007).

## 7. Sonuç ve Öneriler

Çok sayıda bitkinin antiviral proteinlere sahip olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir ve ribozom inaktive etme yeteneğinde olan bu proteinler bazı bitki familyalarında bol miktarda bulunmaktadır. Doğadaki rolleri henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber ribozom inaktive eden proteinlerin özelliklerinin keşfedilmesi bitki koruma alanında çeşitli patojenlere karşı onlardan yararlanmak konusunda ümit verici olmuştur. Yapılan çalışmalarda bitki virüs hastalıklarına karşı bu proteinlerin birkaçı saflaştırılıp karakterize edilerek hastalıklar üzerindeki etkisi incelenmiştir ve bitkilerdeki virüs enfeksiyonlarını etmene spesifik davranmadan engelleyebildikleri keşfedilmiştir. Bu proteinler buldukları bitkideki enfeksiyonu engelleyememekle beraber virüsleri *in vitro* koşullarda, virüslerin mekanik inokulasyonundan önce ya da virüs inokulumu ile karıştırılarak uygulandıklarında inaktive edebilmektedir. Bazen sistemik dayanıklılığı da uyarabildikleri saptanmıştır. Ayrıca ribozom inaktive eden proteinleri kodlayan genlerin bitkilere aktarılmasıyla elde edilen transgenik bitkiler de virüslere karşı dayanıklılık gösterebilmektedir. Bu sayede ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinin virüslere karşı dayanıklı çeşitlerinin geliştirilmesi konusunda umut vericidir. Ribozom inaktive eden proteinler ile ilgili ekonomik öneme sahip kültür

bitkilerinde önemli bitki virüs hastalıklarına karşı daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

## 8. Kaynaklar

- Balasaraswathi R, Sadasivam S, Ward M and Walker JM (1998). An antiviral protein from Bougainvillea spectabilis roots; purification and characterisation, *Phytochemistry*, 47(8):1561-1565 pp.
- Balasubrahmanyam A, Baranwal VK, Lodha ML, Varma A and Kapoor HC(2000). Purification and properties of growth stage-dependent antiviral proteins from the leaves of *Celosia cristata*, *Plant science*, 154(1):13-21 pp.
- Baranwal, VK, Turner NE and Kapoor HC(2002). Depurination of ribosomal RNA and inhibition of viral RNA translation by an antiviral protein of *Celosia cristata*, *Indian Journal of Experimental Biology*, 40:1195-1197 pp.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M, Lugo Alvarez M, Dal Monte P, Landini MP and Stirpe F (2001). Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Letters*, 505, 196-197 pp.
- Barbieri L, Brigotti M, Perocco P, Carnicelli D, Ciani M, Mercatali L and Stirpe F(2003). Ribosome-inactivating proteins depurinate poly (ADP-ribosyl) ated poly (ADP-ribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. *FEBS letters*, 538(1-3):178-182 pp.
- Begam M, Kumar S, Roy S, Campanella JJ and Kapoor HC (2006). Molecular cloning and functional identification of a ribosome inactivating/antiviral protein from leaves of post-flowering stage of *Celosia cristata* and its expression in *E. coli*, *Phytochemistry*, 67(22):2441-2449 pp.
- Bhatia S and Lodha ML (2005). RNase and DNase activities of antiviral proteins from leaves of *Bougainvillea xbuttiana*, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42:152-155 pp.
- Chaudhry B, Müller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, Skriver K and Mundy J(1994). The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *The Plant Journal*, 6(6):815-824 pp.
- Chen ZC, White RF, Antoniw JF and Lin Q(1991). Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses, *Plant Pathology*, 40(4):612-620 pp.
- Chen Y, Peumans WJ and Van Damme EJ (2002). The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I' exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco, *FEBS letters*, 516(1-3):27-30 pp.
- Choudhary NL, Yadav, OP and Lodha ML(2008a). Ribonuclease, deoxyribonuclease, and antiviral activity of *Escherichia coli*-expressed *Bougainvillea xbuttiana* antiviral protein1, *Biochemistry*, 73(3):273-277 pp.
- Choudhary N, Kapoor HC and Lodha ML(2008b). Cloning and expression of antiviral/ribosome-inactivating protein from *Bougainvillea xbuttiana*, *Journal of biosciences*, 33(1).
- de Benito, FM. Citores L, Iglesias R, Ferreras JM, Soriano F, Arias FJ, Me'ndez E and Girbe's T (1995). Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1, *FEBS Letters*, 360:299-302 pp.

- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M and Tsurugi K(1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins, *Journal of Biological Chemistry*, 262(12):5908–5912 pp.
- Ferreras JM, Barbieri L, Girbés T, Battelli MG, Rojo, M.A., Arias, F.J., Rocher, M.A., Soriano, F., Mende'z, E. and Stirpe, F (1993). Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1216:31–42 pp.
- Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Muñoz R, Iglesias R, Jimenez P, Rojo MA, Arias Y, Perez Y, Benitez J, Sanchez D and Gayoso MJ(2003). Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from *Sambucus*: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*,49:537–545 pp.
- Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ and Stirpe F(2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(5):461-476 pp.
- Guo YJ, Demin J, Man Li W, Guo B, Bin W, Jin DM, Weng ML, Guo B and Wang B (1999). Transformaton and expression of trichosanthin gene in tomato, *Acta Botanica Sinica*, 41:334–336 pp.
- Güller A(2015). Begonvil (*Bougainvillea spectabilis* willd.) bitkisindeki boganin protein geninin klonlanması, bakteriyel ekspresyonu, antiviral ve antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 107s.
- Hao Q, Van Damme EJ, Hause B, Barre A, Chen Y, Rouge' P, Peumans WJ(2001). Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties, *Plant physiology*,125:866-876 pp.
- Hartley MR, Legname G, Osborn R, Chen Z and Lord J.M(1991). Single chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA, *FEBS letters*,290(1-2):65-68 pp.
- Hong Y, Saunders K, Hartley MR and Stanley J(1996). Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin in transgenic plants, *Virology*, 220(1):119-127 pp.
- Kubo S, Ikeda T, Imaizumi Y and Mikami Y (1990). A potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L., *Japanese Journal of Phytopathology*, 56:481-487 pp.
- Lam SK and Ng TB(2001). First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393(2), 271-280 pp.
- Li Y, Jia Y, Zhang Z, Chen X, He H, Fang R and Hao X(2007). Purification and Characterization of a New Ribosome Inactivating Protein from Cinchonaglycoside C-treated Tobacco Leaves, *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(9):1327-1333 pp.
- Liu RS, Yang JH and Liu WY (2002). Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A), *The FEBS Journal*, 269, 4746–4752 pp.
- Lodge JK, Kaniewski WK and TumerNE(1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15):7089-7093 pp.
- Park SW, Stevens NM and Vivanco JM(2002). Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity, *Planta*, 216(2):227-234 pp.
- Picard D, Kao CC and Hudak KA(2005). Pokeweed antiviral protein inhibits brome mosaic virus replication in plant cells, *Journal of Biological Chemistry*, 280(20):20069-20075 pp.
- Roy S, Sadhana P, Begum M, Kumar S, Lodha ML and Kapoor HC(2006). Purification, characterization and cloning of antiviral/ribosome inactivating protein from *Amaranthus tricolor* leaves, *Phytochemistry*, 67(17):1865-1873 pp.
- Sipahioğlu HM, Kaya HM, Usta M, Ünal M, Özcan D, Özer M, Güller A, and Pallas, V (2017). Pokeweed (*Phytolacca americana* L.) antiviral protein inhibits Zucchini yellow mosaic virus infection in a dose-dependent manner in squash plants, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41:256-262 pp.
- Stirpe F, Williams DG, Onyon LJ, Legg RF and Stevens WA(1981). Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation), *Biochemical journal*, 195(2):399-405 pp.
- Stirpe F (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*, 44(4), 371-383.
- Stirpe F (2013). Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. *Toxicon*, 67, 12-16 pp.
- Zhu F, Yuan S, Zhang ZW, Qian K, Feng JG and Yang YZ(2016). Pokeweed antiviral protein (PAP) increases plant systemic resistance to Tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana*, *European Journal of Plant Pathology*, 146(3):541-549 pp.
- Walsh TA, Morgan AE and Hey TD(1991). Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize-novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment, *Journal of Biological Chemistry*, 266:23422–23427 pp.