

***Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.'da Boron Hiperakümülasyonu ve Tolerans
Mekanizmalarının Proteomiks Yaklaşım Kullanarak Anlaşılması**

Program Kodu: COST 2515

Proje No: 113Z930

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Anne Frary

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Talat YALÇIN

Doç. Dr. Jens Allmer

Danışman(lar):

Bursiyer(ler):

Cantuğ BAR

İbrahim ÇELİK

Asena AKKÖSE

NİSAN 2017

İZMİR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
2. GEREÇ VE YÖNTEM	7
2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Toksik Bor Stresi Uygulanması	7
2.2. Bitki Dokularındaki Bor Miktarının Belirlenmesi	8
2.3. Protein İzolasyonu ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	8
2.4. 2D-PAGE (Çift Boyutlu Jel Elektroforezi).....	9
2.5. LC-MS/MS için Protein İzolasyonu	10
2.6. Protein Alkalizasyonu ve LC-MS/MS Ölçümleri.....	10
2.7. Kütle Spektrometre Verilerinin Analizi ve Peptitleri Tanımlanma	11
2.8. EST Analizleri.....	12
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	13
3.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Toksik Bor Uygulaması.....	13
3.2. Protein İzolasyonu ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	15
3.3. 2D-PAGE (İki Boyutlu Jel Elektroforezi).....	16
3.4. LC-MS/MS için Protein İzolasyonu	19
3.5. Protein Alkalizasyonu ve LC-MS/MS Ölçümleri.....	19
3.6. Kütle Spektrometre Verilerinin Analizi ve Peptitlerin Tanımlanması.....	22
3.7. <i>P. distans</i> transkriptomunun RNA-seq ile analizi.....	25
3.8. Kontrol ve stres durumlarında farklı gen ifadeleri.....	26
3.9. Farklı ifadesi yapılan transkriptlerin anotasyonu.....	27
3.9.1. Hücresel öğeler	31
3.9.2. Biyolojik Proses.....	31
3.9.3. Moleküler fonksiyonlar.....	31
3.10. Anotasyonu yapılan transkriptlerin gerçek zamanlı kantitatif PCR'ı	36
3.11. Protein Tanımlanması ve Kantitatif Analizler.....	37
3.12. Anotasyon ve Haritalama	42
3.13. Ekspresyonu Değişen Proteinlerin İlişkili Olduğu Metabolik Yolların Analizi.....	42
4. SONUÇ	49
5. KAYNAKLAR	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Üç haftalık stres uygulaması sonucu <i>P. distans</i> bitkilerinin durumu	14
Şekil 2. 1-10 µg/ml aralığında Bradford Standart Grafiği	15
Şekil 3. <i>P. distans</i> yaprak kontrol örneği 2D-PAGE sonucu	17
Şekil 4. <i>P. distans</i> yaprak stres örneği 2D-PAGE sonucu	17
Şekil 5. <i>P. distans</i> kök kontrol örneği 2D-PAGE sonucu	18
Şekil 6. <i>P. distans</i> kök stres örneği 2D-PAGE sonucu	18
Şekil 7 <i>P. distans</i> yaprak örneği kontrol grubu LC-MS protein profile	21
Şekil 8. <i>P. distans</i> yaprak örneği stres grubu LC-MS protein profile	21
Şekil 9. <i>P. distans</i> kök örneği kontrol grubu LC-MS protein profile	21
Şekil 10. <i>P. distans</i> kök örneği stress grubu LC-MS protein profile	22
Şekil 11. FPKM değerlerinin heat map şekli.	27
Şekil 12. <i>P. distans</i> 'ın seçilen 32 transkriptinin gerçek zamanlı kantitatif PCR sonuçları	37
Şekil 13. Ekspresyonu artan ve azalan proteinlerin moleküler fonksiyonları	42
Şekil 14. Ekspresyonu artan ve azalan proteinlerin biyolojik süreç açısından incelenmesi	43
Şekil 15. Ekspresyonu artan ve azalan proteinlerin biyolojik süreç açısından incelenmesi	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. ICP-MS ölçümlerinden elde edilen 1g kuru ağırlıktaki B miktarları	16
Tablo 1. Standard Grafiğinden hesaplanan toplam protein konsantrasyonları	17
Tablo 3. Protein ekstraksiyon sonucu örnek başına elde edilen konsantrasyon değerleri	22
Tablo 4. LC-MC cihazının proteinleri hidrofobisitetlerine göre ayırmak için kullandığı kademeli konsantrasyon tablosu.	23
Tablo 5. QExactive cihazında ölçülen örneklerin kodları ve benzersiz spektrallardan oluşan spektra sayıları verilmiştir.	27
Tablo 6. Kütle spektrometre verilerinin tanımlanması amacıyla kullanılan veri tabanları, megabyte cinsinden boyutları ve verilerin elde edildikleri kaynaklar verilmiştir.	28
Tablo 7. <i>P. distans</i> transkript/genlerinin istatistik özetleri	31
Tablo 8. FPKM değerlerine göre en çok değişim gösteren farklı ifade edilmiş transkriptlerin listesidir.	33
Tablo 9. <i>P. distans</i> 'ta bor biriktirme özelliğiyle ilintili olabilecek moleküler fonksiyon kategorileri ile onların alt grupları	38
Tablo 10. Hem kök hem yaprak dokusunda log ₂ tabanına göre ekspresyonu değişen proteinler için en az bir dokudaki ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı (p-değeri ≤0.05) olan proteinler verilmiştir.	46
Tablo 11. KEGG Metabolik Ağ Veritabanı içerisinde <i>A. thaliana</i> ve <i>O. sativa</i> veritabanlarına eşleşen proteinler eşleştikleri hücresel yollar ile verilmiştir.	52

ÖZET

Bor hem yüksek hem düşük konsantrasyonlarında bitkilerde büyüme bozukluklarına ve verim kaybına neden olmaktadır. Yüksek bor konsantrasyonundan kaynaklanan problemlerin giderilmesi için gerçekleştirilen; toprağın yıkanması, toprağın çinko ile zenginleştirilmesi gibi yöntemlerin bu sorunun giderilmesinde yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Dünya bor rezervlerinin %71,3'üne sahip olan Türkiye'de bor toksisitesi, önemli bir tarımsal sorundur ve ülkenin belirli bölgelerindeki birçok tarım bitkinin verimini azaltmakta ve kullanılabilir tarım alanlarını kısıtlamaktadır. Dayanıklı tür belirlemeye yönelik yapılan araştırmalar sonucunda Türkiye'de bor madenlerinin bulunduğu arazilerde büyüeyebilen ve yüksek bor toksisitesine tolerans gösteren *Puccinellia distans* (çorak çimi) tanımlanmıştır. Tarımsal olarak ekonomik bir değeri olmamasına rağmen, yakın zamanda gerçekleştirilen fizyolojik çalışmaların ışığında bünyesinde yüksek miktarlarda bor biriktirebildiği bulunmuştur. Bu bitki türü ile transkriptomik düzeyde çalışılmıştır fakat üzerinde daha önce proteomik düzeyde herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bu projede, *Puccinellia distans* bitkisindeki bor toksisitesine karşı toleransta rol oynayan mekanizmalar proteomik (proteinlerin farklı ekspresiyon profillerinin çıkarılması) yaklaşımla incelenmiştir. *Puccinellia distans* bitkisindeki bor toksisitesine dayanıklılık mekanizmalarını ortaya çıkarmak için bor stresine maruz bırakılmış bitkiler ile normal şartlarda yetiştirilmiş bitkilerin kök ve yapraklarından izole edilen proteinler incelenmiştir. İfadelemesi farklı bulunan proteinlerin tanımlanması için etiketsiz (label-free) kütle spektrometresi ile ölçümler yapılmıştır. *Puccinellia distans* transkriptomu, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* proteinleri ve *de novo* dizileme sonuçlarında oluşan bir veritabanı kullanılarak kütle spektrometre verileri analiz edilmiştir, peptitler ve dolayısıyla proteinler tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda boron transportundan sorumlu aquaporin proteinleri, tonoplastlar tanımlanmış ve karbohidrat, lipid, protein yıkım, oksidatif stres, hormonal sinyal transdüksiyonu gibi metabolik yolların stres koşullarından etkilendiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

Çorak çimi, *Puccinellia distans*, Bor, Etiketsiz proteomiks, EST, Transkriptomik

ABSTRACT

Boron can cause growth deficiency and yield loss in plants at both low and high concentrations. Remedies for high boron concentrations such as leaching or zinc enrichment were found to be insufficient to manage the problem. Turkey holds 71.3% of the world's known boron reserves, and boron toxicity is a major problem in this country, causing yield loss and reduction of usable agricultural areas for many crops such as wheat and barley. In a research to identify resistant species, *Puccinellia distans* (weeping alkaligrass) growing near boron mining sites in Turkey, was found to be able to tolerate high boron concentrations. Although *Puccinellia distans* does not have an agricultural value at present, recent physiological research showed that this plant can accumulate boron in high concentration. This species has been studied at the level of gene transcription, however, investigation at the protein level has not been performed. In this project, the boron stress tolerance mechanism of *Puccinellia distans* will be investigated with proteomics approach. With this approach, we aimed the identification of proteins responsible for the boron hyperaccumulation in *P. distans* and pave the way for further studies on other non-model organism abiotic stress research projects. To investigate boron stress response and tolerance mechanisms in protein level, we evaluated protein expression levels of control and stress samples obtained from shoot and root tissues by using label-free proteomics approach. Plants were grown under toxic boron conditions (500 mg/L) and found to accumulate up to 51-fold more boron than control plants in roots and shoots with similar levels in both tissues (~6300 µg/g plant tissue). Total shoot and root protein analysis was performed with Label-free LC-MS to determine the differences between protein profiles for control and stress-treated plants. The metabolic pathways, gene ontologies were determined for differentially expressed proteins. As a result, aquaporins, tonoplasts which are responsible for cellular uptake of boron were determined and several metabolic pathways including carbohydrate metabolism, lipid metabolism, hormonal signal transduction metabolism, oxidative stress metabolism were altered under excess amount of boron.

Key words:

Weeping grass, *Puccinellia distans*, Boron, Label free proteomics, EST, Transcriptomics

GİRİŞ

Türkiye, dünya bor rezervlerinin büyük bir kısmına sahip olması nedeniyle bazı bölgelerimizdeki tarımsal faaliyetler için kullandığı tarım toprakları ve sulama suları yüksek konsantrasyonda bor içermektedir. Yüksek konsantrasyonda bulunan bor, toksisite problemine neden olmaktadır. Bor toksisitesinden kaynaklanan stres faktörü bitki büyüme ve gelişimine olumsuz etki ettiği için tarımsal verimliliği azaltmaktadır ve tarımda kullanılabilir ekim alanlarını sınırlamaktadır. Bu şekilde ortaya çıkan ekonomik öneminden dolayı, bor toksisitesi stresi, araştırmacıların dayanıklılık mekanizmalarını fizyolojik, genetik ve moleküler düzeylerde anlamak ve dayanıklı çeşitler geliştirmek üzere yoğunlaştıkları temel ve uygulamalı bir araştırma konusu haline gelmiştir. Başta buğday, arpa gibi tahıllar olmak üzere ekonomik önemi olan diğer bir çok tarım ürününde bor toksisitesi toleransı hücresel düzeyde ve hatta bütün bitki seviyesinde araştırılmıştır ve sonrasında tolerant türlerin hangi seviyelerde ve mekanizmalarla tolerans sağladıklarına dair bazı bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, bor toksisitesi stresine dayanıklılıkta görev alan genlerin büyük bir kısmının bor elementinin hücre dışına atılmasından sorumlu olan transporter proteinlerini kodlayan genler olduğu tespit edilmiştir. Transporter proteinler dışında bor toksisitesine dayanıklılıkta rol oynayan bazı regülatör işlevi olan transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler ve bazı ribosomal proteinler de tespit edilmiştir. Bütün bu bilgilere ilaveten, ülkemizde bor madenlerinin yoğun bulunduğu bazı alanlarda yetişebilen tolerant bitki türlerinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda tahıl ailesine dahil yabancı bir ot çeşiti olan *Puccinellia distans* sahip olduğu bünyesinde yüksek miktarlarda bor biriktirebilme (hiperakümülatör) yeteneği ve bor toksisitesi stresine göstermiş olduğu toleransı sebebiyle dikkat çekmiş ve bu özellikleri sebebiyle bor toksisitesi stresine tolerans mekanizmalarının anlaşılması için fizyolojik ve transkriptomik seviyede yürütülmüş bazı araştırmalarda kullanılmıştır. Ancak, bütün bu bilgilere rağmen bor toksisitesi stresine tolerans mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. COST FA1306: "The quest for tolerant varieties: Phenotyping at plant and cellular level" aksiyonu kapsamında yürütülen bu proje kapsamında, Türkiye'de yapılan fizyolojik çalışmalar sonucunda bor hiperakümülatörü olarak tanımlanan *Puccinellia distans* bitkisi çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Bu bitkideki bor hiperakümülatör yeteneği ve bor toksisitesi stresine tolerans mekanizmalarında görev alan proteinlerin ve ilişkili genlerinin tanımlanmasında, proteomik tabanlı bir sistem biyolojisi yaklaşımı ile incelenmiştir. Sistem biyolojisi yaklaşımı ile *Puccinellia distans*'ın dayanıklılık mekanizmalarının proteomik düzeyde belirlenmesi ve elde edilen sonuçların bu türle transkriptomik düzeyde yapılan çalışmalar ile elde edilen verilerle ilişkilendirilerek dayanıklılık mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına bütünsel bir ortam sağlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

Bor (B) bitkilerde sağlıklı büyüme ve gelişim için gerekli olan mikrobesein elementleri arasındadır. B'nun bitki büyüme ve gelişimi için gerekli bir besin element olduğu yirminci yüzyılın başlarında anlaşılmıştır (Marschner 1995). Günümüzde B'un tüm damarlı bitkiler için esansiyel bir mikrobesein elementi olduğu ve gerek eksikliği ve de gerekse fazlalığı halinde pek çok metabolik ve fizyolojik süreci olumsuz etkilediği bilinmektedir.

Bor elementi 3A grubu içerisindeki en elektronegatif element olmakla beraber, değerlik orbital sayısından bir eksik değerlik elektron sahip olmasının getirdiği kimyasal özellikler sayesinde; cam, temizlik, seramik gibi birçok sanayi alanında hammadde olarak kullanılmaktadır (Kot 2009). Bitkiler, hayvanlar ve insanlarda da metabolik aktivitenin sağlıklı ve devamlı bir şekilde işlemesi için, günlük belirli miktarda B alımının gerekli olduğu bulunmuştur (Nielsen 1998). B elementi bitkilerde önemli bir mikrobesein olarak; hücre duvarı sentezi ve yapısı, hücre zarının yapısı, nükleik asit ve protein sentezi, karbohidrat metabolizması ve taşınması, bitki büyüme düzenleyicilerinin metabolizması ve fenol metabolizmasında görevli olduğu belirtilmiştir (Loomis ve Durst 1992; Ferrol vd. 1993; Marschner 1995; Dave 1996; Goldbach 1997; Camacho-Cristobal vd. 2002; Ahmad vd. 2009).

Bor bitkiler için önemli bir mikrobesein olması sebebiyle eksikliğinde; yaprak büyümesi, kök uzaması, çiçek gelişimi, çiçek ve meyve oluşumu metabolizmalarında sorunlar yaşanmaktadır ve neticesinde bitkinin veriminin düşmesine neden olmaktadır (Dugger 1983; Dell ve Huang 1997). Ayrıca, mısır bitkisi üzerinde yapılan bir araştırmada, B eksikliğine dayalı olarak, kök hücrelerinde aktin ve tubulin proteinlerinin konsantrasyonlarında artış görülmüştür. Bu artışın, B eksikliği nedeniyle zayıflamış hücre duvarının dış etkenlere karşı dayanıklılığını telafi etmek için olduğu bildirilmiştir (Yu vd. 2003). Bir araştırmada B eksikliğinde hücredeki oksidatif stresin kaynağı hücre duvarının zayıflaması sonucu oluşan redox dengesinin bozulması olarak gösterilirken (Kobayashi vd. 2004), diğer bir çalışmada ise B'un hücre zarını oksidatif hasara karşı korumada önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Çakmak ve Römheld 1997). Normal büyüme koşullarının haricinde, bitkilerde üreme gelişimi sırasındaki bor eksikliğinde; tomurcuk, çiçek ve meyvelerin dökülmesi ve meyve ve tohum kalitesinde bozulmalar şeklinde gözlemlenmiştir (Marschner 1995). Bor eksikliğinin bitki metabolizması üzerinde özellikle fotosentezde büyük etki gösterdiği bulunmuştur. Turunç tohumlarıyla yapılan bir çalışmada, ortamda bor eksikliğinden dolayı fotosentezde görev alan enzimlerin aktivitesinin düştüğü, buna bağlı olarak da bitkinin büyümesinin yavaşladığı gözlemlenmiştir (Han vd. 2008). Bor eksikliğinin bitkiler üzerindeki etkileri toprağın gübrelenmesi ile giderilebilir fakat; gübreleme topraktaki bor konsantrasyonunun toksik seviyelere ulaşmasına

sebepe olabilir, ve bu nedenle dikkatle uygulanmalıdır. Bor toksisitesi altında kalan bitkilerde görülen fizyolojik semptomlar; kök hücrelerinin bölünmelerinde yavaşlama, hücre duvarı genişlemesinin engellenmesi, yapraktaki klorofil içeriğinin azalması ve bitkideki lignin ve suberin içeriğinin azalması olarak gözlemlenmiştir (Liu vd. 2000; Nable vd. 1997; Reid 2007). Bunların yanı sıra, eski yapraklarda bor toksisitesine bağlı olarak uç kısımlarda kloroz ile başlayan, toksisitenin devamı durumunda nekrozla sonuçlanan ve yaprağın tümüne yayılabilen bozulmalar olduğu gözlemlenmiştir (Tanaka ve Fujiwara 2008).

Bor elementinin hücre bölünmesinde, pektin ve lignin biyosentezinde, hücre duvarının oluşturulmasında, hücre membran yapısının korunmasında karbohidrat taşınımında, nükleik asit ve azot metabolizmasında, hücredeki fenol seviyesinin kontrolünde ve kök gelişmesinde, bazı enzimlerin fonksiyonunda, çiçeklenmede, polen tüpü gelişiminde, oksin metabolizmasında gibi önemli çok sayıda metabolik ve fizyolojik fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. B bitki metabolizması için bu kadar önemli olmakla birlikte tarım yapılan topraklarda ya da sulama suyunun belli konsantrasyonun üzerinde B ihtiva etmesi, bitkilerde B toksisitesine sebebiyet vermektedir. Yüksek B konsantrasyonlarında bitkilerin kök ve yeşil aksam büyümesi engellenmekte ve ürün verimini ciddi şekilde azaltmaktadır. B toksisitesi özellikle kurak ve yarı kurak alanlarda gözlenmektedir ve bu tür bölgelerde verim düşüşünün en önemli nedenleri arasında sayılmaktadır. Ülkemiz dünyanın en zengin B yataklarına sahiptir ve özellikle Orta Anadolu ve GAP bölgelerindeki tarım arazilerinde B konsantrasyonunun yüksek oluşu tarımsal bitkilerde ciddi verim düşüşlerine neden olmaktadır. Kısacası, fazla miktarda B alımı, toksisiteye sebep olduğundan bitkilerde abiyotik bir stres türüdür ve B eksikliğinden toksik B konsantrasyonlarına geçiş aralığının darlığı, B toksisitesini kontrol altına alınması güç bir abiyotik stres faktörü haline getirmektedir. Abiyotik stress, bir organizmanın büyümesinde, gelişmesinde ve üremesinde sorunlara yol açan, negatif çevresel etmenlerin tümüne verilen genel bir terimdir. Bitkiler, genel olarak, abiyotik stres etmenlerinden olumsuz bir şekilde etkilenmekle birlikte tarımsal amaçlı kullanılan bitkilerde büyüme ve gelişim bozuklukları ile sonucunda verim ve kalite kayıpları gözlenmektedir. Bu nedenle, stress faktörleri ile çalışmalar yapmak her zaman bitki bilimcilerinin dikkatini çekmiştir ve önemli zaman ve kaynak harcanmıştır. Bu çalışmalar arasında; değişik stress faktörlerine dayanıklılık sağlayan genetik kaynakların (tür, çeşit, genotip düzeyinde) belirlenmesi, dayanıklılık ve/veya toleransta rol oynayan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılması, dayanıklı çeşit ıslah çalışmaları, moleküler esaslarının transkriptomik seviyede anlaşılması ve aday genlerin saptanması ve son zamanlarda ise proteomik yaklaşımlar yer almaktadır. Bu nedenle, önerilen projenin kapsamında genel olarak B toksisitesine toleransın moleküler düzeyde

aydınlatılması için fonksiyonel genlerin ve bu genlere ait ürünlerin belirlenmesi ile tolerans mekanizmalarının proteomik yaklaşımla aydınlatılması yer almaktadır.

Bor toksisitesi, B rezervlerinin yüksek seviyede bulunduğu ülkelerde büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır ve ülkenin tarımsal üretimine zarar vermektedir. FAO tarafından 30 farklı ülkeyi kapsayarak yapılan bir araştırmaya göre; Irak, Meksika, Pakistan ve Türkiye, sahip oldukları B rezervleri nedeniyle tarımda ciddi verim kayıplarının olduğu başlıca ülkeler olarak bildirilmiştir (Sillanpaa 1990). Dünya B rezervlerinin yüzde 71.3'üne sahip olan Türkiye'de bu toksisitenin en yoğun olarak gözlemlendiği yer İç Batı Anadolu Bölgesi olarak belirlenmiştir, yapılan araştırmalarda Orta Anadolu ve GAP bölgelerinde de topraktaki B konsantrasyonunun tarımda optimum verimi düşürecek düzeylerde olduğu gösterilmiştir (Soy 2002). Bor toksisitesinin tek sebebi olarak topraktaki bor konsantrasyonunun haricinde, yeraltı sularının madenler ve B yatakları çevresinde yüksek konsantrasyonda B içerdiği ve bu sulama sularının kullanıldığı tarım alanlarında da verim kayıplarına sebep olduğu gösterilmiştir (Stiles vd. 2010). B toksisitesinin giderilmesi için çoğunlukla kullanılan üç yöntem vardır: Sulama, gübreleme veya B toksisitesine toleran bitkilerin ıslahı. Sulama yönteminde, toprağın bitkinin ihtiyacı olandan fazla su ile doyurulması sonrasında bu suyun tahliye edilmesi ve beraberinde topraktaki çözünabilir, fazla B konsantrasyonunu taşıması mantığı kullanılmaktadır (Hoffman1990). Fakat bu yöntem kullanılırken uygulanan su miktarı topraktaki toksik B miktarını normal seviyelere düşürecek kadar fazla olması gerekirken, topraktaki diğer mikrobesev olarak görev yapan mineralleri beraberinde taşımayacak kadar az olmalıdır. Bu dengenin korunması bir hayli zor olmakla beraber, bazı bölgelerdeki bor toksisitesinin sulama suyundan değil, topraktan kaynaklanması bu yöntemin kullanılmasını geçersiz kılmaktadır (Peryea vd. 1985). Bir diğer yöntem olan gübrelemede, toprağa çinko takviyesi yapılarak B toksisitesinin verdiği hasarın azaltılması esas alınmıştır. Arpa (*Hordeum vulgare*) ve portakal (*Citrus aurantium*) üzerinde yapılan çalışmalarda, çinko varlığında B toksisitesi göstermeyen bitkilerin, çinko yokluğunda aynı derişimlerdeki B konsantrasyonlarında toksisite belirtileri gösterdiği bulunmuştur (Graham vd. 1986; Swietlik 1995). Bu çalışmaların üzerine giden Eraslan ve arkadaşları (2007), çinko bakımından yetersiz toprakların, bitkilerde bor alımını arttırarak, B toksisitesine sebebiyet verdiğini rapor etmişlerdir. Çinko gübrelemesine alternatif olarak yapılan diğer çalışmalarda ise fosfor gübrelemesinin de bor toksisitesi semptomlarını azaltmada kullanılabileceği bulunmuştur (Güneş ve Alpaslan 2000). Belirtilen yöntemler B toksisitesine kalıcı bir çözüm sağlamamakla beraber, hem maliyetli, hem de toprağın kimyasal dengesinde değışime sebep olmaktadırlar. B toksisitesi toleranlı bitkilerin ıslahı, topraktaki kimyasal değerlerle oynanmadan tarım bitkilerinin veriminin arttırılması ve topraktaki

toksik seviyelerdeki borun bitkinin bünyesinde biriktirilerek farklı bir alana taşınması için iyi bir yöntem olarak düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda B toleransına karşı farklı bitkilerin farklı mekanizmalar geliştirdikleri görülmüştür. Bazı bitkilerde bor toleransının yüksek B konsantrasyonuna sahip topraktan bünyesine daha az B alınımı, bunun sonucunda ise bünyesinde yüksek miktarda B birikiminin engellenmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Nable 1988; Nable vd. 1990). Bir başka çalışmada ise kökten B alımının gerçekleşip, bitkinin yaprak ve gövdede yüksek konsantrasyonlarda depolanıp tolere edildiği gösterilmiştir (Stiles vd. 2010). Fakat, her iki durumda da gözlenen, kök hücrelerindeki B derişiminin bitkinin yetiştirildiği ortamdaki bor derişimine nazaran çok düşük seviyelerde kaldığı olmuştur (Dordas ve Brown 2000). Var olan bu sonuçlardan tolerans mekanizmasının B'un hücre içine girişinin düşük hücre zarı geçirgenliğiyle engellenmesinden mi, yoksa hücre içine giren B'un aktif olarak dışarı pompalanmasından mı kaynaklandığı sorgulanmış ve yapılan çalışmalarda bu durumdan B'un hücre dışına aktif olarak pompalanmasının sorumlu olduğu tespit edilmiştir. B toksisitesine dayanıklı arpa türü Sahara ve dayanıksız Schooner, B toleransının moleküler temelini anlamak üzere incelenmiş ve Sahara türündeki dayanıklılığın, B'un kök hücrelerinde ATP bağımlı bir aktif taşıma sistemi ile dışarı pompalanmasından kaynaklandığı ortaya çıkarılmıştır (Hayes ve Reid 2004). Bitkilerde Tanako ve arkadaşlar tarafından yapılan 2002 tarihli araştırmada B'un taşınmasında rol oynayan ve düşük B konsantrasyonlarında yüksek seviyelerde anlatımı sonucu bitkilere dirençlilik sağlayan BOR1 geninin ortoloğu olan Bot1 geninin B toksisitesine dirençte önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, bu iki proteinin de B taşınmasında görev aldığı bulunmuştur. Tarımsal önemi olan ve doğal olarak B toksisitesine dayanıklılığı olan Sahara arpa çeşidinin, toleransı olmayan Clipperra çeşidindeki Bot1 geni ve ifadelenmesindeki farklılıklara bakıldığında, Sahara çeşidinde 3.8 kat daha fazla Bot1 gen kopyası, ve kök ve yapraklarda sırasıyla 160, 18 kat daha fazla ifadelenme görülmüştür (Sutton vd. 2007). Bot1 geninin bulunması sonucunda, tarım bitkilerinde aktif B taşıyıcılarının tanımlanması için çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda, *Arabidopsis thaliana* ve çeltik (*Oryza sativa*) bitkilerinin bulunmuş olan B taşıyıcısı genlerinin dizilim benzerliklerini kullanarak, TaBOR2 (*Triticum aestivum*) ve HvBOR2 (*Hordeum vulgare*) genleri tanımlanmıştır. Daha sonra bu genlerden elde edilen diziler kullanılarak tasarlanan prob HvBOR2 geninin arpa genomu üzerindeki yerinin saptanması için Southern Blot analizinde kullanılmıştır ve genin 4H kromozomu üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Takano 2008; Reid 2007). B toksisitesi toleransı üzerine yapılan çalışmalar devam ettikçe, dayanıklı bitkilerin sadece taşıyıcı proteinler kullanmadıkları bulunmuştur. Mayalar üzerinde yapılmış bir çalışmada, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde tanımlanan bazı transkripsiyon faktörlerinin ve ribozomal proteinlerin mayada

ekspresyonu sonucu, mayaların B toksisitesine direnç gösterdiği bulunmuştur (Nozawa vd. 2006; Reid 2007b). Önceden yapılan çalışmalarda B'un in vitro pre-mRNA splicing tepkimelerini inhibe ettiği tespit edilmiştir ve toksisitesinin başlıca sebeplerinden birinin bu olduğu düşünülmektedir (Reid 2007b). Bu bilgiler doğrultusunda, mayada ekspresyonu olan bu proteinlerin mRNA splicing bölgelerini bordan koruyabileceği ve dolayısıyla B toksisitesinden kaynaklanan mRNA splicing tepkimelerinin inhibisyonun engellendiği düşünülmektedir. Bir diğer çalışmada ise Arabidopsis bitkisinin köklerinde ve yapraklarında bulunan At1g03770 adlı çinko parmak transkripsiyon faktörü geninin B toksisitesine dirençte önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Kasajima ve Fujiwara 2007). Bu sonuç, aynı zamanda çinko gübrelemesinin bitki üzerinde oluşan B toksisitesinin neden azalttığını da göstermektedir. Arpada B toksisitesine direnç kazanmada rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin bulunması, ancak ve ancak gerçekleştirilen proteomiks çalışmalar ile mümkün olabilmıştır (Patterson vd. 2007). Fakat *Puccinellia distans* bitkisi üzerinde proteomik yaklaşımla B toksisitesine dirençte rol oynayan proteinlerin tanımlanmasına ilişkin herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Protein ekspresyonu dış etkenlere, hücredeki lokalizasyona ve hatta hücrenin yaşam döngüsünün hangi kısmında olduğuna göre değişiklik göstermektedir. mRNA ve Protein konsantrasyon değerleri her ne kadar bağlantılı olsa da, birbirleriyle doğru orantılı oldukları söylenemez.

Bitkilerin B toksisitesine karşı tolerans mekanizmalarında büyük farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bu farklılıklar, arpa ve buğday çeşitlerinde yapılan çalışmalarda (Nable 1988; Paull vd. 1988), sekiz farklı pamuk çeşidi kullanılarak yapılan çalışmada (Harite ve Aydın 2008), kuraklığa dayanıklı Gökçe ve dayanıksız Küsmen nohut çeşitlerinde yapılan çalışmada (Ardıç vd. 2008; 2009) gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, toprak ve sulama suyunda yüksek tuz (NaCl) ve B derişimine sahip olan Lluta vadisinde (Şili) yetiştirilen bir domates çeşidi olan Poncho Negro'nun, B toksisitesine dayanıklı domates çeşitlerinin ıslahı için genetik bir kaynak olabileceği rapor edilmiştir (Diaz vd. 2011). Babaoğlu ve arkadaşlarının 2004 tarihli çalışmasında, Eskişehir Kırka B madeni çevresinde yüksek B konsantrasyonu bulunan toprakta büyüeyebilen ve B'u bünyesinde yüksek konsantrasyonlara kadar biriktirebilen ve toksik semptomları göstermeyen iki bitki türü (*Gypsophila sphaerocephala* ve *Puccinellia distans*) tanımlanmıştır. Buğday, arpa gibi bitkiler ile aynı ailede bulunan *Puccinellia distans*'in tolerans mekanizmalarının tarımsal önemi olan bitkilerde de bulunması bu organizmada B toleransı ile ilişkili mekanizmaların aydınlatılmasının önemini işaret etmektedir. Ayrıca bu bitki B açısından fakir topraklarda gübre olarak kullanılarak tarımsal verimliliği destekleyebilir. Mevcut potansiyellerini açığa çıkarmak üzere *Puccinellia distans* ve *Gypsophila* türleri üzerinde yapılan fizyolojik çalışmalarda, bitkinin B tolerans mekanizmaları araştırılmış ve

B'un bitkinin kök kısımlarında değil, filiz ve yaprak kısımlarında depolandığı bulunmuştur (Stiles vd. 2010). Daha sonra yapılan çalışmalarda, bu tolerans mekanizmalarının genetik temellerinin bulunması amaçlanmış ve *Puccinellia distans* ve *Gypsophila arrostif*'in tolerans mekanizmalarının genetik temellerinin bulunması için yapılan transkriptomik analiz sonucunda, ifadelemesinde yükselme gözlenen genler; metabolizma, protein sentezi, hücre organizasyonu ve stres tolerans olmak üzere fonksiyonlarına göre dört grupta tanımlanmıştır (Padmanabhan 2012). Moleküler düzeyde tolerans mekanizmalarının aydınlatılması için çalışmalar yapılmış olmasına rağmen söz konusu organizmalar ile proteomik düzeyde gerçekleştirilen herhangi bir çalışmanın olmaması translasyon sonrası modifikasyon mekanizmalarının proteinleri ne düzeyde etkilediği ve bu modifikasyonların toksisiteye karşı dirençlilikte nasıl bir avantaj sağladığı tanımlanamamıştır.

Sonuç olarak, B toksisitesinin engellenmesi için gerçekleştirilen fiziksel önlemler geçici ve yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle B toksisitesine karşı alınacak en iyi önlemin B toksisitesine dayanıklı bitki türleri yetiştirmek olduğu düşünülmüştür. Bu hedefin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle B toksisitesine karşı tolerans mekanizmalarının anlaşılması amaçlanmıştır. *P. distans* bitkisinin B'a karşı gösterdiği yüksek tolerans ve bünyesinde biriktirme özelliği onu bu konuyu çalışmaya mükemmel bir model haline getirmiştir. Çalışmalar sonucunda B toksisitesine tolerans mekanizmalarının anlaşılması için proteomik yaklaşımla dirençte rol oynayan proteinlerin tanımlanması sağlanmış ve toleransta rol oynayan proteinlerden ilgili gen dizileri tespit edilmiştir. Böylece, gerek tanımlanan mekanizmaların buğday, arpa gibi *P. distans* bitkisine yakın akraba olan bitkilerin tolerans mekanizmalarının tanımlanmasında kullanılabilecek, gerekse toprağın B'a karşı fitoremediasyonunda kullanılabilecek bitkilerin geliştirilmesinde elde edilen bilgiler kullanılabilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi ve Toksik Bor Stresi Uygulanması

Proje kapsamında kullanılacak *Puccinellia distans* tohumları Prof. Dr. Mehmet Babaoğlu (Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) tarafından sağlanmıştır. Tohumlar, petri kaplarında karanlık ortamda çimlendirildikten sonra, toprağa aktarılmıştır. Çimlenen tohumlar, bitki büyütme kabini içerisinde koşulları $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, %60 nemlilik ve 16/8 saat ışık/karanlık foto periyodunda 2 hafta süreyle büyütülmüştür. Yeterli büyümenin sonunda bitkiler topraktan alınarak, havalandırılmış yarım şiddetli Hoagland çözeltisine aktarılmıştır. Çözeltide 1 haftalık büyüme evresinin sonunda bitkiler iki gruba ayrılıp; *Puccinellia distans* bitkisi için çözeltideki bor konsantrasyonu 0.5 mg B/L (kontrol) ve 500 mg B/L (toksik B uygulaması) olacak şekilde ayarlanmıştır. Gruplar üçer tekerrürlü olacak şekilde ve bor uygulaması, çözeltinin her 5 günde

değişmesi ile 3 hafta boyunca devam ettirilmiştir (Padmanabhan 2012). Proje kapsamında kullanılan tohumlar bor madenlerinin bulunduğu alanlardan toplanmış olmasına rağmen toplanan bütün genotiplerin boron hiperakümüülasyon yeteneğine sahip olmaması ve boron tolerant olmama riski bulunmaktadır. Bu riski ortadan kaldırmak için çalışmada sadece yüksek düzeyde boron biriktirdiği spektrofotometrik olarak ölçülen bitkiler proteomik ve transkriptomik çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2. Bitki Dokularındaki Bor Miktarının Belirlenmesi

Bitki dokularındaki Bor konsantrasyonunu belirlemek için yapılan ölçümlerde kontrol ve stres grubu bitkilerin yaprak ve kök dokularından alınan örnekler kullanılmıştır. Bu işlemler için kontrol ve bor stresi gruplarından yaprak ve kök dokuları hasat edilmiştir. Hasat sonrası örnekler 65°C'de kurutulup ağırlıkları sabitlenmiştir. Sonrasında kurutulan örneklerden her bir grup için eşit miktarda örnek 500°C'lik fırınlarda 6 saat yakılmış ve karbonu uçurulan kül 5ml 2M'lık HNO₃'te çözülmüştür. Bor ölçümleri için hazırlanan örnekler Wolf (1971) tarafından geliştirilen azomethine-H yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kuru ağırlıktaki bor konsantrasyonu ug g⁻¹ olarak ifade etmiştir.

2.3. Protein İzolasyonu ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein ekstraktları kontrol ve bor stresi muamelesi görmüş *Puccinellia distans* bitkilerinden alınan yaprak ve kök örnekleri kullanılarak hazırlanmıştır. Protein ekstraksiyonu için fenol ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirilmiş ve proteinler amonyum asetat ile çöktürülmüştür (Carpentier vd. 2005). Bu ekstraksiyon yöntemi fenolik madde, lipit ve karbohidrat gibi moleküllerden zengin bitki örnekleri için uygun bir yöntemdir. Alınan kök ve yaprak örneklerinden 3g sıvı azot ile birlikte havanda homojenize edilmiş ve toplam protein 2°C'de aşağıdaki kimyasalları içeren 3 ml ekstraksiyon tamponu içerisinde çözülmüştür (Harder vd. 1999): 500mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 700 mM sükroz, 100 mM KCl, %2 b-merkapt etanol ve 1mM PMSF pH 8. Ekstraksiyon tampon çözeltisi eklendikten sonra örnekler buz üzerinde 10 dk süreyle çalkalanmış ve ardından üzerlerine eşit miktarda trisle tamponlanmış fenol eklenerek 10 dk süreyle oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Ardından, örnekler 10 dk 10000g'de santrifüjlenmiş ve fenol fazı başka bir tüpe alınıp üzerine eşit miktarda ekstraksiyon tampon çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 10 dk süreyle çalkalanmıştır. Ardından örnekler tekrar 10 dk 10000g'de santrifüjlenmiş ve fenol fazı tekrar yeni bir tüp içerisine alınarak üzerine metanolde hazırlanmış 0.1M amonyum asetat çözeltisinden 3 hacim eklenmiştir. Örnekler proteinlerin çökmesi için 16 saat kadar -20°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 20 dk süreyle 10000g'de santrifüjlenmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken protein pelletleri önce çöktürme çözeltisi ile yıkanmış ve tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Supernatant

tekrar uzaklaştırıldıktan sonra pellet aseton ile yıkanıp santrifüjle çöktürülmüştür. Yıkama işlemlerinin ardından, çöktürülen protein pellet fazla asetonun uzaklaşması için oda koşullarında birkaç dakika bekletilmiştir. Ardından 7M üre, 2 M tioüre, %4 CHAPS, 65mM DTT ve %2 pH 3-10 amfolit içeren rehidrasyon tampon çözeltisinde çözülmüştür. Rehidrasyon tamponundaki toplam protein konsantrasyonları Bradford (1976) yöntemi ile 5-100 ug/ul aralığında sığır serum albumin konsantrasyonları standart olarak kullanılarak belirlenmiştir.

2.4. 2D-PAGE (Çift Boyutlu Jel Elektroforezi)

Proteinler öncelikle yüklerine göre ayrıştırılmıştır. İzoelektronik odaklama işlemi bor stresi uygulanmış stres ve kontrol grubu bitkilerden alınan kök ve yaprak örneklerinin 3g'dan izole edilen toplam protein ekstraktından 150ug örnek ile gerçekleştirilmiştir. pH 3-10 ve pH 4-7 arasında doğrusal olmayan immobilize pH gradient oluşturan jel stripleri üzerinde proteinler ayrıştırılmıştır. Stripler 12 saat 22°C' de %2 (v/v) Triton X-100, 20 mM DTT ve protein ekstraktını içeren tiyoüre/üre lizis tamponu ile aktif rehidrasyon işlemine maruz bırakılmıştır. IEF işlemi 22°C' de 1 saat 300V ve 7 saat 3500V' ta Protean i12 IEF System (Biorad) cihazında gerçekleştirilmiştir.

IEF işleminden sonra proteinler molekül kütlelerine göre SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılmıştır. Proteinler ikinci boyutta ayrıştırılmadan önce jel stripleri 6 M üre, 30% (v/v) gliserol, 2.5% (w/v) SDS, 0.15 M bis-Tris, and 0.1 M HCl (Görg vd. 1987; Harder vd. 1999) içeren ekülibrasyon tamponununun 2x 100 ml'si ile 2 x 20 dk ekülibre edilmiştir. İlk ekülibrasyon işleminde içinde DDT (50mM) bulunan ekülibrasyon tamponu, ikincisinde ise %4 (w/v) iyodoasetamid içeren ekülibrasyon tamponu kullanılmıştır (Harder vd. 1999). Ekülibre edilen stripler dikey poliakrilamid jelin [12% (v/v) akrilamid, 0.33% (w/v) piperarine diakrilamid, 0.18 M Trizma base, 0.166 M HCl, 0.07% (w/v) ammonyum persülfat, 0.035% (v/v) Temed ve %0.1 SDS) üzerine yerleştirilmiştir. Stripler jelin üzerine yerleştirildikten sonra [1% (w/v) düşük erime noktalı agaroz, 0.4% (w/v) SDS, 0.15 M bis-Tris ve 0.1 M HCl] içeren tavlayıcı çözelti jelin üzerine eklenmiştir. Agaroz katıldıktan sonra elektroforez 0.025 M Trizma base, 0.25M glisin, % 0.01(w/v) içeren pH 8,3'lük tampon içerisinde 10°C'de 35 V'ta 1 saat ve 110 V'ta 14 saat olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen her koşul için üç adet 2D-jel hazırlanmış ve analizlerde kullanılan proteinler bağımsız olarak üç kez ekstrakte edilmiştir.

Jeller 50 ile 1000 ng arasında deteksiyon aralığı bulunan colloidal comassi brilliant blue yöntemi ile 12 saat süreyle boyanmıştır. Jellerin stabil olarak saklanabilmesi için öncelikle pH 6.3'lük 0.1M tris-fosfat tamponu ile ekülibre edilmiştir. Ekülibrasyonun ardından, %25'lik metanol çözeltisi ile yeniden boyanmış ve jeller son olarak %20 amonyum fosfat çözeltisi ile homojen hale getirilip %5'lik asetik asit çözeltisinde saklanmıştır. Boyanan jeller VersaDoc (Biorad) jel görüntüleme

sistemi ile görüntülenmiştir. Görüntü analizleri PDQuest (Biorad) programı ile gerçekleştirilmiştir. Spotların tanımlanması ve arka planın çıkarılmasından sonra 2D jeller hizalanması, karşılaştırılması ve spot hacimlerine dayanılarak kalitatif değerlendirilmelerin yapılması ile gerçekleştirilmiştir. İfadelenmesi 2 kattan fazla değişen protein spotları belirlenip kütle spektrosu yöntemiyle tanımlanmak üzere jelden kesilmiştir. Jel boyama sırasında kullanılacak boyalar arasında; Sypro Ruby ve Gümüş boyama ile 1ng seviyesindeki protein noktaları gözlenebilirken, commassie mavi tekniği ile 30-40 ng seviyesindeki protein noktaları gözlenmiştir. Bu sebeple, ilk defa yapılan çalışmalarda genelde en hassas boyama tekniği kullanılırken, metod geliştirme sırasında coomassie mavi boyamasının yapılması kullanılmıştır.

2.5. LC-MS/MS için Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu LC-MS cihazındaki analizlerde sorun çıkarmaması için özel olarak deterjandan arındırılmış (CHAPS kullanılmadan) bir metot ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak sağlıklı sonuçlar alabilmek için bütün örnekler LC-MS analizine üçer tekrarlı olarak hazırlanmışlardır. Bu izolasyon metoduna 0.1g yaprak, 0.3g kök dokusu kullanılarak başlanmıştır. Örnekler sıvı nitrojen ile havanlarda ince toz haline gelene kadar ezilip tüplere alındıktan sonra, üzerlerine 2ml/0.3g olacak şekilde ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, %1 DTT, %30 Sükroz, 1 tablet tüm proteaz inhibitörü/ 10 ml) eklenmiştir (Yaprak dokuları için bu oran 2ml/0.1g olarak gerçekleştirilmiştir). 10 dk 4°C de vorteksledikten sonra örnekler 12000 rpm 4°C de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Üst faz temiz bir 50ml'lik tüpe alınıp aynı hacim ekstraksiyon tamponu eklenerek örnek tekrar 12000 rpm 4°C de 5 dk santrifüjlenmiştir. Üst faz bir önceki fazla birleştirilip üstüne 5 hacim 100mM amonyum asetat eklenerek -20°C de bir gece boyunca çökelmeye bırakılmıştır. Ertesi gün proteinler 13000 rpm, 4°C de 60 dk santrifüjlenerek çökeltilmiş ve üst faz atılmıştır. Çökelti iki defa, (çökeltiyi çözmeden) birinci seferinde örneği -20 °C de 1 saat inkübe ederek % 0,2 DTT/soğuk aseton çözeltisiyle yıkanmıştır. Her yıkamanın sonrasında örnek 13000 rpm, 4°C de 30 dk santrifüjlenip üst faz atılmıştır. Son yıkamadan sonra örnekler çeker ocak altında çökelti şeffaflaşmaya başlayana kadar kurutulmuş ve uygun miktarda liziz tamponu (8 M Üre, 5mM DTT, 30 mM Tris) ile çözülene kadar, örneğin fazla ısınmamasına dikkat ederek, vortekslenmiştir. Protein konsantrasyonu GE Life Sciences 2D-Quant kit ile belirlenmiş ve örneklerden son protein miktarı 20 µg olacak hacimde alınıp alkilasyon protokolüne devam edilmiştir.

2.6. Protein Alkalizasyonu ve LC-MS/MS Ölçümleri

Alkalizasyon ve LC-MS prosedürü Leuven Katholieke Üniversitesi, Biyosistem Bölümü Sistem Biyoloji tabanlı Kütle spektrometre (SyBioMa) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tüm protein

alkalizasyon aşamaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Örnek hacmine bağlı olarak, 0.2 M DTT her örneğe eklenmiş ve sonuçta son reaksiyon konsantrasyonu olarak 0.02M elde edilmiştir ve 15 dakika inkübe edilmiştir. Protein/DTT karışımı 0.5M IAA stoğu ile 10 kat seyreltilmiştir ve yeni karışım karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu karışım 0.15M amonyum bikarbonat stok solüsyonu ile 3 kat seyreltilmiştir. Ardından 0.2 µg tripsin enzimi eklenmiş ve solüsyon 37°C'de 1 gece beklemiştir. En son adımda bu örnekler %1 TFA ile, son reaksiyon solüsyonu %0.1 TFA içerecek şekilde seyreltilmiştir. Örnekler kontaminasyona yol açabilecek tüm tuzlardan Pierce C18 Spin Columns (ThermoFischer Scientific, Lot: 89870) üretici protokolüne göre kullanılarak arındırılmıştır. Saflaştırılmış örnekler vakumla kurutulmuş ve -20°C'de analiz sürecine dek saklanmıştır. Örnekler -20°C den çıkartılıp % 0.1 lik Formik asit (FA) içerisinde çözülerek LC-MS analiz vialine alınmıştır. LC-MS protokolünde ters faz ayırma kolonu kullanıldığından proteinler hidrofobisitelere göre ayrılmışlardır. Bu amaca ulaşmak üzere LC cihazı %99.9 dH₂O + %0.1 FA (Çözelti A) dan başlayarak %20 dH₂O + %80 Asetonitril + 0.08 FA (Çözelti B) ye doğru bir saat içerisinde kademeli bir geçiş gerçekleştirmiştir.

2.7. Kütle spektrometre verilerinin analizi ve peptitlerin tanımlanması

Kütle spektrometre verilerinin tanımlanmasında 2 temel yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlardan ilki analiz edilen örneklere ait nükleotit veya aminoasit dizi veri tabanı bulunması durumunda uygulanan veri tabanı arama yaklaşımıdır. Diğer yaklaşım ise bu tip veri tabanlarının bulunmadığı veya veri tabanının yetersiz yahut modifiye olduğu durumlarda tanımlanması mümkün olmayan spektraları spektraldaki özelliklerden hareketle peptitlere eşleyen *de novo* dizileme yaklaşımıdır. Proje önerisinde belirtildiği üzere, bu çalışmada ölçümü yapılan peptilere ait spektraların tanımlanması için veri tabanı arama yaklaşımı kullanılmıştır. Gelişme raporu 3'de izlenen yol modifiye edilmiş ve biyoinformatik analizler tekrarlanmıştır. *Puccinellia distans*'ın model organizma olmaması sebebiyle bazı tür spesifik proteinlerin mevcut olması söz konusudur. Bu sebeple veri tabanının yenilenmesine karar verilmiştir. Çalışmada 3-çerçeve translasyonu yapılmış *Puccinellia distans* transkriptomu, *Puccinellia distans*, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* proteinleri ve *de novo* dizileme yöntemi ile bulunmuş peptitlerden oluşan bir veri tabanı kullanılmıştır. *De novo* dizileme Novor algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda çalışma süreleri göz önünde bulundurularak MSGF+ (Kim vd. 2010), OMSSA (Geer vd. 2004), X!Tandem (Craig ve Beavis, 2004) veri tabanı arama algoritmaları seçilmiştir. Literatürde birden çok algoritmanın kullanılarak her bir spektrum için tüm algoritmalarının sonuçlarının birleştirilerek en çok algoritma tarafından bulunan konsensus peptidin hatalı-pozitif eşleşme (false-positive) oranını düşürdüğü gösterilmiştir. Bu nedenle söz konusu çalışmada 3 farklı algoritma kullanılmıştır. Bu

algoritmalar için çalışma ayarları sırasıyla prekürsor iyon tolerans: 30ppm ;fragment iyon tolerans: 0.2Da; fragmentasyon tipi HCD olarak ayarlanmıştır. Hata tolerans değerleri değeri cihaz üreticisi tarafından önerilen ve önceki çalışmalarda da kullanılmış değerlerdir. Bitki yetiştirilmesi sırasında proteinlerde oluşabilecek post-translasyonel modifikasyonlardan ötürü deaminasyon, sistein karboksimetilasyon, sistein karboamidometilasyon, metiyonin oksidasyonu, serin/treonin/tirozin fosforilasyonları modifikasyonlar olarak belirlenmiştir. Ayrıca tripsin enzimatik kesimine uğrayan protein örneklerindeki kesim toleransı hesaba katılarak kesim-atlaması(miscleavage) değeri 2 olarak belirlenmiştir. Peptit uzunluğu değeri ise 6 ile 30 arasında verilmiştir. Ayrıca bazı algoritmalar için özgün ayarlamalarda yapılmıştır. OMSSA programı bir peptit dizisinin farklı protein dizilerinde bulunması halinde her bir protein lokasyonunu ayrı bir peptit-spektrum eşleşmesi olarak verdiği için bu algoritmanın bir spektrum için hit sayısı 30'a çıkarılmış ve E-değeri 1000000 olarak verilmiştir. Bu algoritmaların kabul ettikleri girdi (input) spektra veri formatı MGF (Mascot Generic File Format)'dir. Bu nedenle cihazdan RAW formatında alınan veriler Proteowizard programı kullanılarak .MGF formatına çevrilmiştir. Program bazı spektrallara yük (charge) ataması yapamadığı için aynı tarama numarasına (scanID)'ye ve tamamen aynı piklere sahip olup sadece spektrum tanım kısmında farklı yük değerleri olan spektrallar ortaya çıkmıştır. Geliştirme raporunda bu spektrallar elimine edilmiştir. Ancak tekrarlanan analizde yük tahmini algoritmalar tarafından tahminlenmiştir.

2.8. EST Analizleri

EST veri tabanı oluşturulması için projede öngörülmemesine rağmen stres ve kontrol grubu bitkiler kullanılarak RNAseq tekniği kullanılarak transkriptomik dizileme yapılmıştır. Bu işlem için toplam RNA izolasyonu, bitki gövdelerinden RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA) kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen kontrol ve stres RNA'larının kaliteleri ve miktarları Nanodrop ND-100 aleti (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Toplam RNA izolasyonu yapılan örnekler TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit (Illumina, Tokyo, Japan) kullanılarak cDNA kütüphanesi oluşturmakta ve sonrasında EST tanımlanmasında kullanılmıştır. EST'ler, Illumina High-Seq 2000 platform (Takara, Tokyo, Japan) kullanılarak ve 125 baz çifti eşlenmiş uç (paired end) okuması yapılarak kontrol ve stres kütüphaneleri oluşturmak üzere sekanslanmıştır. RNA sekanslama hizmeti GATC Biotech Firması (Constance, Germany) tarafından sağlanmıştır. Örnek başına okuma uzunluğu 125 nükleotide sabitlenmiş olan ham veriler 45 milyon okuma olarak elde edilmiştir. Cutadapt2 (version 1.9.1) programı (Martin 2011) varsayılan ayarlarda kullanılarak, ham verilerin adaptör sekanslardan ve düşük kalitedeki nükleotidlerin temizlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Referans transkriptom oluşturulması için Trinity (version 2.2.0) programı

kullanılmıştır (PMID: 23845962) (Haas vd. 2013). Kontrol ve stres olmak üzere tüm örnekler aynı şekilde işlenmiştir. Sonrasında, oluşturulan referans transkriptom kontrol ve stres veri setlerinin Bowtie2 programı (version 2.1.0) kullanılarak ayrı haritalanmasında kullanılmıştır (Langmead ve Salzberg 2012). Her veri setine özgü haritalama bilgisi ikili hizalama bilgisi (binary alignment) (bam dosyası) olarak kaydedilmiştir. Bam dosyaları ise farklı gen ifadesi gösteren verilerin analizinde Cufflinks (version 2.2.1) pipeline (Cufflinks, Cuffmerge ve Cuffdiff) için veri olarak kullanılmıştır (Trapnell vd. 2012). Çıktılar ise cummeRbund (version 2.15) R istatistik paketi ile analiz edilmiştir (Goff vd. 2013). Farklı ifade gösteren genler için sınır q-değerine göre belirlenmiştir (q-value threshold < 0.05). Farklı ifadesi olan genlerin anotasyonları *Oryza sativa* ve *Arabidopsis thaliana* proteinlerine karşı (UniProt Knowledgebase) (Yayınlama Tarihi: November 2016) Blast2GO (version 4.0.7) (Conesa vd. 2005) programıyla yapılmıştır. QuickGO (Binns vd. 2009) kullanılarak gen ontoloji analizleri tamamlanmıştır. Proteinlerin, gen ontolojileri esas alınarak fonksiyonel sınıflandırılması için PANTHER Protein Classification System kullanılmıştır (Mi vd. 2016). Anotasyonları yapılan transkriptlerin yollarının belirlenmesine ilişkin analiz KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanı kullanılarak tamamlanmıştır (Tanabe ve Kanehisa 2012). *Puccinellia distans*'ta bor stresine cevap veren 30 genin ifadesi üç biyolojik replikanın her birinden üç teknik tekrar olacak şekilde qRT-PCR kullanılarak doğrulanmıştır. İzole edilen toplam RNA, DNase I (Takara, Shiga, Japan) kullanılarak temizlenmiştir. cDNA sentezi GoTaq® 2-Step RT-qPCR kit (PROMEGA) ile yapılmış ve sentezlenen cDNA'lar LightCycler® 480 system'de transkript özel markörler kullanılarak gözlenmiştir (Roche, Basel, Switzerland). Kullanılan 30 transkript farklı ifade edilmiş genler arasından rastgele seçilmiştir. Ayrıca, daha önceden bilinen bir ABC taşıyıcı ile bor taşıyıcı proteinlerin de markörleri eklenmiştir (Padmanabhan vd. 2012).

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Bitkilerin Büyütülmesi ve Toksik Bor Uygulaması

Projede kullanılan boron hiperakümülatör *Puccinellia distans* tohumları Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünden Prof. Dr. Mehmet Babaoğlu tarafından sağlanmıştır. Tohumlar, petri kaplarında karanlık ortamda çimlendirildikten sonra, toprağa aktarılmıştır. Çimlenen tohumlar, bitki büyütme kabini içerisinde koşulları 25±2°C, %60 nemlilik ve 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodunda 4 hafta süre ile büyütülmüşlerdir. Yeterli boyuta ulaşan bitkiler yarım şiddetli Hoagland çözeltisine alınıp sıvı ortama alışma dönemi olarak bir hafta süresiyle aynı koşullar altında büyütülmüşlerdir. Çözeltide 1 haftalık büyüme evresinin sonunda bitkiler iki gruba ayrılıp; *Puccinellia distans* bitkisi için çözeltideki bor konsantrasyonu 0.5 mg B/L (kontrol) ve 500

mg B/L (toksik B uygulaması) olacak şekilde ayarlanmıştır. Gruplar üçer tekrarlı olmuş ve bor uygulaması, çözeltinin her 3 günde değişmesi ile 3 hafta boyunca devam ettirilmiştir (Padmanabhan 2012). Üç haftalık stres süreci sonundaki bitki yapıları üzerinde Şekil 1'de görüldüğü gibi yaprak uçlarındaki klorozdan başka bir belirti oluşmamıştır. Bu süreç sonunda bitkiler hasat edilmiş, kök ve yaprakları birbirinden ayrılarak -80°C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır.



Şekil 1. Üç haftalık stres uygulaması sonucu *P. distans* bitkilerinin durumu

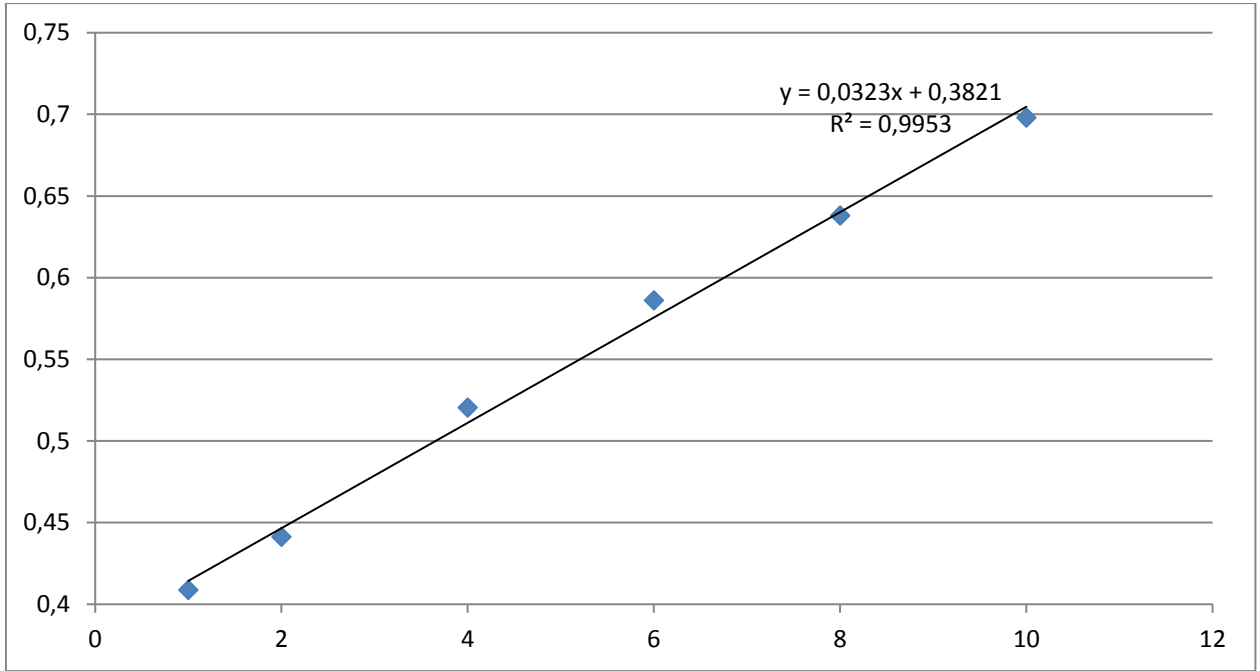
Bor ölçümleri projede tanımlanan Spektrofotometrik Azomethine-H yöntemi ile ölçüm yapılması yerine ölçüm hassasiyeti daha yüksek ve standart sapması daha az olan ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Ar-Ge Merkezinde bulunan ICP-MS (İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) cihazı ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Ölçümde bulunan sonuçlarda *P. distans* bitkisinin bor stresi altında 1g kuru ağırlığında 6 mg'dan daha fazla bor biriktirebildiği gözlenmiştir (Tablo 1). Bu sonuçlar beklenenin çok üzerinde olup bitkinin gelişimini büyük ölçüde etkilememesi bu bitkinin potansiyel fitoremedik özelliklerini daha da önemli kılmaktadır.

Tablo 1. ICP-MS ölçümlerinden elde edilen 1g kuru ağırlıktaki B miktarları

ICP-MS <i>Puccinellia distans</i> bor birikim sonuçları		
B ($\mu\text{g/g}$)	Kök	Yaprak
Kontrol (0.5 mg B/L)	137.8	127.2
Stres (500 mg B/L)	6161	6526
Babaoğlu ve arkadaşları tarafından ölçülen <i>Puccinellia distans</i> bor birikim sonuçları		
B ($\mu\text{g/g}$)	Kök	Yaprak
Doğal ortamdan alınan (belirsiz B konsantrasyonunda)	241.0	802.0

3.2. Protein İzolasyonu ve Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

B stresine mağruz bırakılmış ve kontrol olarak büyütülmüş *P. distans* bitkisinin yaprak ve kök dokularından izole edilen proteinler Bradford yöntemi ile analiz edilmiş ve toplam protein miktarları belirlenmiştir. Şekil 2 'deki standart grafik kullanılarak yapılan protein miktar tayini sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.



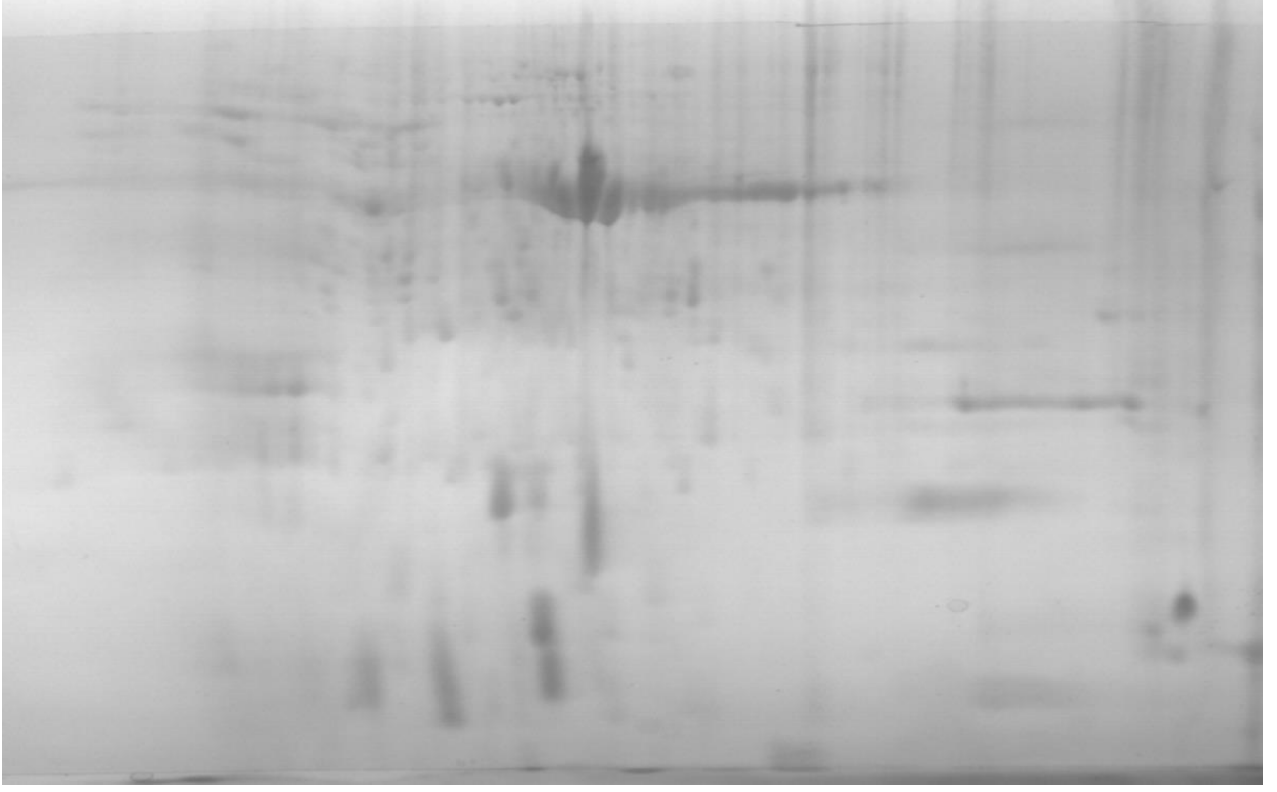
Şekil 2. 1-10 $\mu\text{g/ml}$ aralığında Bradford Standart Grafiği

Tablo 2. Standard Grafiğinden hesaplanan toplam protein konsantrasyonları

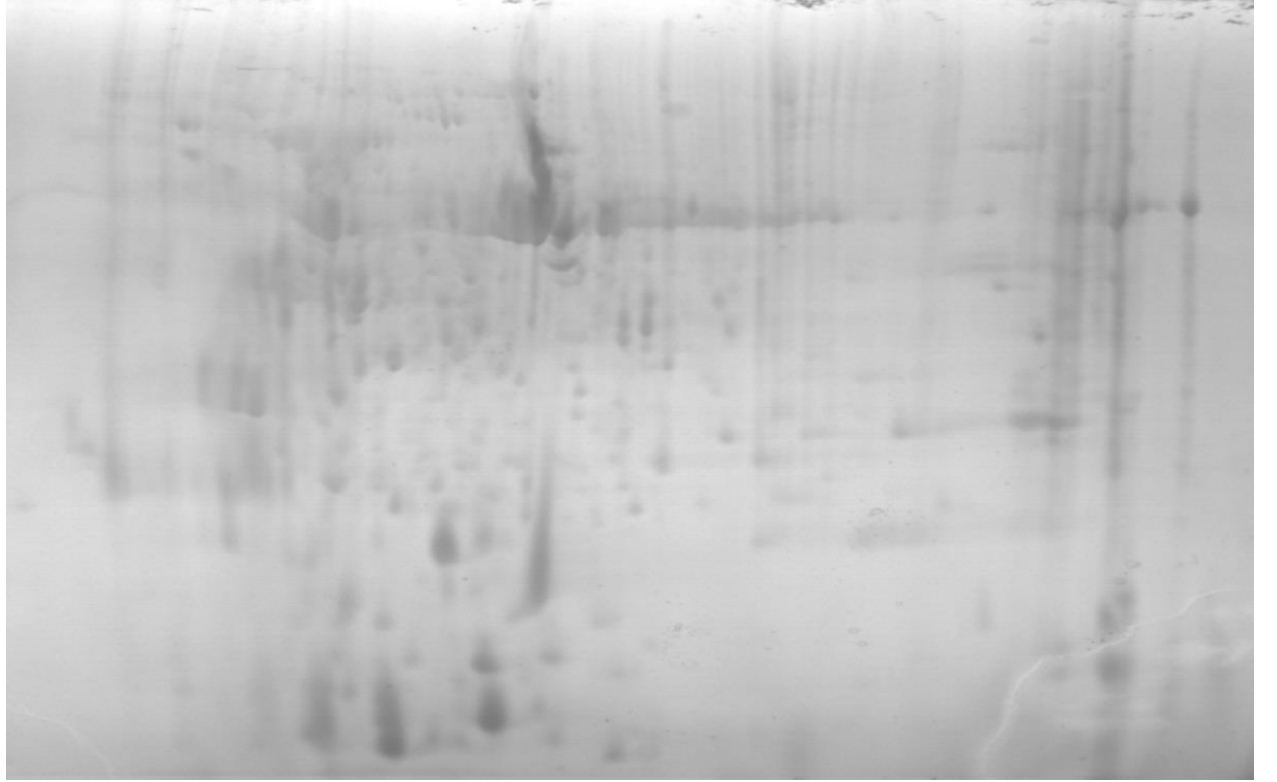
	Konsantrasyon ($\mu\text{G/ml}$)			
Tekrar	LS	RS	LC	RC
1	2.504644	3.123839	2.721362	3.681115
2	2.907121	3.123839	2.721362	3.959752
3	2.721362	3	2.195046	4.114551
Ortalama	2.711042	3.082559	2.545924	3.918473

3.3. 2D-PAGE (İki Boyutlu Jel Elektrofözezi)

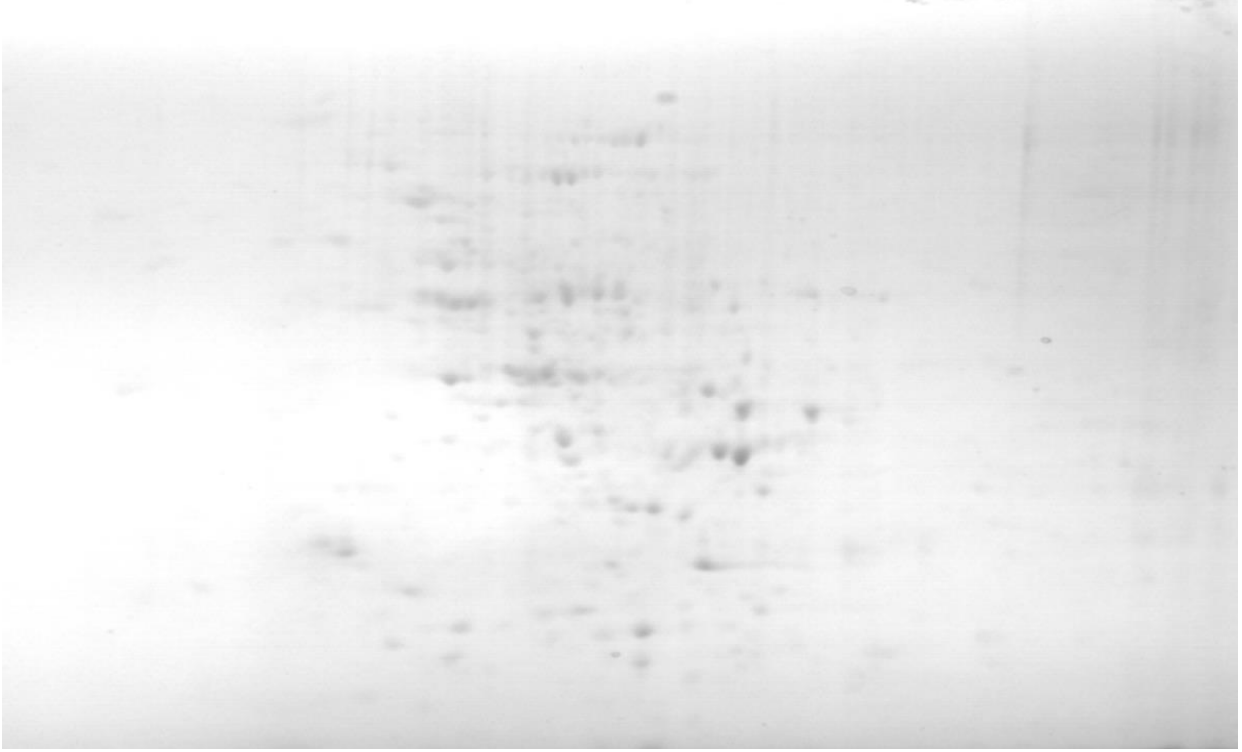
Konsantrasyonları belirlenen proteinler, pH 3-10 ve pH 4-7 arasında doğrusal olmayan immobilize pH gradient oluşturan jel stripleri üzerinde proteinlerin ayrıştırılması için, 12 saat 22°C' de; %2 (v/v) Triton X-100, 20 mM DTT ve the protein ekstraktını içeren tiyoüre/üre lizis tamponu ile aktif rehidrasyon işlemine maruz bırakılmıştır. IEF (İzoelektrik fokuslama) işlemi 22°C' de 15dk 250V, 30dk 500V, 1sa 1000V, 3sa 5000V, 3sa 10000V ve 7000VHr 10000V olarak Protean i12 IEF System (BioRad) cihazında gerçekleştirilmiştir. Fokuslaması biten jel stripleri SDS-PAGE yöntemi ile ayırtılmak için öncelikle 6 M üre, 30% (v/v) gliserol, 2.5% (w/v) SDS, 0.15 M bis-Tris, and 0.1 M HCl içeren ekülibrasyon tamponu ile, birincisinde DTT eklenerek 20dk inkübe edilmiştir. İlk ekülibrasyon tamponundan sonra ikinci bir ekülibrasyon tamponu kullanılıp DTT yerine %4 (w/v) iyodoasetamid konularak tekrar 20dk inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında her bir strip, bir %12 lik SDS-PAGE jelinin üstüne yerleştirilip eriyik %1 lik düşük erime noktalı agaroz ile yerine sabitlenmiştir. Jel, 0.025 M Trizma base, 0.25M glisin, %0.01(w/v) içeren pH 8,3'lük tampon içerisinde 10°C'de 35 V'ta 1 saat ve 110 V'ta 7 saat olmak üzere iki aşamada yürütülmüştür. Yürüme sonrası jeller colloidal comassi brilliant blue ile boyanmış ve olarak saklanabilmesi için öncelikle pH 6.3'lük 0.1M tris-fosfat tamponu ile ekülibre edilmiştir. Ekülibrasyonun ardından %25 lik metanol çözeltisi ile fazla boyadan arındırılıp %20 lik amonyum fosfat çözeltisi ile sabitlenmiştir. Jellerin fotoğrafları Versadoc (Biorad) Jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve jeller %5 lik Asetik asit çözeltisinde saklanmıştır. Gerçekleştirilen jel sonuçları Şekil 3-6 arasında görülebilir.



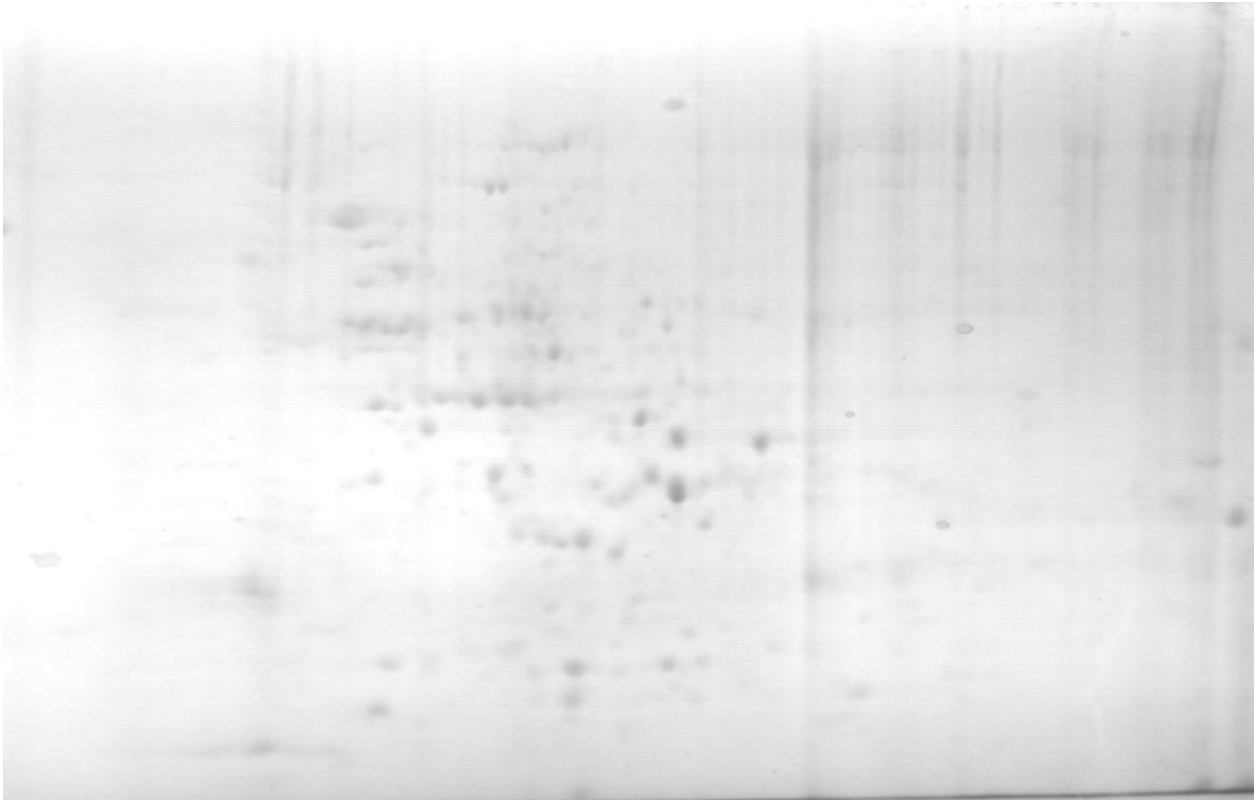
Şekil 3. *P.distans* yaprak kontrol örneği 2D-PAGE sonucu



Şekil 4. *P.distans* yaprak stres örneği 2D-PAGE sonucu



Şekil 5. *P. distans* kök kontrol örneği 2D-PAGE sonucu



Şekil 6. *P. distans* kök stres örneği 2D-PAGE sonucu

3.4. LC-MS/MS için Protein İzolasyonu

2D-PAGE yöntemi sonucu belirlenen spotlardan kesilerek saflaştırılan proteinlerin konsantrasyon değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Protein ekstraksiyon sonucu örnek başına elde edilen konsantrasyon değerleri

Örnek Kodu	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
CL*1	4.58
CL*2	4.53
CL*3	3.79
SL*1	4.54
SL*2	5.00
SL*3	4.32
CR*1	4.93
CR*2	4.41
CR*3	1.90
SR*1	4.04
SR*2	4.33
SR*3	4.63

* CL: Yaprak Kontrol, SL: Yaprak Stress, CR: Kök Kontrol, SR: Kök Stress

3.5. Protein Alkalizasyonu ve LC-MS/MS Ölçümleri

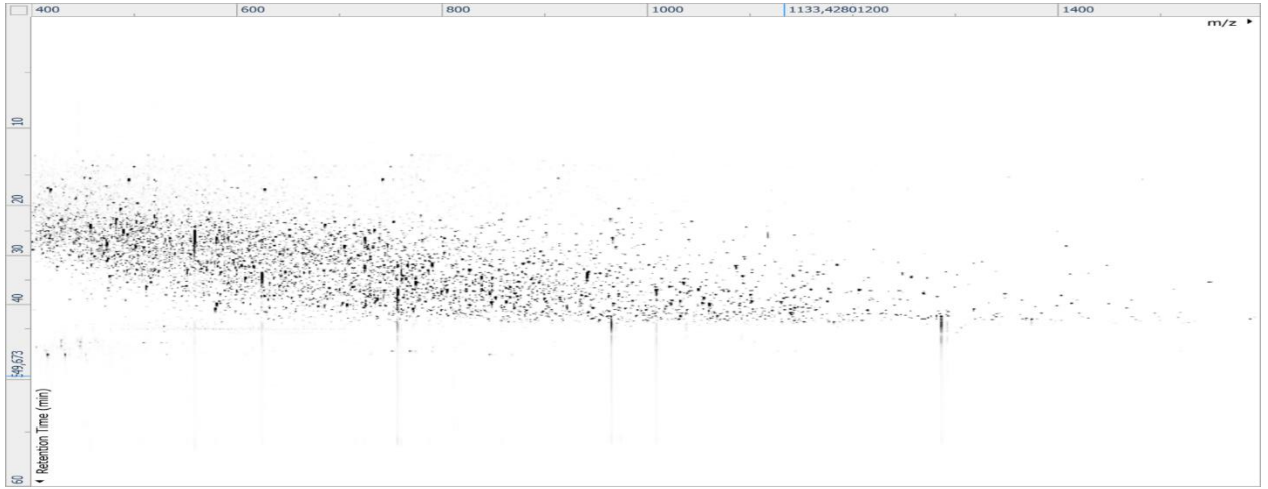
Örnekler Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap kütle spektrometre cihazına (Thermo Fischer Scientific) bağlı sıvı kromatografi sistemi ile analiz edilmiştir. Solvent kompozisyonları %100 su ve % 0.1 formik asit (solvent A) ve %20 su, %80 asetonitril ve %0.08 formik asit (solvent B) olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 10 μl %0.1'lik formik asit ile çözülmüştür. Peptitler kolona yüklenmiş ve 300nL/dk'lık akış hızı ile kolondan geçirilmiştir. Elüsyon gradienti solvent B için %4 'den %10'a 15 dk, %10'dan %35'e 20dk, %35'den %65'e 5dk , %65 'den %95'e 10 dk and %95'den %5'e 10 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Solvent A içinse %96'dan %90'a 15dk, %90'dan %65'e 20 dk, %65'den %30'e 5 dk, %35'den % 5'e 10 dk ve %5'den % 95'a 10 dk olacak

şekilde ayarlanmıştır. Tablo 4 LC cihazının çalışırken konsantrasyonun bir saat içerisindeki değişimlerini çözelti A ve B den alınan yüzdelerle göstermektedir.

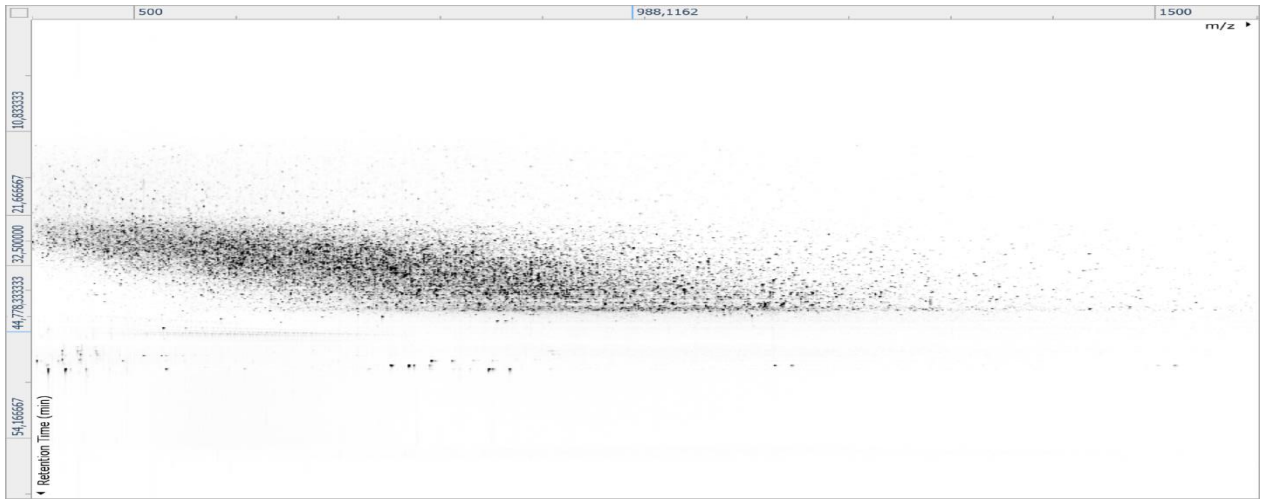
Tablo 4. LC-MC cihazının proteinleri hidrofobisitetlerine göre ayırmak için kullandığı kademeli konsantrasyon tablosu.

Alıkonma Zamanı (dk)	Debi (μ l/dk)	% Çözelti A	% Çözelti B
0	0.300	96.0	4.0
0	0.300	96.0	4.0
3	0.300	96.0	4.0
15	0.300	90.0	10.0
35	0.300	65.0	35.0
40	0.300	35.0	65.0
41	0.300	5.0	95.0
50	0.300	5.0	95.0
51	0.300	95.0	5.0
60	0,300	95.0	5.0

Full-scan MS spektraları (400'den 1600 m/z) 70,000 çözünürlük seviyesinde elde edilmiştir. Kütle spektrometre cihazı HCD fragmentasyonuna %25 normalize çarpışma (collision) enerji kullanılarak ve default yük değeri +2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunun yanı sıra; ölçüm esnasında 17,500 çözünürlük, otomatik-kazanma-kontrol (AGC) hedefi 1e6 iyon, maksimum iyon zamanı 64ms, izolasyon penceresi 3 m/z ve seçilen MS kütlelerinin dinamik hariç tutulma süresi 10 sn olarak belirlenmiştir. Tanımlama sınırının üzerinde konsantrasyona sahip bütün protein kütleleri fragmentasyon için seçilmiş ve kütle spektrometre tarafından tanımlanmıştır (Şekil 7-10). Cihaz bu aşamada aynı kütleye sahip proteinler seçmemek amacıyla 10 sn zaman aralığına ayarlanmıştır.



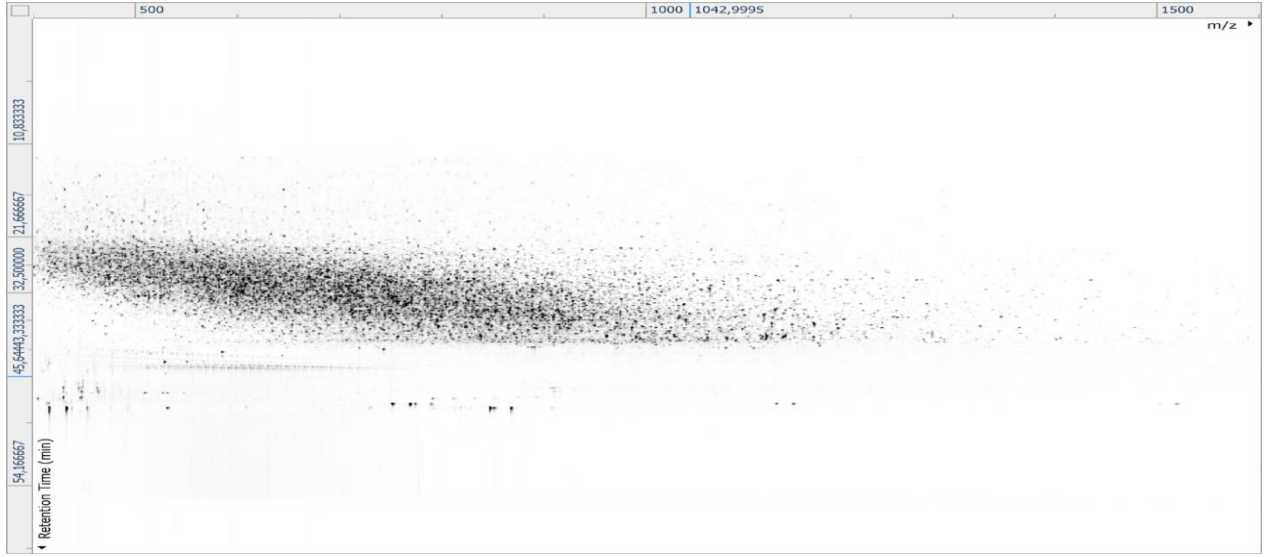
Şekil 7. *P. distans* yaprak örneği kontrol grubu LC-MS protein profili



Şekil 8. *P. distans* yaprak örneği stres grubu LC-MS protein profili



Şekil 9. *P. distans* kök örneği kontrol grubu LC-MS protein profili



Şekil 10. *P. distans* kök örneği stress grubu LC-MS protein profili

3.6. Kütle Spektrometre Verilerinin Analizi ve Peptitlerin Tanımlanması

Bu spektralar elimine edildiğinde Tablo 5'de verilen spektra sayıları ortaya çıkmıştır.

Tablo 5. QExactive cihazında ölçülen örneklerin kodları ve benzersiz spektralardan oluşan spektra sayıları verilmiştir.

Koleksiyon kodu	Spektra sayısı
CL1	16146
CL2	16184
CL3	15082
SL1	15359
SL2	15370
SL3	14925
CR1	14154
CR2	12801
CR3	12683
SR1	12581
SR2	12788
SR3	13889

CL: Kontrol-yaprak; SL: Boron stres uygulanmış yaprak; CR: Kontrol-kök; SR: Boron stres uygulanmış kök

Ancak yenilenen analizde bu spektraların yüklerinin veri tabanı algoritmaları tarafından belirlenmesine karar verilmiştir. Bu durumda toplam 93,066 spektra yaprak dokusu için ve 78,896 spektra kök dokusu için analiz edilmiştir.

Daha önce belirtildiği üzere, veri tabanı arama algoritmalarının bir diğer girdi verisi ise dizi veri tabanıdır. Proje başvurusunda literatürde mevcut EST kütüphaneleri ve çalışmaya özgü yapılacak RNA-Seq dizileri kullanılarak analiz yapılacağı belirtilmiştir. Gelişme raporu 3'te bu veri tabanları kullanılarak yapılan analizler, literatürdeki mevcut dizilerin sonuçlarda doğru-negatif veya hatalı-pozitif sayısını arttırdığından bu diziler yeni analizde veri tabanına dahil edilmemiştir. Proje kapsamında, literatüre göre EST kütüphanesi oluşturulmasından daha sağlıklı olan RNA-Seq dizileme yapılmıştır. Bor birikmesi en çok yapraklarda görüldüğü için yapraklardan izole edilen transkriptler için RNA-Seq dizileme işlemi yapılmıştır. Bu dizileme sonucu ortaya çıkan dizi-spesifik yani sadece 5'-3' yönü için yapılan okumalar (reads), Trinity programı ile birleştirilmiş (assembly) ve RNA-Seq veri tabanı elde edilmiştir. Tarafımızdan yaptırılan RNA-Seq dizileme verileri verileri dizi spesifik 5'-3' yönü için yapıldığından, tüm bu nükleotit dizileri ileri dizi (forward strand) 5'-3' yönünde 1, 2, 3 okuma çerçevelerine amino asit translasyonu ile *in silico* çevrilmiştir. Bunun dışında *Puccinellia distans* için tanımlanmış ve Uniprot veri tabanında bulunan tüm proteinler, *Puccinellia distans* ile aynı familyadan olan *O. sativa*'ya ve daha önce literatürde birçok boron stres çalışması bulunan *A. thaliana*'ya ait proteinlerde veri tabanına dahil edilmiştir. Veritabanlarının boyutları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kütle spektrometre verilerinin tanımlanması amacıyla kullanılan veri tabanları, megabyte cinsinden boyutları ve verilerin elde edildikleri kaynaklar verilmiştir.

Veritabanı	Boyutu (Megabyte: MB)	Veri kaynağı
FraryLab-RNASeq- 1-2-3 okuma çerçeve translasyonu	784	Frary Lab
<i>Arabidopsis thaliana</i> proteinleri	0.25	Uniprot veritabanından indirilmiştir.
<i>Oryza sativa</i> proteinleri	2.6	Uniprot veritabanından indirilmiştir.

Biyoinformatik analizleri yürüten, projede araştırmacı olarak görev yapan Dr. Jens Allmer tarafından yürütülen diğer çalışmalarda tespit edildiği üzere, veri tabanı arama algoritmalarının

sonuç üretme aşamasını etkileyen bazı fonksiyonel kısıtlamaları vardır. Bunlardan biri veri tabanının boyutu ve veri tabanında bulunan her bir dizinin boyutudur. Bu sorunu aşmak adına, Dr. Allmer'in laboratuvarında geliştirilen veri tabanı-eşitleyici (DBEqualizer) algoritması kullanılmıştır. DBEqualizer, veri tabanlarında büyük dizileri 1000 karakterden oluşan fragmetlere bölmüş ve dizilerin bölünmesi ile kaçırılacak peptitler için 100 karakter uzunluğunda 1000 karakterlik bir fragmentin son eki (suffix) ile diğer 1000 karakter uzunluğundaki fragmentin önek (prefix) kısımlarını içeren örtüşen (overlapping) fragmentler oluşturmuştur. Böylece tüm algoritmalar hatasız çalışma zamanı (runtime) hatası vermeden çalışabilecek hale gelmiştir. Bu algoritmanın çalışmaya diğer bir önemli katkısı ise veritabanlarını birleştirerek, küçük veri tabanları ile büyük boyutlu veri tabanlarının üreteceği sonuçlar arasındaki eşitsizliği ortadan kaldırmaktır. DBEqualizer algoritması ile eşit boyutlu, tüm veri tabanlarından dizileri karma şekilde içeren beş hedef (target) veri tabanı FASTA formatında üretilmiştir. Hatalı-pozitif peptit-spektrum eşleşmelerinin tespit edilmesi için bu 10 veri tabanının tuzak (decoy) versiyonları OpenMS programı kullanılarak hazırlanmıştır. Tuzak veri tabanları, hedef veri tabanlarında dizilerin ters çevrilerek (reverse) veya rastgele dağıtılarak (shuffling) oluşturulduğu, normalde doğru eşleşme beklenmeyen veri tabanlarıdır. Bu veri tabanlarındaki peptit-spektrum eşleşmelerinin aldıkları skorların hedef veri tabanlarındaki skordardan farklı olması beklenir. Böylece tuzak veri tabanındaki eşleşmelerin skorlarından daha iyi olan hedef veri tabanı peptit-spektrum eşleşmeleri doğru-pozitif (true-pozitif) kabul edilirken, geri kalanlar hatalı-pozitif (false-pozitif) olarak kabul edilir. Tuzak veri tabanı hedef veri tabanındaki dizilerin ters çevrilmesi ile oluşturulmuştur. Gelişme raporu 3'te gösterildiği üzere hedef veritabanı büyük olduğu için hem hedef hem tuzak veri tabanında aynı dizilerin veya tamamen aynı karakterlerden farklı sıralamaya sahip dizilerin varlığı söz konusu olabilir. Bunun yanı sıra aynı spektral profile sahip farklı peptit dizilerinin (izobarik peptitler) varlığı söz konusu olabilir. Bu nedenle DecoyPrat algoritması kullanılarak tuzak veri tabanı bu olası peptit dizilerden temizlenmiştir. Hedef veri tabanında bulunan hatalı-pozitif peptit-spektrum eşleşmelerin filtrasyonu için genellikle False-Discovery Rate adı verilen skor karşılaştırma ve filtreleme işlemi uygulanmaktadır. Bu çalışmada False-Discovery Rate hesabından önce, spektraların her bir algoritma için beş veri tabanındaki sonuçları için entegrasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlemde bir spektrum için her algoritmanın her bir veri tabanındaki en iyi 10 sonucu seçilmiştir. Böylece bir spektrum için her algoritmadan maksimum 50 sonuç toplanmıştır. Daha sonra her algoritmanın en optimize skora göre bu 50 sonuç sıralanmıştır ve en iyi 10 sonuç seçilmiştir. Bu sonuçlar arasında her peptit sadece 1 kez yer alacak şekilde ayarlanmıştır. Skora göre sıralanan sonuçların sıralamaları (rank) 1'den 10'a yeniden düzenlenmiştir. Aynı işlem her algoritmanın beş tuzak veri tabanı içinde

yapılmıştır. Tüm algoritmaların her spektrum için hedef ve tuzak veri tabanlarından elde edilen sonuçlarının konsensus sonucu için sıralama (rank) tabanlı konsensus hesaplama tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte bir spektrum için hedef veri tabanı için tüm algoritmalar tarafından sonuç olarak döndürülen peptitler benzersiz olacak şekilde bir araya getirilmiştir. Ve her bir peptidin algoritmalar tarafından bulunduğu sıralamalar toplanmıştır. Peptitin bir algoritma tarafından bulunması durumunda alacağı skor 1 ile 10 arasında değişirken, bulunmaması durumunda 100 ceza skoru (penalty) verilmiştir. Örneğin spektrum A için, peptit X; OMSSA tarafından 10. sıralamada, MSGF+ tarafından 1. sırada, X!Tandem tarafından bulunmamışsa, peptit X'in skoru $1+10+100 = 113$ olacaktır. Sıralama-tabanlı konsensus hesaplamasında en düşük skor en iyi skordur ve en düşük-en iyi skor üç olabilir: Bu durumda bir peptit üç algoritma tarafından da 1. sırada bulunmuştur. En yüksek skora sahip ve en az iki algoritma tarafından bulunan peptitler hesaplamaya dahil edilmiştir. Konsensus hedef ve tuzak veritabanı sonuçları her bir örnek koleksiyon verisi için hesaplanmıştır.

Konsensus PSM lerin hesaplanması sonrası hatalı-tahmin oranı (FDR) hesaplaması yapılmıştır. Xcorr adı verilen cross-correlation skoruna göre yapılan FDR hesaplaması sonrası bulunan doğru-pozitif peptit-spektrum eşleşmelerindeki peptitler çalışmada kullanılan veritabanlarında Dr. Allmer'in laboratuvarında geliştirilmiş Peppig (önceki ismi ile Lelantos) algoritması ile aratılmıştır. Böylece peptitlerin ait oldukları tüm veritabanı parçaları yani FASTA elementleri (protein veya okuma çerçeve translasyonları kastedilmiştir) tespit edilmiştir. Peppig Wu-Manber ismi kesin dizi eşleşme algoritmasının modifiye edilmiş implementasyonudur. Bu nedenle bulunan lokasyonların tamamı aslında triptik kesim esnasında peptit ortaya koyabilecek lokasyonlar olmayabilir. Bu nedenle, lokasyonlar enzimatik kesime uygun olup olmadığına göre kontrol edilmiş, uygun olmayan lokasyonlar filtrelenmiştir. Burada kriter peptitin ilk aminoasidinden önce gelen aminoasidin ya R ya K olması veya peptidin ilk amino asidinin tüm amino asit dizisinin ilk amino asidi olmasıdır. Peptidin son amino asidinin K ve R olması da bir diğer koşuldur. Bu çalışmada tespit edilen amino asit dizileri yani veritabanı parçaları yaprak ve kök olmak üzere 2 kategoride incelenmiştir. Söz konusu veritabanı parçası nükleotid veritabanlarından elde edilen translasyonlardan ise, bu nükleotid dizisinin en çok peptit alan okuma çerçeveleri listeye alınmıştır. Protein dizisi ise herhangi bir filtrasyon yapılmamıştır.

3.7. *P. distans* transkriptomunun RNA-seq ile analizi

P. distans'ın bor stresine verdiği yanıtların izlenmesi için bor uygulanmış ve uygulanmamış gövde örnekleri kullanılarak dört cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu kütüphaneler, Illumina deep-sequencing HiSeq™ 2000 kullanılarak sekanslanmıştır. Kontrol ve stres örneklerinin ham verileri

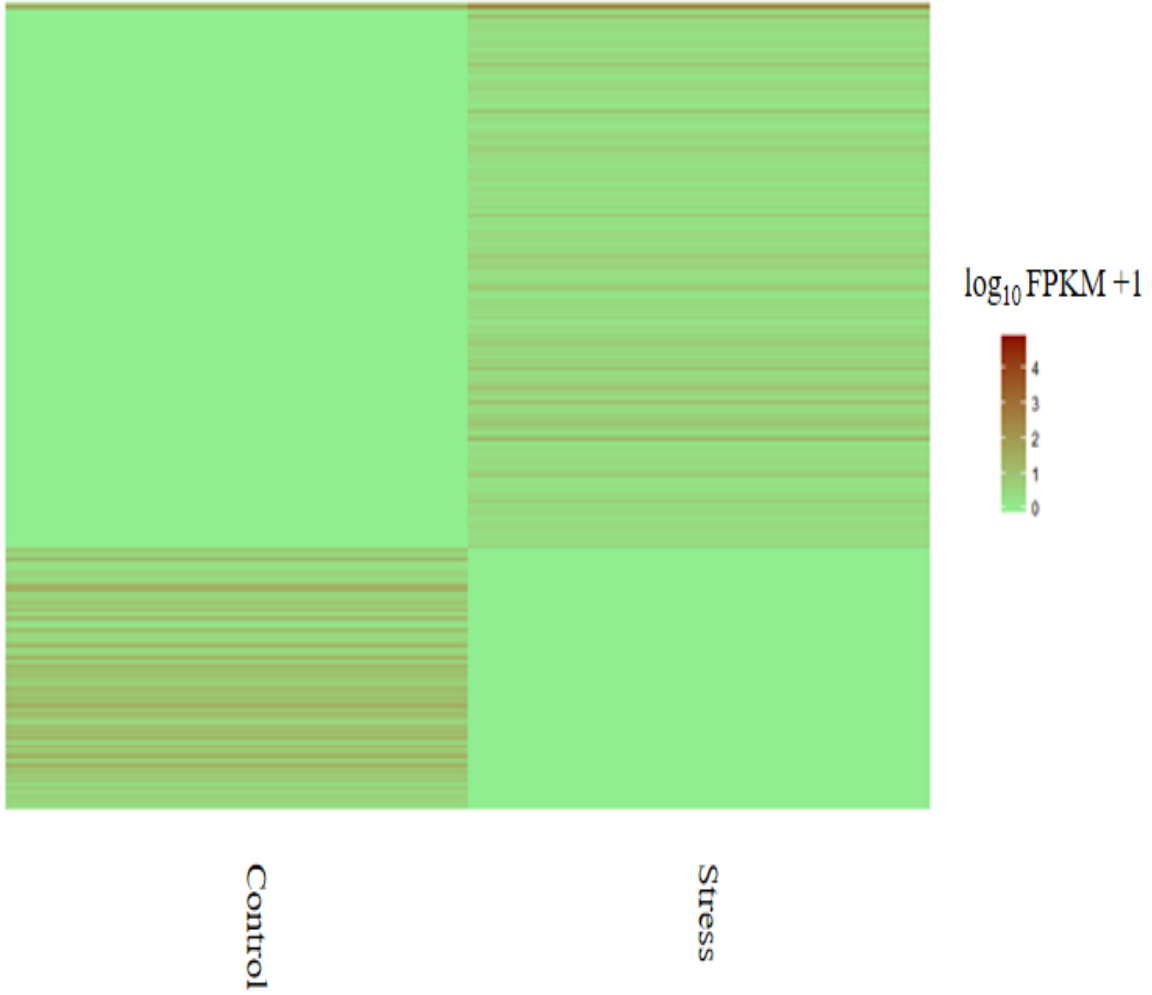
sırasıyla 90,514,028 ve 89,278,454'tür. Cutadapt2 kullanılarak temizlenen ham veriler sırasıyla kontrol ve stres olmak üzere 88,663,592 (% 98.0) ve 82,494,636 (% 92.4)'dir. Kontrol ve streten gelen çıktılar Trinity programı için veri olarak kullanılmış ve ardından, Bowtie2 programı kullanılarak tüm okumalar oluşturulan referans genoma haritalanmıştır. Kontrol ve stres örneklerinin haritalanma yüzdeleri sırasıyla % 97.8 ve % 97.3'tür. referans genoma haritalanmış transkriptler temel alınarak, 179,792,482 okumadan (kontrol + stres) 284,371,845 baz hizalaması yapılmıştır (Tablo 7). Median ve ortalama contig uzunlukları ise sırasıyla 317 ve ~497 nükleotid (Tablo 8). Ek olarak, contiglerin en az yarısının hizalandığı durumda (N50 değeri) en az 609 nükleotid bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 7. *P. distans* transkript/genlerinin istatistik özetleri

Parameter	
Number of Reads (Control + Stress)	179,792,482
Average Raw Read Length (Control + Stress)	125 nt
Average Contig Length	496.73 nt
Median Contig Length	317 nt
N50	609 nt
Total Assembly Size	284,371,845 nt

3.8. Kontrol ve stres durumlarında farklı gen ifadeleri

RNA-seq hizalama ve Cufflinks süreci sonrası farklı ifadesi yapılan genler belirlenmiştir. Cuffdiff ise okumaların FPKM (fragments per kb per million mapped reads) değerlerini belirler. Bu FPKM değerleri ise stres durumunda ifadesi artan ve azalan transkriptlerin belirlenmesinde kullanıldı (Şekil 11). Toplamda 3312 transkript farklı ifade edilmiş şekilde bulunmuş ve bunların 2242 tanesi (%67.7) artan, 1070 tanesi (%32.3) ise azalan ifade düzeyine sahip olarak bulunmuştur.



Şekil 11. Farklı ifade edilen 3312 transkriptin log hesaplaması yapılmış FPKM değerlerinin heat map şekli. FPKM değerleri 0 (yeşil)'dan 5 (kırmızı)'e değişiklik göstermektedir.

3.9. Farklı ifadesi yapılan transkriptlerin anotasyonu

P. distans'ın protein ve anotasyonları umumi veri depolarında kısıtlıdır. Bu nedenle *A. thaliana* ve *O. sativa* protein verileri *P. distans* anotasyonları için kullanılmıştır. Ayrıca genetik açıdan *O. sativa* ve *P. distans* aynı aileye, Gramineae, mensuplardır (Wang vd. 2007). Farklı ifadesi yapılan 3312 transkriptin % 49.9'u (1652'si) 1107 proteine haritalanmıştır. Anotasyonu yapılan transkriptler içinde 21 farklı taşıyıcı proteine haritalanan 28 transkript bulunmuştur. Farklı ifadesi yapılan transkriptlerin listesi Tablo 8'de gösterilmiştir. Çeltik ve Arabidopsis'e anotasyonları yapılamayan transkriptler yeşil bitki veri tabanına tekrar anote edilmişlerdir (Viridiplantae). Ancak hizalama uzunlukları ve E-değeri temel alındığında aday protein belirlenememiştir.

Tablo 8. FPKM değerlerine göre en çok değişim gösteren farklı ifade edilmiş transkriptlerin listesidir. Anote edilmiş Uniprot ID'leri, organizma çeşidi [*A. thaliana* (At) ve *O. sativa* (Os)], transkript ismi ve FPKM farkları gösterilmiştir.

UniProtID/ Anotasyonu	Organizma	Transkript İsmi	Fark*
F4I600_ARATH/ V-ATPase-related	At	TRINITY_DN213899_c1_g5_i1:0-169	20561.12
H32_ARATH/ Histone	At	TRINITY_DN99923_c0_g1_i1:0-171	845.90
RRAA2_ARATH/ 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 2	At	TRINITY_DN220021_c1_g4_i1:0-584	426.28
PSBR_ARATH/Photosystem II 10 kDa chloroplastic	At	TRINITY_DN192927_c1_g1_i1:132-532	329.61
RD22_ARATH/ BURP domain RD22	At	TRINITY_DN131860_c0_g2_i1:0-222	315.95
RRAA3_ARATH/ 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 3	At	TRINITY_DN220021_c1_g4_i2:0-391	299.33
RRAA3_ARATH/ 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 3	At	TRINITY_DN214561_c1_g18_i1:0-365	253.61
H2B10_ARATH/ Histone	At	TRINITY_DN199272_c0_g3_i1:2-246	168.98
H2B1_ARATH/ Histone	At	TRINITY_DN150574_c0_g1_i1:0-201	130.08
A0A160DR54_ORYSA/ Dirigent (Fragment)	Os	TRINITY_DN215985_c1_g3_i1:4-592	126.38
RL40B_ARATH/ Ubiquitin-60S ribosomal L40-2	At	TRINITY_DN67858_c0_g1_i1:0-219	85.64
H2A1_ARATH/ Probable histone	At	TRINITY_DN28983_c0_g1_i1:38-250	80.83
FRO7_ARATH/ Ferric reduction oxidase chloroplastic	At	TRINITY_DN224067_c1_g1_i1:0-1399	79.87
H32_ARATH/ Histone	At	TRINITY_DN271392_c0_g1_i1:0-479	66.13

H2B3_ARATH/ Histone	At	TRINITY_DN199272_c0_g1_i1:0-245	65.63
H2A1_ARATH/ Probable histone	At	TRINITY_DN113560_c0_g1_i1:0-238	63.07
XTH22_ARATH/ Xyloglucan endotransglucosylase hydrolase 22	At	TRINITY_DN221642_c3_g12_i1:2-232	57.72
H32_ARATH/ Histone	At	TRINITY_DN48466_c0_g1_i1:30-384	51.59
Q01KB9_ORYSA/ Autophagy-related	Os	TRINITY_DN202627_c0_g7_i1:92-353	45.84
ACT3_ARATH/ Actin-3	At	TRINITY_DN272586_c0_g1_i1:1-261	39.90
SYHM_ARATH/ Histidine-tRNA chloroplastic mitochondrial	At	TRINITY_DN179460_c0_g1_i1:0-227	39.49
COX3_ARATH/ Cytochrome c oxidase subunit 3	At	TRINITY_DN264216_c0_g1_i1:1-257	38.02
H4_ARATH/ Histone H4	At	TRINITY_DN8209_c0_g1_i1:0-419	31.53
Q949A7_ORYSA/ aquaporin (Fragment)	Os	TRINITY_DN210823_c0_g3_i1:4-269	30.12
H2A1_ARATH/ Probable histone	At	TRINITY_DN202443_c4_g5_i3:0-460	29.44
FRS5_ARATH/ FAR1-RELATED SEQUENCE 5	At	TRINITY_DN114402_c0_g1_i1:9-274	29.40
H2A1_ARATH/ Probable histone	At	TRINITY_DN202443_c4_g4_i2:0-314	25.88
H2A1_ARATH/ Probable histone	At	TRINITY_DN202443_c4_g4_i3:0-340	25.53
Q9LK47_ARATH/ AT3g23700 MYM9_3	At	TRINITY_DN219995_c1_g16_i1:0-256	25.08
A0A0K0WRF9_ORYSA/ NBS-LRR type R	Os	TRINITY_DN226626_c0_g8_i1:3-253	24.76

H2A1_ARATH/ Probable histone	At	TRINITY_DN202443_c4_g1_i1:0-255	24.25
NEN3_ARATH/ NEN3	At	TRINITY_DN226592_c4_g15_i1:8-257	21.50
RL341_ARATH/ 60S ribosomal L34-1	At	TRINITY_DN295721_c0_g1_i1:0-414	20.41
F4HS76_ARATH/ Glycerol kinase	At	TRINITY_DN140573_c0_g2_i1:0-250	20.29
RL142_ARATH/ 60S ribosomal L14-2	At	TRINITY_DN179003_c1_g2_i1:7-283	20.12
RL74_ARATH/ 60S ribosomal L7-4	At	TRINITY_DN294520_c0_g1_i1:0-828	20.02
F4IJE1_ARATH/ Phox domain-containing	At	TRINITY_DN278982_c0_g1_i1:1-268	19.68
COX2_ARATH/ Cytochrome c oxidase subunit 2	At	TRINITY_DN284184_c0_g1_i1:0-703	19.48
Y1457_ARATH/ Acyltransferase chloroplastic	At	TRINITY_DN222292_c3_g2_i1:0-281	18.69
Q9LTW8_ARATH/ CTP synthase	At	TRINITY_DN1712_c0_g1_i1:0-285	18.65
A0A0U2JFK9_ORYSA/ NBS-LRR-like resistance	Os	TRINITY_DN213110_c2_g2_i4:22-323	16.98
UBQ3_ARATH/ Polyubiquitin 3	At	TRINITY_DN186267_c2_g1_i1:18-638	16.88
ACT11_ARATH/ Actin-11	At	TRINITY_DN204305_c3_g6_i2:0-375	16.85
A8MRY7_ARATH/ WD-40 PCN	At	TRINITY_DN224769_c1_g7_i1:4-287	15.55
Q9STF8_ARATH/ PR-6ase inhibitor family	At	TRINITY_DN127914_c0_g2_i1:0-296	15.37
*Fark: Stres ve kontrol şartlarındaki farklılık; FPKM (Fragments per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped)			

Gen ontolojisini temel alan Blast2GO ve QuickGO programları kullanılarak fonksiyonel anotasyon yapılmıştır. Anotasyonu yapılan 1107 protein gen ontolojilerine göre analiz edildiğinde hücresel

ögeler, moleküler fonksiyon ve biyolojik süreç olarak üç farklı grupta incelenmiştir. Ontoloji analizi sonucunda 906 protein (% 81.8) hücresel ögeye, 885 protein (% 80.0) protein moleküler fonksiyona ve 848 protein (% 76.6) protein biyolojik prosese anotasyon yapılmıştır.

3.9.1. Hücresel ögeler

Hücresel ögelere anotasyonu yapılan 906 protein, en az bir hücresel ögeye eşleşen bulunması koşuluna göre seçilmiştir. Aşırı miktardaki borun toksisitesinden kurtulmak için hücre zarından alınımı sonrası vakuol ve hücre duvarı gibi organeller etkileneceği için sadece bunlarla ilgili gen ontoloji terimleri dikkate alınmıştır (Hanaoka vd. 2014). Bu terimlerin içerisinde % 14.8 ile membran oluşturan bileşenler, plazma membran, vakuol membran, mitokondri iç membran ve endoplazma membran oluşturur. Ayrıca, hücre zarıyla ilintili % 1.4, apoplast ile ilintili % 0.8 ve vakuol ile ilintili % 1.5 protein bulunmuştur.

3.9.2. Biyolojik işlevler

Biyolojik süreç anotasyonları yedi gruba ayrılmıştır. Sırasıyla bunlar: uyarana cevap, hücresel süreç, metabolik süreç, lokalizasyon, üreme süreçleri, gelişimsel süreçler ve sinyalleşmedir. Hormonal uyarılara ve tuz, iyon, soğuk, sıcak, oksidatif stres ve susuzluk gibi stres faktörlerine bağlı proteinler de tanımlanmıştır. Sonuçlara göre, sadece translayon ve transkripsiyonla ilişkili proteinler değil, aynı zamanda protein katlanması ve yıkımı, hücre duvarı organizasyonu ve biyogenezini ile iyonla ilgili redoks dengesi proteinlerinin bor stresi koşullarında yeniden düzenlendiği bulunmuştur. Stres koşullarında hem malat yolağı gibi anabolik olaylar hem de protein ve lignin yolakları gibi katabolik olayların değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, hormon- ve şeker-aracılı sinyal mekanizmalarının da farklı ifade edildiği bulunmuştur.

3.9.3. Moleküler fonksiyonlar

Moleküler fonksiyon anotasyonları üç kategoriye ayrılmıştır. Bunlar: taşıyıcı aktivitesi, katalitik aktivite ve bağlanma aktivitesidir (Tablo 9). En bol bulunan moleküler fonksiyon kategorisi ise % 39 ile bağlanma aktivitesi ve % 67 ile katalitik aktivitedir. Bağlanma aktivitesini bakır, çinko, kalsiyum, mangan, kobalt ve demir bağlama durumlarını içerir ve bunlar bor stres koşullarında hücre içi sinyalleşme ve vesikül trafiğini düzenler. Bor stresi koşullarında serin/threonine kinaz, GTPase, ATPase, H⁺ taşınımından sorumlu ATP sentaz ve oksidoredüktaz gibi katalitik aktivite enzimleri düzenlenir. Proton, glikoz, malat, inorganic fosfat, L- askorbik asit, L- glutamate, oksin ve iyon taşıyıcıları gibi proteinler farklı ifade edilmişlerdir. Kalsiyum, sülfat ve mangan gibi minerallerin taşıyıcı proteinleri de bu kategoride tanımlanmışlardır. Ayrıca, daha önceden bor taşıyıcısı oldukları belirlenmiş üç protein de saptanmıştır. Bunlar: *A. thaliana* BOR6 putative bor

taşıyıcı protein (Transcript Name: TRINITY_DN188130_c0_g1_i1:0-1084), *A. thaliana* TIP1-3 protein (Transcript Name: TRINITY_DN222891_c3_g1_i1:0-216), ve *O. sativa* NIP protein (Transcript Name: TRINITY_DN210823_c0_g3_i1:4-269).

Tablo 9. *P. distans*'ta bor biriktirme özelliğiyle ilintili olabilecek moleküler fonksiyon kategorileri ile onların alt grupları

Moleküler İşlev GOTerm	Proteinlerin % oranları
Binding	39.00 %
ATP binding	9.90 %
Metal ion binding	4.60 %
RNA binding	3.80 %
DNA binding	3.70 %
Zinc ion binding	3.20 %
GTP binding	1.60 %
Translation initiation factor activity	1.60 %
Nucleic acid binding	1.50 %
Copper ion binding	1.40 %
Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	1.10 %
ADP binding	1.00 %
Heme binding	1.00 %
Calcium ion binding	0.60 %
Iron ion binding	0.50 %
Magnesium ion binding	0.30 %
HSP90 protein binding	0.20 %
4 iron, 4 sulfur cluster binding	0.20 %
Cobalt ion binding	0.10 %
Manganese ion binding	0.10 %

2 iron, 2 sulfur cluster binding	0.10 %
Four-way junction DNA binding	0.10 %
Calmodulin binding	0.10 %
Quinone binding	0.10 %
Iron-sulfur cluster binding	0.10 %
Catalytic activity	67.00 %
Structural constituent of ribosome	4.90 %
Protein serine/threonine kinase activity	1.30 %
Protein kinase activity	1.00 %
GTPase activity	0.90 %
ATP-dependent RNA helicase activity	0.80 %
ATPase activity	0.80 %
NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	0.60 %
Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	0.60 %
Structural molecule activity	0.60 %
Oxidoreductase activity	0.60 %
Kinase activity	0.50 %
Signal transducer activity	0.30 %
Peroxidase activity	0.30 %
Metalloendopeptidase activity	0.30 %
Cytochrome-c oxidase activity	0.30 %
Fumarate hydratase activity	0.20 %
Metalloaminopeptidase activity	0.10 %
Calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	0.10 %
Glutathione transferase activity	0.10 %

Peroxiredoxin activity	0.10 %
Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, with a flavin as acceptor	0.10 %
Glutathione peroxidase activity	0.10 %
Calcium-transporting ATPase activity	0.10 %
Electron transporter, transferring electrons from COQH2-cytochrome c reductase complex and cytochrome c oxidase complex activity	0.10 %
L-lactate dehydrogenase activity	0.10 %
L-malate dehydrogenase activity	0.10 %
Metallopeptidase activity	0.10 %
Ferric-chelate reductase activity	0.10 %
Substrate-specific transmembrane transporter activity	0.10 %
Oxaloacetate decarboxylase activity	0.10 %
Manganese-transporting ATPase activity	0.10 %
Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	0.10 %
Malate dehydrogenase (decarboxylating) (NADP+) activity	0.10 %
Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	0.10 %
Oxalate decarboxylase activity	0.10 %
Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water	0.10 %
L-ascorbate peroxidase activity	0.10 %
Cytochrome-c peroxidase activity	0.10 %
Glutamate decarboxylase activity	0.10 %
Myo-inositol	0.10 %
Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	0.10 %

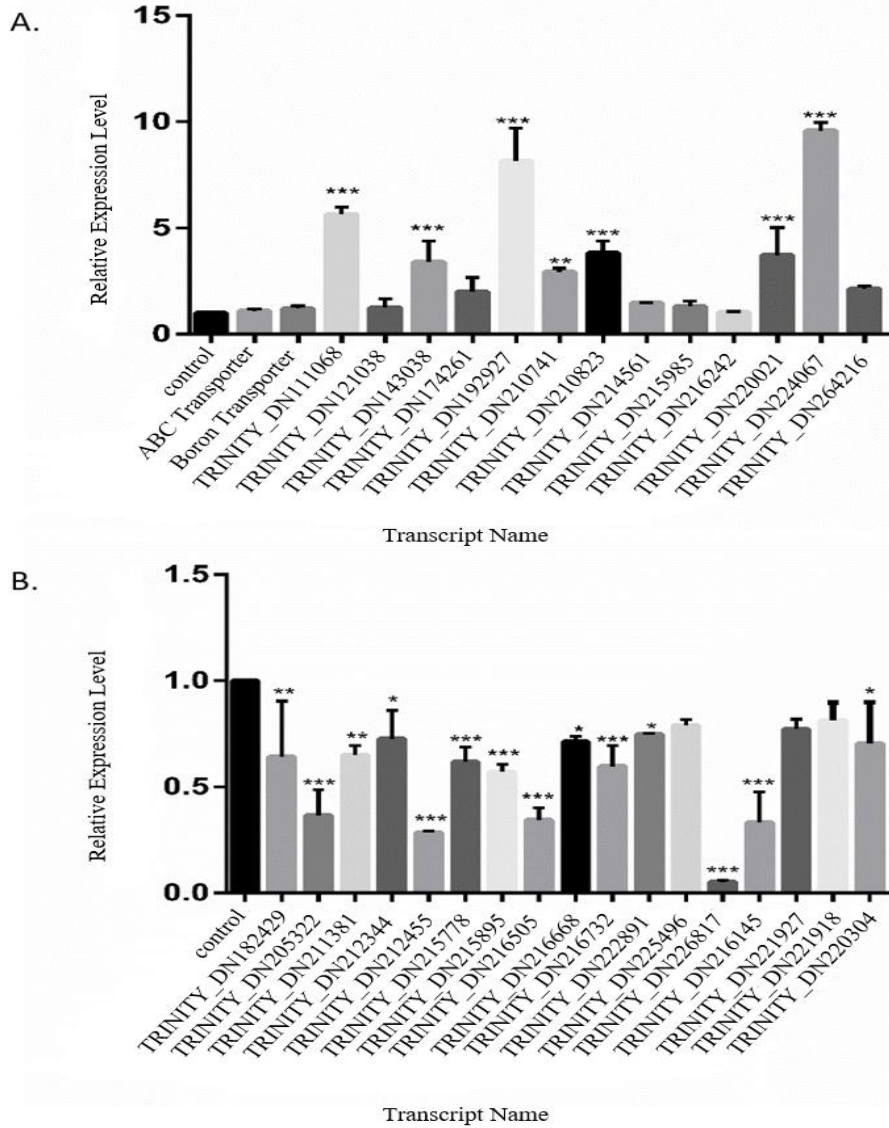
Nuclear export signal receptor activity	0.10 %
Oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, heme protein as acceptor	0.10 %
Aspartate-tRNA ligase activity	0.10 %
Malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity	0.10 %
Oxidoreductase activity, oxidizing metal ions	0.10 %
Protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	0.10 %
Transporter activity	9.00 %
Transporter activity	0.40 %
Glucose transmembrane transporter activity	0.20 %
Sugar:proton symporter activity	0.20 %
Inorganic phosphate transmembrane transporter activity	0.20 %
Malate transmembrane transporter activity	0.10 %
L-ascorbic acid transporter activity	0.10 %
Secondary active sulfate transmembrane transporter activity	0.10 %
Antiporter activity	0.10 %
Voltage-gated ion channel activity	0.10 %
Anion:anion antiporter activity	0.10 %
Auxin efflux transmembrane transporter activity	0.10 %
Outward rectifier potassium channel activity	0.10 %
Ion transmembrane transporter activity	0.10 %
Ion channel activity	0.10 %
Channel regulator activity	0.10 %
Inorganic anion exchanger activity	0.10 %
Anion transmembrane transporter activity	0.10 %
Inward rectifier potassium channel activity	0.10 %

L-glutamate transmembrane transporter activity	0.10 %
Zinc ion transmembrane transporter activity	0.10 %
Porin activity	0.10 %

Anotasyonu tamamlanan proteinler KEGG sistemine yüklenmiş ve metabolik yolak analizleri yapılmıştır (Kanehisa 2002). Toplamda 756 proteinin KEGG veri tabanında ilişkili oldukları bulunmuştur. Bu veri tabanına göre, 327 (43.2%) protein genel metabolizma kategorisinde bulunmuştur. Metabolizma-ilişkili proteinlerin de 66 tanesi karbon metabolizmasıyla, 64 tanesi enerji metabolizmasıyla, 50 tanesi amino asit metabolizmasıyla, 31 tanesi nükleik asit metabolizmasıyla, 24 tanesi lipid metabolizmasıyla ve 7 tanesi de sekonder metabolizma bileşenleriyle ilintilidir. Kalan 34 protein ise metabolizma ili ilintili diğer alt kategoriler içerisinde. Genetik bilgi kategorisinde ise 387 protein (% 51.2) bulunmuştur. Bunlar da çoğunlukla translasyon alt-kategorisinde (184) toplanmıştır. Protein katlanma kategorisi ise 98 protein ile ikinci büyük sırayı almaktadır. Çevresel bilgi prosesinde 152 protein bulunmaktadır (% 20.1) ve bunların 148 tanesi sinyal taşınımına ve dört tanesi de membran taşınımına aittir. Son olarak, 152 protein de hücrel süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Bu gruptan en çok hit veren 2 alt grubun biri 86 proteinle hücrel büyüme ve ölüm ile 42 proteinle taşıma ve katabolizmadır.

3.10. Anotasyonu yapılan transkriptlerin gerçek zamanlı kantitatif PCR

Gerçek zamanlı kantitatif PCR kullanılarak seçilen 32 transkriptin ifade düzeyleri incelenmiştir. Kontrol ve stres örneklerindeki ifade farklılıkları göz önüne alınarak transkriptler rastgele seçilmişlerdir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR işlemi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak yapılmıştır. İfadeleri artan ve azalan transkriptler Şekil 4.12'de gösterilmiştir. İfadesi en çok artış gösteren beş transkript şu şekilde anotasyon olmuştur: *O. sativa* aquaporin protein (DN210823); *Arabidopsis*'te photosystem II proteini (DN192927); *A. thaliana*'da 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase (DN220021); *A. thaliana*'da ferric reduction oksidaz (DN224067); ve FRIGIDA (DN111068)(Şekil 12). Kayda değer azalma görülen dört transkriptin üçü *O. sativa*'da oksidoredüktaz olarak (DN212455, DN205322, DN216505) ve biri de *A. thaliana* aquaporin protein olarak anotasyon olmuştur (Şekil 12).



Şekil 12. *P. distans*'ın seçilen 32 transkriptinin gerçek zamanlı kantitatif PCR sonuçları (A) 15 transkriptin ifadesinin artmış olduğu ve 17 transkriptin ifadesinin azalmış olduğu (B) doğrulanmıştır. Kontrol olarak aktin kullanılırken, hata çubukları ise üç teknik replikanın standart sapmalarına göre belirlenmiştir. *** $p \leq 0.001$ olan anlamlı değişimi, ** $p \leq 0.01$ olan anlamlı değişimi ve * $p \leq 0.05$ olan anlamlı değişimi gösterir.

3.11. Protein Tanımlanması ve Kantitatif Analizler

Toplamda yaprak dokusuna ait MS/MS ölçümleri için 55,755 PSM hedef veritabanında ve 29,553 PSM tuzak veritabanında bulunmuştur. Kök dokusu içinse toplamda 47,615 PSM hedef veritabanında, 24,830 PSM tuzak veritabanında bulunmuştur. Daha sonrasında hatalı-tahmin oranı (FDR) hesaplaması yapılmıştır. Xcorr adı verilen cross-correlation skoruna göre yapılan

FDR hesaplaması sonrası, toplamda 40,600 konsensus PSM yaprak dokusu ve 34,670 konsensus PSM kök dokusu için bulunmuştur. Her iki dokuya ait PSMlerin birleştirilmesi sonucunda toplamda 33,914 peptit bulunmuştur. Sonuçlara göre 33,914 peptitin 18,547 tanesinin sadece de novo dizileme sonucu bulunan peptitlere ait olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan 739 peptit hem dizi veri tabanları hem de de novo dizileme sonuçlarında ortak görülmüştür.

Protein anotasyonlarında belirsizliği (ambiguity) aza indirmek için, anotasyonu yapılmış proteinler ve herhangi bilinen bir proteinle homolojisi bulunmamış transkript translyasyonlarının en az bir spesifik (distinct) peptite eşleşmiş olması baz alınmıştır. Ve bu kurala uyan proteinler log2 kat değişimi ve t-test için değerlendirilmeye alınmıştır. Buna göre kök dokusu örneklerinde 1431 diziden 971 tanesi log2 tabanında en az +/- 0.5 kat değişim göstermiştir. Bu dizilerin 26 tanesi herhangi bilinen bir proteinle homoloji göstermemiştir. Ayrıca 971 diziden 26 proteinin ekspresyon farklılığı istatistiksel olarak anlamlıdır (p-değeri ≤ 0.05). Yaprak dokusu örnekleri için toplam 1522 dizi tespit edilmiştir. Bu dizilerden 1113 tanesi log2 ye göre ekspresyonda en az +/- 0.5 kat değişim göstermiştir. 1113 diziden 17 tanesi herhangi bilinen bir proteine eşleşmemiştir. 1113 dizinin 45 tanesine ait ekspresyon değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *De novo* dizileme ve veri tabanı arama algoritmaları ile tanımlanıp herhangi bir proteine/transkript translyasyonuna Peppig algoritması ile kesin (birebir) eşleşmeyen peptitler için BLAST algoritması çalıştırılmış ve 109 protein tanımlanmıştır.

Kök ve yaprak dokularında ekspresyon seviyesi değişim gösteren proteinlere/transkript translyasyonlarına bakıldığında hem kök hem yaprak dokusunda ekspresyonu değişen 599 protein tespit edilmiştir. Bunların 208 tanesi hem kök hem yaprakta azalan ekspresyon gösterirken 100 tanesi artan ekspresyon göstermiştir. 105 protein kökte azalan yaprakta ise artan regülasyon göstermiş, 186 protein ise kökte artan ve yaprakta azalan ekspresyon göstermiştir. Bu proteinler arasından hem kök hem yaprakta görülen proteinler için p-değeri en az bir dokuda anlamlı olanlar Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Hem kök hem yaprak dokusunda log2 tabanına göre ekspresyonu değişen proteinler için en az bir dokudaki ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı (p-değeri ≤ 0.05) olan proteinler verilmiştir.

Protein	p-Değeri Yaprak	p-Değeri Kök	TIC Kök	TIC Yaprak	Regülasyon
---------	-----------------	--------------	---------	------------	------------

gn BL_ORD_ID 232sp Q9ZUT8 AB33G_ARATH ABC transporter G family member 33	0.03		-0.79	-1.10	Azalan
gn BL_ORD_ID 324sp Q94BT9 ATOX1_ARATH Copper transport protein ATX1		0.04	-1.61	-1.10	Azalan
sp O80929 RL361_ARATH H60S ribosomal protein L36-1		0.04	3.77	-1.25	Kök Artan Yaprak Azalan
sp P12411 TBB1_ARATH Tubulin beta-1 chain	0.01		2.12	-10.20	Kök Artan Yaprak Azalan
sp P42742 PSB1_ARATH HProteasome subunit beta type-1	0.01		1.43	2.75	Artan
sp P46643 AAT1_ARATH Aspartate aminotransferase, mitochondrial	0.05		0.98	8.11	Artan
sp P47999 CYSKP_ARATH THCysteine synthase, chloroplastic/chromoplasti c	0.04		-2.98	-1.38	Azalan
sp P60039 RL73_ARATH 60S ribosomal protein L7-3		0.03	1.07	-1.01	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q08770 RL102_ARATH H60S ribosomal protein L10-2	0.05		0.84	-1.58	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q39173 P2_ARATHN ADP-dependent alkenal double bond reductase P2	0.01		-0.57	-9.73	Azalan
sp Q41951 TIP21_ARATH HAquaporin TIP2-1		0.01	0.70	-0.57	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q41963 TIP12_ARATH HAquaporin TIP1-2	0.05		0.71	-1.20	Kök Artan Yaprak Azalan

sp Q8VYF1 RL152_ARA TH60S ribosomal protein L15-2		0.01	1.71	-1.28	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q8W4E2 VATB3_ARA THV-type proton ATPase subunit B3	0.04		-0.63	-1.36	Azalan
sp Q93ZX7 GAUT4_ARA THProbable galacturonosyltransferase 4		0.01	-0.56	-3.29	Azalan
sp Q96300 14337_ARAT H14-3-3-like protein GF14 nu	0.01		0.52	-1.01	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q96533 ADHX_ARAT HAlcohol dehydrogenase class-3	0.02		-8.19	-1.44	Azalan
sp Q9C6P3 CDPKX_ARA THCalcium-dependent protein kinase 33		0.04	0.89	-1.48	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q9FGK5 RAA5A_ARA THRas-related protein RABA5a		0.05	-1.41	-1.02	Azalan
sp Q9FJA6 RS33_ARAT H40S ribosomal protein S3-3	0.04		1.57	-1.37	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q9LVI9 DPYD_ARAT HDihydropyrimidine dehydrogenase (NADP(+)), chloroplastic SV=1	0.03		-0.90	-2.26	Azalan
sp Q9SCV3 BGAL9_ARA THBeta-galactosidase 9	0.02		0.54	-7.05	Kök Artan Yaprak Azalan
sp Q9STX2 VEP1_ARAT H3-oxo-Delta(4,5)-steroid 5-beta-reductase	0.01		-1.14	-3.18	Azalan
sp Q9SV20 COPB2_ARA THCoatomer subunit beta-2	0.02		-0.52	-1.40	Azalan

sp Q9SYT0 ANXD1_ARATHAnnexin D1		0.03	-0.95	-0.88	Azalan
sp Q9SZJ5 GLYM1_ARATHSerine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial	0.05		-0.80	0.72	Kök Azalan Yaprak Artan
sp Q9ZUB3 SPD1_ARATHSpermidine synthase 1		0.05	-0.76	-1.10	Azalan
tr A0A0B4U151 A0A0B4U151_ORYSA6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (Fragment)		0.02	-0.77	-0.59	Azalan
tr B3H6F9 B3H6F9_ARATHCalcium-independent ABA-activated protein kinase		0.01	5.83	4.51	Artan
tr F4J5T2 F4J5T2_ARATHDihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	0.04		-0.55	-7.05	Azalan
tr O04000 O04000_ORYSAPathogenesis-related protein class 1	0.04	0.04	-0.63	-0.98	Azalan
tr Q01HK2 Q01HK2_ORYSAH0303A11-B0406H05.4 protein		0.04	-1.08	0.55	Kök Azalan Yaprak Artan
tr Q39141 Q39141_ARATHChlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	0.02		6.71	-0.68	Kök Artan Yaprak Azalan
tr Q7FP72 Q7FP72_ORYSAAPR1a protein		0.00	-0.63	0.75	Kök Azalan Yaprak Artan
tr Q9CA24 Q9CA24_ARATHPathogenesis-related thaumatin superfamily protein	0.04		-0.73	-2.20	Azalan

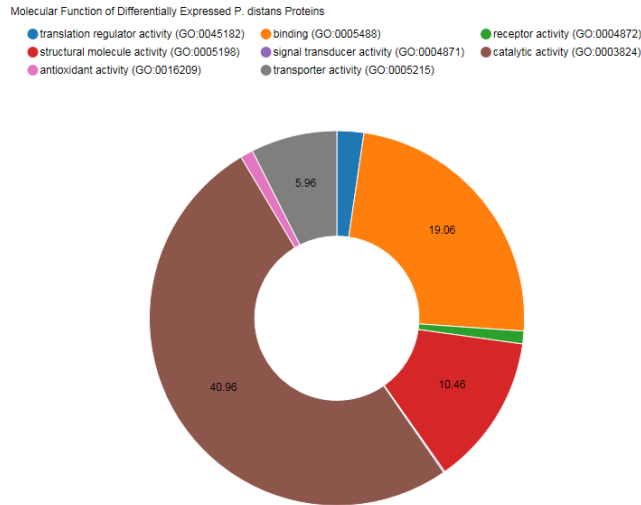
tr Q9SCP7 Q9SCP7_AR ATHAT3g53140/T4D2_7 0	0.02		0.61	-10.78	Kök Artan Yaprak Azalan
tr Q9ZV34 Q9ZV34_ARA THAt2g28790		0.01	2.28	-0.99	Kök Artan Yaprak Azalan

3.12. Anotasyon ve Haritalama

Fonksiyonel anotasyon analizleri sadece log2 transformasyonuna göre 0.5 kat ve üzeri değişim gösteren (2 kat değişim) proteinler için uygulanmıştır. Peptitlerle transkriptlerin hangi proteinlerle ilişkili olduğu Uniprot'tan indirilen *Viridiaplantae* veritabanına karşı yapılan BLAST analizi ile tespit edilmiştir. Ontoloji analizleri ise moleküler fonksiyon (MF), biyolojik proses (BP) ve hücresel komponent (CC) olacak şekilde üç domainde PANTHER programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anotasyonu yapılmış proteinlerin biyolojik yollara haritalanması KEGG otomatik anotasyon sunucusu (KAAS) *O. sativa* ve *A. thaliana* veritabanlarına karşı gerçekleştirilmiştir.

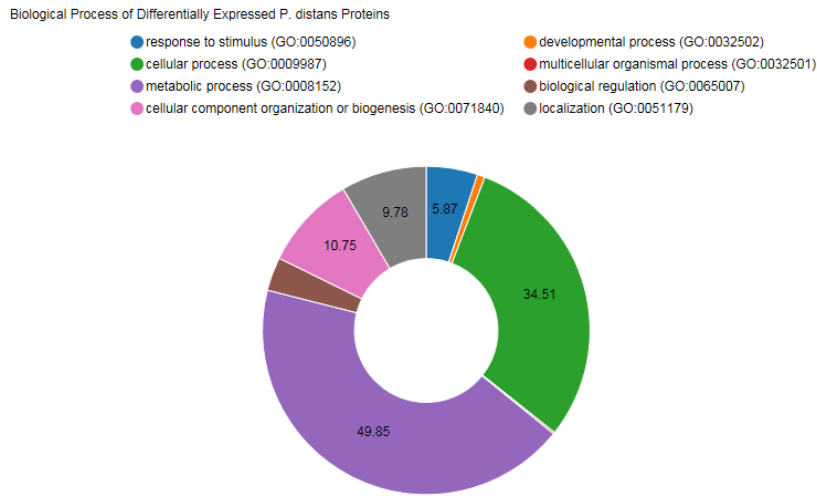
3.13. Ekspresyonu Değişen Proteinlerin İlişkili Olduğu Metabolik Yolların Analizi

Ekspresyon seviyesi anlamlı bulunan tüm proteinler PANTHER algoritması ile ontoloji açısından incelenmiştir. İlk ontoloji kategorisi olan moleküler fonksiyon açısından bakıldığında 419 proteinin katalitik aktivite gösterdiği, 195 proteinin bağlanma aktivitesi gösterdiği, 107 proteinin yapısal molekül aktivitesi gösterdiği, 61 proteinin transport aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra reseptör aktivitesi, translasyon regülasyon aktivitesi, antioksidan aktivitesi ve sinyal transdüsör aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 13).



Şekil 13. Ekspresyonu artan ve azalan proteinlerin moleküler fonksiyon açısından incelenmesi

Bir diğer ontoloji kategorisi olan biyolojik süreç açısından bakıldığında sekiz ana gruba ait proteinler tespit edilmiştir. Buna göre 510 proteinin metabolik süreçlerde rol oynadığı görülmüştür. Bu metabolik süreçler, fosfat içeren bileşenlerin metabolizması, biyosentetik süreç, vitamin metabolizması, nükleotit, lipid, protein ve karbohidrat metabolizmalarını kapsayan primer metabolizma süreçleri, katabolik süreçler, sülfür içeren metabolizma süreçleri, koenzim metabolizma süreçleri gibi süreçlerdir. Bunun yanı sıra 60 proteinin etkiye cevap süreçleri, 39 proteinin biyolojik süreçler, 353 proteinin hücresel süreçler ve 100 proteinin lokalizasyonla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14).

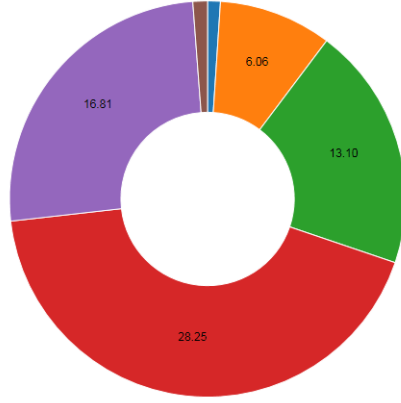


Şekil 14. Ekspresyonu artan ve azalan proteinlerin biyolojik süreç açısından incelenmesi

Son olarak hücresel lokalizasyon açısından incelenen proteinlerde, 289 proteinin hücresel bir organel ile ilişkili olduğu bulunmuş ve daha detaylı bakıldığında bu kısımların nüklear dış membran ve endoplasmik retikulum zar ağı, tilakoid, dış kapsül yapısı, hücresel savunma organelleri, plasma membran ve intracellular organeller olduğu tespit edilmiştir. 172 proteinin organeller ile ilişkili olduğu, 134 proteinin makromoleküler komplekslerle ilişkili olduğu, 62 proteinin membran ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 15). Burada şunu da açıklamak gerekir ki ontoloji veritabanı artıksız bir veritabanı değildir. Yani bir protein birden çok hücresel kompartman ile ilişkili olabileceği gibi organeller örneğin hem hücresel part hem ayrıca organel başlığı altında çıkabilir.

Cellular Component of Differentially Expressed *P. distans* Proteins

● cell junction (GO:0030054)
 ● membrane (GO:0016020)
 ● macromolecular complex (GO:0032991)
 ● cell part (GO:0044464)
 ● organelle (GO:0043226)
 ● extracellular region (GO:0005576)



Şekil 4.15. Ekspresyonu artan ve azalan proteinlerin biyolojik süreç açısından incelenmesi

Proteinler KEGG Metabolik Ağı'nda *A.thaliana* ve *O. sativa* veri tabanları için incelendiğinde bitkilerle ilgili olan Tablo 11'de gösterilen süreçler başlıca olarak tespit edilmiştir.

Tablo 11. KEGG Metabolik Ağ Veritabanı içerisinde *A. thaliana* ve *O. sativa* veritabanlarına eşleşen proteinler eşleştikleri hücresel yollar ile verilmiştir.

Hücresel Yolak (Orjinal isimleri ile verilmiştir.)	Eşleşen protein sayısı
Metabolic pathways	268
Biosynthesis of secondary metabolites	153
Biosynthesis of antibiotics	100
Microbial metabolism in diverse environments	78
Ribosome	76
Carbon metabolism	59
Biosynthesis of amino acids	59
Oxidative phosphorylation	34
Glycolysis / Gluconeogenesis	24
Proteasome	24
2-Oxocarboxylic acid metabolism	22

RNA transport	20
Protein processing in endoplasmic reticulum	20
Cysteine and methionine metabolism	19
Pyruvate metabolism	18
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	18
Carbon fixation in photosynthetic organisms	18
Citrate cycle TCA	17
Glycine, serine and threonine metabolism	17
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	17
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	15
Photosynthesis	14
Arginine biosynthesis	14
Purine metabolism	13
Fatty acid metabolism	13
Spliceosome	13
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	12
Glutathione metabolism	12
Phenylpropanoid biosynthesis	12
Phagosome	12
Tyrosine metabolism	11
Starch and sucrose metabolism	11
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	11
Pentose phosphate pathway	10
Fatty acid degradation	10
Arginine and proline metabolism	10

Endocytosis	10
Synaptic vesicle cycle	10
Fructose and mannose metabolism	9
Pyrimidine metabolism	9
Methane metabolism	9
Carbon fixation pathways in prokaryotes	9
Porphyrin and chlorophyll metabolism	9
Sulfur metabolism	9
Peroxisome	9
Plant-pathogen interaction	9
Fatty acid biosynthesis	8
Phenylalanine metabolism	8
beta-Alanine metabolism	8
Glycerolipid metabolism	8
Photosynthesis - antenna proteins	7
Valine, leucine and isoleucine degradation	7
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	7
Terpenoid backbone biosynthesis	7
mRNA surveillance pathway	7
RNA degradation	7
MAPK signaling pathway - plant	7
Ubiquitin mediated proteolysis	7
mTOR signaling pathway	7
PI3K-Akt signaling pathway	7
AMPK signaling pathway	7

Collecting duct acid secretion	7
Rheumatoid arthritis	7
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	6
Lysine degradation	6
Tryptophan metabolism	6
alpha-Linolenic acid metabolism	6
Propanoate metabolism	6
Butanoate metabolism	6
Nitrogen metabolism	6
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	6
Ribosome biogenesis in eukaryotes	6
Lysosome	6
Tight junction	6
Ascorbate and aldarate metabolism	5
Lysine biosynthesis	5
Cyanoamino acid metabolism	5
Inositol phosphate metabolism	5
Glycerophospholipid metabolism	5
One carbon pool by folate	5
Pantothenate and CoA biosynthesis	5
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	5
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5
Pentose and glucuronate interconversions	4
Selenocompound metabolism	4
Biotin metabolism	4

Flavonoid biosynthesis	4
Two-component system	4
Quorum sensing	4
Protein export	4
PPAR signaling pathway	4
Phosphatidylinositol signaling system	4
Sphingolipid signaling pathway	4
Phospholipase D signaling pathway	4
Plant hormone signal transduction	4

Bu metabolik yollar ve proteinlerin ontolojileri beraber değerlendirildiğinde karbohidrat, lipid, nükleik asit primer metabolizmaları, oksidatif stres yolları, hormonlar, sinyal transduksiyonu gibi bir çok hücresel sürecin B stresi altında kök ve yaprak dokularında değiştiği gözlenmiştir. *P.distans*'ın B stresini nasıl tolere ettiğinin anlaşılması açısından B'nin hücre içine alımı ve biriktirilmesini kapsayan plasma membran ve hücre duvarı ayrıntılı olarak incelenmiştir.

B stres koşulları altında hem kök hem yaprak dokusunda tespit edilen proteinlerden en önemlileri aquaporin proteinleridir. Bu proteinler kanal proteinleri ailesine dahil olup bitkisel sistemlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Aquaporin proteinleri substrat olarak su moleküllerinden küçük nötral moleküllere kadar farklı moleküllere afinite göstermektedir (Schnurbusch vd. 2010). Çevresel stres koşulları altında aquaporinlerin ekspresyonu değişmekte ve hücrenin pH seviyesi ve protein transport mekanizması değişmektedir (Aroca ve Ruiz-Lozano, 2012). Bu çalışmada ekspresyon seviyesinde anlamlı farklılık gözlenen aquaporinler tonoplast intrinsic protein (TIP) alt grubuna ait *A. thaliana* homologu TIP21_ARATH proteini ve TIP12_ARATH proteinleridir. Her iki proteinde Tablo 4.10'de gösterildiği gibi kök dokusunda ekspresyon artışı gösterirken yaprak dokusunda azalan bir ekspresyon ortaya koymaktadır. Farklı aquaporinlerin aynı stres koşulu altında azalan veya artan bir ekspresyon grafiği ortaya koyduğu bilinmektedir. Aynı zamanda farklı dokularda farklı ekspresyon seviyelerinin gözlenmesi de beklenen bir durumdur (Alexandersson vd. 2005; Guo vd. 2006).

Normal koşullarda, germin protein ailesinin bitki hücre duvarı yapımından sorumlu olduğu bilinmektedir. Germin proteinleri ayrıca oksalat oksidazları oksalatu karbondioksit ve hidrojen peroksit katalizmeden sorumludurlar (Carter vd. 1998). Sentezlenen hidrojen peroksit hücre

duvarı komponentlerinin çapraz bağlanmasını sağlamaktadır, ayrıca hücrel savunma sistemi açısından da önemli bir rol oynamaktadır (Lachman, 1986; Lane, 1994). Yüksek miktardaki B'nin yaprak dokusunda germin proteinlerinin azalan ekspresyonuna yol açtığı görülmüştür. Buna karşın, kök dokusunda bir miktar artan ekspresyon gözlenmiştir.

Ontoloji analizlerinde bazı proteinlerin hücrel membran yapıları ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu proteinler arasında, bitkilerde yüksek oranda korunan remorin protein ailesi mevcuttur (Reymond vd. 1996). Bu protein ailesi plasma membran yapısı ve lipid-raft ile ilişkili proteinlerden oluşmaktadır (Bariola vd. 2004). Bu proteinlerin ekstrasellüler matrix bileşenleri ve hücre iskeleti ile etkileştiği bilinmektedir (Ridley vd. 2001). Bu çalışmada bu proteinlerin kök dokusunda arttığı ve yaprak dokusunda azaldığı görülmüştür. Tıpkı germin protein ailesinde ve aquaporinlerde gözleendiği gibi kök dokularında B stresi altında hücre duvarı ve plasma membran ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu artmakta, yaprak dokusunda ise azalmaktadır. Dolayısıyla çalışmadaki bulgulara göre *P.distans* köklerinin hücre duvarı ve plasma membran ile ilişki proteinleri aktive ederek B'nin hücre içine alımını sağladığı ve tonoplastlar aracılığı ile B moleküllerini vakuollerde biriktirdiği ancak daha toksik miktarlar için hücre iskeletini sağlamlaştırıp hücreyi toksik etkiden koruduğu sonucuna varılabilir. B molekülleri kökten yaprak dokusuna ulaştığında lokalizasyon artık vakuollerde olmadığından TIP proteinlerine ihtiyaç kalmamakta ve farklı aquaporinler aktive olmaktadır. Plasma membran ve hücre duvarı kök dokusundan farklı olarak daha sıkı bir yapıya sahip değildir.

4. Sonuç

Bu çalışmada toprak ve suyuda yarattığı kontaminasyon ile özellikle tarımsal öneme sahip bitkiler için toksit etki yaratan B molekülünü yüksek miktarlarda biriktirebilen *P.distans* organizmasının B tolerans mekanizması proteomik açıdan çalışılmıştır. Çalışma bu organizmada B stres koşulu altında hem kök hem yaprak dokuları için transkriptom ve proteom verilerinin beraber değerlendirildiği ilk çalışma özelliğindedir.

Çalışmada bitkinin kontrol koşuluna göre B stres koşulu altında 51 kat fazla B biriktirebildiği gözlenmiştir. Yaprak dokularının kök dokularına göre daha fazla B biriktirdiği gözlenmiştir. Kantitatif proteomik verilerine göre B transportundan sorumlu tonoplast proteinleri aydınlatılmış ve primer metabolik yollar başta olmak üzere oksidatif stres, protein yıkım, hormonal sinyal yolları gibi metabolik yollarda görev yapan proteinlerin ekspresyonlarında değişimler gözlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda her ne kadar belli başlı proteinler aydınlatılmış olsa da B'nin hücrel lokalizasyonun gösterilmesine dair analizlerin hücrel görüntüleme teknikleri ile gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Proje ekibi tespit ettiği tonoplastların B'yi vakuolde veya diğer

hücrel kompartmanlarda nasıl biriktirdiğine dair SEM tabanlı hücrel görüntüleme yaptırmak istemiş olsa da, biyolojik örnekler IYTE SEM laboratuvarında analiz edilememiştir.

Değişimi gösterilen diğer metabolik yollar için ek enzim deneyleri bütçe kısıtlılığı sebebiyle yapılamamıştır. Ancak sonraki projelerde ekip bu çalışmalarını yapmayı hedeflemektedir. Böylece kantitatif analizlerin farklı seviyelerle doğrulanması sağlanacaktır.

5. Kaynaklar

Ahmad W., Niaz A., ve Kanwal S. 2009. Role of boron in plant growth : A review. *Journal of Agricultural Research* 47: 329-338.

Alexandersson E., Fraysse L., Sjøvall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., Karlsson M., vd. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins, *Plant Mol. Biol.* , vol. 59 (pg. 469-484)

Allmer J., Kuhlert S., Hippler M. 2008. 2DB: a Proteomics database for storage, analysis, presentation, and retrieval of information from mass spectrometric experiments. *BMC Bioinformatics* 9: 302–310.

Allmer J 2010. Label-free quantitation, an extension to 2DB. *Amino Acids* 38 (4):1075-1087

Allmer J 2011. Algorithms for the de novo sequencing of peptides from tandem mass spectra. *Expert Rev Proteomics* 5: 645-657.

Ardic M., Sekmen A.H., Tokur S., Ozdemir F. ve Turkan I. 2009. Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity. *Plant Biology* 11: 328-38.

Ardic M., Sekmen A.H., Turkan I., Tokur S. ve Ozdemir F. 2008. The effects of boron toxicity on root antioxidant systems of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Plant and Soil* 314: 99-108.

Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano JM. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions, *J. Exp. Bot.* vol. 63 (pg. 43-57)

Aydin G., Atatanir L ve Yorulmaz A. 2012. Investigation and mapping of risk areas for harmful boron content and the relationship to salt and sodium content in soils of Soke Plain, Aydin, Turkey. *Archives of Agronomy and Soil Science* 58: 232-237.

Babaoğlu M., Gezgin S., Topal A., Sade B., Dural H. 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat: A Boron Hyperaccumulator Plant Species That May Phytoremediate Soils with Toxic B Levels. *Turk J Bot* 28: 273-278.

Bariola P., Retelska D., Stasiak A., Kammerer R., Fleming A., Hijri, M., vd. 2004. Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant molecular biology*,55(4): 579-594.

Binns D., Dimmer E., Huntley R., Barrell D., O'Donovan C., Apweiler, R. 2009. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics*, 25(22), 3045–3046.

Bradford MM.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254.

Brenchley W.E. ve Warington K. 1927.The Role of Boron in the Growth of Plants. *Ann Bot* 41: 167-188.

Cakmak I .1997. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* 193: 71-83.

Camacho-Cristóbal J.J., Anzellotti D. ve González-Fontes A. .2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 997-1002.

Camacho-Cristóbal JJ., Herrera-Rodriguez MB., Beato V.M., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., Maldonado J.M. and Gonzalez-Fontes A. 2008. The expression of several cell wall-related genes in *Arabidopsis* roots is down-regulated under boron deficiency. *Environmental and Experimental Botany* 63: 351-358.

Carpentier S.C., Panis B., Swennen R., Lammertyn J .2008. Finding the significant markers: statistical analysis of proteomic data. *Methods in Molecular Biology* 428: 327-347.

Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Deckers P., Swennen R., Panis B. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5: 2497-2507.

Carpentier S.C., Witters E., Laukens K., Van Onckelen H., Swennen R., Panis B. 2007b. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: Acclimation to osmotic stress. *Proteomics* 7: 92-105.

Carpentier S.C., Coemans B., Podevin N., Laukens K., Witters E., Matsumura H., Terauchi R., Swennen R., Panis B. 2008a. Functional genomics in a non-model crop: transcriptomics or proteomics? *Physiol Plant* 133: 117-130.

Carpentier S.C., Panis B., Vertommen A., Swennen R., Sergeant K., Renaut J., Laukens K., Witters E., Samyn B., Devreese B. 2008b. Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach. *Mass Spec Rev* 27: 354-377.

Carpentier S.C., Swennen R., Panis B. 2009. Plant protein sample preparation for 2DE. In: Walker, J. M. (Ed.), *the protein protocols handbook*. Humana Press, Totowa, pp: 107-117.

- Carpentier S.C., Panis B., Renaut J., Samyn B., Vertommen A., Vanhove A.C., Swennen R., Sergeant K. 2011. The use of 2D-electrophoresis and de novo sequencing to characterize inter- and intra-cultivar protein polymorphisms in an allopolyploid crop. *Phytochemistry* 72: 1243-1250.
- Carter C., Graham R.A., Thornburg R.W. 1998. *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Mol Biol.*38(6):929-43.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676.
- Craig R. ve Beavis R. 2004. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20(9): 1466-1467
- Dell B. and Huang L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil* 193: 103-120.
- Dordas C. 2000. Permeability and Channel-Mediated Transport of Boric Acid across Membrane Vesicles Isolated from Squash Roots. *Plant Physiology* 124: 1349-1362.
- Eraslan F., Inal A. ve Gunes A. 2007. Boron Toxicity Alters Nitrate Reductase Activity, Proline Accumulation, Membrane Permeability and Mineral Constituents of Tomato and Pepper Plants. *Journal of Plant Nutrition* 30: 981-994
- Ferrol N., Belder A., Roldan M., Rodriguez-Rosales M.P. and Donaire J.P. 1993. Effects of Boron on Proton Transport and Membrane Properties of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cell Microsomes. *Plant Physiology* 103: 763-769.
- Geer L.Y., Markey S.P., Kowalak J.A., Wagner L., Xu M., Maynard D.M., Yang X . 2004. Open Mass Spectrometry Search Algorithm. *Journal of Proteome Research* 3: 958–964.
- Goff L., Trapnell C., ve Kelley D. R. 2013. cummeRbund: Analysis, Exploration, Manipulation, and Visualization of Cufflinks High-throughput Sequencing Data.
- Guo L., Wang Z.Y., Lin H., Cui W.E., Chen J., Liu M., vd. 2006 . Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family, *Cell Res.* , vol. 16 (pg. 277-286)
- Güneş A., Alpaslan M., Özcan H., Çıkkılı Y. 2000. Türkiye’de yaygın olarak yetistirilen mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerinin bor toksisitesine duyarlılıkları. *Turk J Agric For* 24: 277-282.

- Goldbach H.E. 1997. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants : suggestions for further research and methodological requirements. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 15: 51-91.
- Graham R.D., Welch R.M., Grunes D.L., Cary E.E. ve Norvell W.A. 1987. Effect of Zinc Deficiency on the Accumulation of Boron and Other Mineral Nutrients in Barley1. *Soil Science Society of America Journal* 51: 652.
- Haas B. J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P. D., Bowden J. vd . 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512.
- Han S., Chen L.S., Jiang H.X., Smith B.R., Yang L.T., Xie C.Y. 2008. Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *Journal of Plant Physiology* 165: 1331-1341.
- Hanaoka H., Uraguchi S., Takano J., Tanaka M., Fujiwara, T. 2014. OsNIP3;1, a rice boric acid channel, regulates boron distribution and is essential for growth under boron-deficient conditions. *The Plant Journal*, 78(5), 890–902.
- Hayes J.E. ve Reid R.J. 2004. Boron tolerance in barley is mediated by efflux of boron from the roots. *Plant Physiology* 136: 3376-3382.
- Harite Ü. ve Aydın M. 2008. Differential response of cotton cultivars to boron toxicity. *International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology, Turkey*, p: 477-482.
- Hirosawa M., Hoshida M., Ishikawa M., and Toya T. 1993. MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput Appl Biosci* 2: 161-167.
- Kanehisa M. 2002. The KEGG database. silico simulation of biological processes.
- Kasajima I. ve Fujiwara T. 2007. Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron. *Plant Biotechnology* 24: 355-360.
- Kim S., Mischerikow N., Bandeira N., Navarro J.D., Wich L., Mohammed S., Heck A.J.R. 2010. The Generating Function of CID , ETD , and CID / ETD Pairs of Tandem Mass Spectra : Applications to Database Search ,*Mol & Cell Proteomics* 9: 2840-2852.
- Kobayashi M., Mutoh T. and Matsu T. 2004. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply. *Journal of Experimental Botany* 55: 1441-1443.

Koç C. 2007. Effects on environment and agriculture of geothermal wastewater and boron pollution in great Menderes basin. *Environmental Monitoring and Assessment* 125: 377-388.

Kot F.S. 2008. Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 8: 3-28.

Lachman P.J. 1986. A common form of killing. *Nature* 321: 560: 34

Lane B.G. 1994 Oxalate, germin and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J* 7: 294–301.

Langmead B. ve Salzberg S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359.

Liu D., Jiang W., Zhang L. ve Li L. 2000. Effects of Boron Ions on Root Growth and Cell Division of Broadbean (*Vicia Faba L.*). *Israel Journal of Plant Sciences* 48: 47-51.

Loomis W.D. ve Durst R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *BioFactors* 3: 229–239.

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. San Diego Academic, P: 889.

Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10.

Mi H., Huang X., Muruganujan A., Tang H., Mills C., Kang D., ve Thomas P. D. 2016. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research*, 1–15.

Nable R.O., Paull J.G. ve van Beusichem ML. 1990. Effect of excess grain boron concentrations on early seedling development and growth of several wheat (*Triticum aestivum*) genotypes with different susceptibilities to boron toxicity. *Plant nutrition - physiology and applications. Proceedings of the Eleventh International Plant Nutrition Colloquium, Netherlands*, p: 291-295.

Nable R.O. 1988. Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil* 112: 45-52.

Nable R.O., Ba G.S. ve Paull J.G. . 1997. Boron toxicity. *Plant and Soil* 193: 181-198.

Nielsen F.H. 1998. The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. *Biological Trace Element Research* 66: 319-330.

Nozawa A., Takano J., Kobayashi M., von Wirén N. ve Fujiwara T. 2006. Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 262: 216-222.

- Padmanabhan P., Babaoğlu M. and Terry N. 2012. A comparative transcriptomic analysis of the extremely boron tolerant plant *Puccinellia distans* with the moderately boron tolerant *Gypsophila arrostil*. *Plant Cell Reports* 31: 1407-1413.
- Pan C., Kumar C., Bohl S., Klingmueller U., Mann M. 2009. Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions. *Mol Cell Proteomics* 9: 443-450.
- Patterson J., Ford K., Cassin A., Natera S. ve Bacic A . 2007. Increased abundance of proteins involved in phytosiderophore production in boron-tolerant barley. *Plant Physiology* 144: 1612-1631.
- Paull J.G., Cartwright B. ve Rathjen A.J. 1988. Responses of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron. *Euphytica* 39: 137-144.
- Peryea F.J., Bingham F.T. and Rhoades JD. 1985. Mechanisms for Boron Regeneration¹. *Soil Science Society of America Journal* 49: 840.
- Reid R. 2007a. Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant & Cell Physiology* 48: 1673-1678.
- Reid R. 2007b. Update on boron toxicity and tolerance in plants, In: *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition* 16th ed, Springer: 83-90.
- Reinders J., Lewandrowski U., Moebius J., Wagner Y. and Sickmann A . 2004. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* 4: 3686-703.
- Reymond P., Weber H., Damond M. ve Farmer E.E . 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707–720.
- Ridley B.L., O'Neill M.A. ve Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6): 929-967.
- Schnurbusch T., Hayes J., Hrmova M., Baumann U., Ramesh S.A., Tyerman S.D., vd. 2010. Boron toxicity tolerance in barley through reduced expression of the multifunctional aquaporin HvNIP2;1, *Plant Physiol.* vol. 153: 1706-1715
- Sillanpaa M. 1990. Micronutrient assessment at the country level: an international study, *FAO Soils Bulletin*, Michigan univeristy, 63: 208.
- Soy M. 2003. Effect of phosphorus on the alleviation of boron toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum* L .) plant. *Tarım Billimleri Dergisi* 9: 273-277.

Stiles A.R., Bautista D., Atalay E., Babaoğlu M. ve Terry N. 2010. Mechanisms of boron tolerance and accumulation in plants: a physiological comparison of the extremely boron-tolerant plant species, *Puccinellia distans*, with the moderately boron-tolerant *Gypsophila arrostil*. *Environmental science technology* 44: 7089-7095.

Sutton T., Bauman U., Hayes J., Collins N.C., Shi B.J., Schnurbusch T., Hay A., Mayo G., Pallotta M., Tester M. ve Langridge P. 2007. Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science* 318: 1446-1449.

Swietlik D. 1995. Interaction between zinc deficiency and boron toxicity on growth and mineral nutrition of sour orange seedlings. *Journal of Plant Nutrition* 18: 1191-1207.

Tanabe M. ve Kanehisa M. 2012. Using the KEGG database resource. *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPPL.38).

Tanaka M. ve Fujiwara T. 2008. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflugers Arch.* 456(4): 671-677.

Takano J., Miwa K. ve Fujiwara T. 2008. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science* 13: 451-7.

Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D. R. vd. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578.

Urano K., Kurihara Y., Seki M. ve Shinozaki K. 2010. “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 132-138.

Vanhove A.C., Vermaelen W., Panis B., Swennen R., Carpentier S.C. 2012. Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 3: 176.

Vertommen A., Panis B., Swennen R., Carpentier S.C. 2010. Evaluation of chloroform/methanol extraction to facilitate the study of membrane proteins of non-model plants. *Planta* 231: 1113-1125.

Vertommen A., Møller A.L.B., Cordewener J.H.G., Swennen R., Panis B., Finnie C., America A.H.P., Carpentier S.C.A. 2011. Workflow for peptide-based proteomics in a poorly sequenced plant: A case study on the plasma membrane proteome of banana. *Journal of Proteomics* 74: 1218-1229.

Wang Y., Yang C., Liu G., ve Jiang J. 2007. Development of a cDNA microarray to identify gene expression of *Puccinellia tenuiflora* under saline-alkali stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 567–576.

Yu Q., Baluska F., Jasper F., Menzel D. ve Goldbach HE. 2003. Short-term boron deprivation enhances levels of cytoskeletal proteins in maize, but not zucchini, root apices. *Physiologia Plantarum* 117: 270-278.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ANNE FRARY
Proje No:	113Z930
Proje Başlığı:	Puccinellia distans (Jacq.) Parl.'da Boron Hiperakümülyasyonu ve Tolerans Mekanizmalarının Proteomiks Yaklaşım Kullanarak Anlaşılması
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	JENS ALLMER, TALAT YALÇIN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2014 - 15/04/2017
Onaylanan Bütçe:	373310.0
Harcanan Bütçe:	338279.82
Öz:	<p>Bor hem yüksek hem düşük konsantrasyonlarında bitkilerde büyüme bozukluklarına ve verim kaybına neden olmaktadır. Yüksek bor konsantrasyonundan kaynaklanan problemlerin giderilmesi için gerçekleştirilen; toprağın yıkanması, toprağın çinko ile zenginleştirilmesi gibi yöntemlerin bu sorunun giderilmesinde yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Dünya bor rezervlerinin %71,3'üne sahip olan Türkiye'de bor toksisitesi, önemli bir tarımsal sorundur ve ülkenin belirli bölgelerindeki birçok tarım bitkinin verimini azaltmakta ve kullanılabilir tarım alanlarını kısıtlamaktadır. Dayanıklı tür belirlemeye yönelik yapılan araştırmalar sonucunda Türkiye'de bor madenlerinin bulunduğu arazilerde büyüeyebilen ve yüksek bor toksisitesine tolerans gösteren Puccinellia distans (çorak çimi) tanımlanmıştır. Tarımsal olarak ekonomik bir değeri olmamasına rağmen, yakın zamanda gerçekleştirilen fizyolojik çalışmaların ışığında bünyesinde yüksek miktarlarda bor biriktirebildiği bulunmuştur. Bu bitki türü ile transkriptomik düzeyde çalışılmıştır fakat üzerinde daha önce proteomik düzeyde herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bu projede, Puccinellia distans bitkisindeki bor toksisitesine karşı toleransta rol oynayan mekanizmalar proteomik (proteinlerin farklı ekspresiyon profillerinin çıkarılması) yaklaşımla incelenmiştir. Puccinellia distans bitkisindeki bor toksisitesine dayanıklılık mekanizmalarını ortaya çıkarmak için bor stresine maruz bırakılmış bitkiler ile normal şartlarda yetiştirilmiş bitkilerin kök ve yapraklarından izole edilen proteinler incelenmiştir. İfadelemesi farklı bulunan proteinlerin tanımlanması için etiketsiz (label-free) kütle spektrometresi ile ölçümler yapılmıştır. Puccinellia distans transkriptomu, Arabidopsis thaliana ve Oryza sativa proteinleri ve de novo dizileme sonuçlarında oluşan bir veritabanı kullanılarak kütle spektrometre verileri analiz edilmiştir, peptitler ve dolayısıyla proteinler tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda boron transportundan sorumlu aquaporin proteinleri, tonoplastlar tanımlanmış ve karbohidrat, lipid, protein yıkım, oksidatif stres, hormonal sinyal transdüksiyonu gibi metabolik yolların stres koşullarından etkilendiği tespit edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Çorak çimi, Puccinellia distans, Bor, Etiketsiz Proteomiks, EST, Transkriptomik
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır