

**Deniz Pancarı Bitkisinde Mangan Toleransında Rol
Oynayan Genlerin Tanımlanması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 113Z401

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Hüseyin Çağlar KARAKAYA

EYLÜL 2014

İZMİR

ÖNSÖZ

Bir mikronutrient olan mangan, bitkilerde birçok enzimin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Manganın aşırı birikmesi toksik olmaktadır. Metal tolerans proteinleri (MTP), catyon difuzyon proteinleri (CDF) familyasından olup hücredeki fazla metali dışarı pompalayarak metal dengelenmesinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada, deniz pancarı (*Beta maritima*) bitkisinden fonksiyonel genomik yöntemi ile izole edilen 2 MTP proteininin, mayada aşırı ifadenmesi fazla mangan seviyesini düşürerek tolerans sağlamıştır. Proteinler Golgide lokalize olmuştur. Bu genlerin Arabidopsis MN-CDF AtMTP11 ile homolog olması bitkiler aleminde evrimsel olarak korunduğunu göstermektedir. Bu çalışma 113Z401 nolu proje olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER	
KAPAK	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1.GİRİŞ	1
2. GEREÇ YÖNTEM	2
2.1 Bitki materyali, büyüme koşulları ve örnekleme	2
2.2 Maya suşları ve cDNA kütüphane taraması	2
2.3 Hücre içi mangan seviyesinin tespiti	3
2.4 Hücre içi protein lokalizasyon (GFP)	3
2.5 cDNA'ların RT- PZR analizi	3
3. BULGULAR	4
3.1 Mangana toleransı olan BmMTP10 ve BmMTP11 in belirlenmesi	4
3.2 BmMTP10 ve BmMTP11 in ifadenmesi	8
3.3 BmMTP10 ve BmMTP11 lokalizasyonu	9
3.4 BmMTP10 ve BmMTP11 ifadenme analizleri	10
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	11
KAYNAKLAR	13

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. BmMTP10 ve BmMTP11in maya hücresindeki fenotipleri	5
Şekil 2. BmMTP10 ve BmMTP11 in diğer Mn-MTP proteinleri ile korunmuş bölgelerini gösteren amino asid sekansları	6
Şekil 3. Mn-MTP nin filogenetik ağacı	7
Şekil 4. BmMTP10 ve BmMTP11 hücre içi mangan seviyeleri.	8
Şekil 5: BmMTP10 ve BmMTP11 in maya hücrelerinde lokalizasyonu.	9
Şekil 6. <i>Beta maritima</i> da BmMTP10 ve BmMTP11in kök ve yaprakdaki ifadelenmesi	10

ÖZET

Mangan (Mn^{+2}) bitkide temel bir nutrienttir. Mn^{+2} seviyesinin artışı bitki hücrelerinde toksiktir. Metal tolerans proteini (MTP), kolaylaştırılmış katyon difüzyon protein ailesinin (CDF) bir üyesidir ve farklı bitki türlerinde metal homeostazisinde ve aşırı metal iyonlarının dışarı atılmasında önemli rolü vardır. Bu çalışmada *Beta maritima*' dan iki MTP geni tespit ve karakterize edildi. Bu iki genin aşırı ifadelmesi maya hücrelerinde Mn^{+2} toleransı sağlamıştır. Sekans analizleri BmMTP10 ve BmMTP11 in Mn-CDF aile üyesinden olduğunu göstermiştir. Bu proteinlerin fonksiyon analizleri, mayada ifadelendiğinde Mn^{+2} seviyesinin düşmesinde rol oynadığını göstermiştir. Proteinler Golgi aygıtında lokalize olmuştur. Mangan uygulamasından sonra BmMTP10 ifadelmesi üç kat artmış olmasına rağmen BmMTP11 seviyesi değişmemiştir. Sonuçlarımız gösteriyor ki, *B. maritima*' nın BmMTP10 ve BmMTP11 proteinleri Mn^{+2} detoksifikasyonu açısından önemli bir fonksiyona sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Mangan, deniz pancarı, maya

ABSTRACT

Manganese (Mn^{2+}) is an essential micro-nutrient in plants. However increased Mn^{2+} levels are toxic to plant cells. Metal tolerance proteins (MTPs), member of cation diffusion facilitator protein (CDF) family, have important roles in metal homeostasis in different plant species and catalyse efflux of excess metal ions. In this study, we identified and characterized two MTP genes from *Beta maritima*. Overexpression of these two genes provided Mn tolerance in yeast cells. Sequence analyses displayed BmMTP10 ve BmMTP11 as members of the Mn-CDF family. Functional analyses of these proteins indicated that they are specific to Mn^{2+} with a role in reducing excess cellular Mn^{+2} levels when expressed in yeast. GFP- fusion constructs of both proteins localized to the Golgi apparatus as a punctuated pattern. Finally Q-RT-PCR results showed that BmMTP10 expression was induced threefold in response to the excess Mn^{+2} treatment. On the other hand BmMTP11 expression was not affected in response to excess Mn^{+2} levels. Our results suggest that the BmMTP10 and BmMTP11 proteins from *B. maritima* have important functions in terms of Mn^{+2} detoxification.

Keywords: Manganese, sea weed, yeast

GİRİŞ

Bir mikromutrient olan mangan bitkilerde birçok enzimin aktivasyonunda kofaktor olarak temel rol oynar (Hänsch ve Mendel 2009). Mangan fotosistem II den suyun oksijene evaporasyonunda temel bir role sahiptir (Ono vd.1992). Buna ek olarak, Mn^{2+} bitkilerde yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında da oksijenle Mn (II) durumundan Mn (III) ve Mn (IV) durumuna geçmesinde görev alır (Marschner 1995). Mangan aynı zamanda MnSOD nin yapısında ve kendisinin yükseltgenmesi aracılığıyla superoksit seviyelerini azaltarak antioksidant olarak rol oynar (Kenten ve Mann 1949; Bowler vd. 1991). Bunun yanı sıra Mn^{2+} PEP karboksikinaz, malik enzim, fenilalanin ammoniya-liyaz, izositrat dehidrogenaz gibi birçok enzimi aktive eder (Marschner 1995).

Mangan bitkiler tarafından aşırı alındığında toksisiteye neden olur (Maze 1936). Toksikite belirtileri sarılık, nekroz ve yapraklarda kahverengi benekler şeklinde gözlemlenir (Clairmont vd.1986). Bunun yanında toksik seviyedeki mangan karotenoid seviyesini düşürerek klorofil seviyesinde azalma ve yapraklardaki CO₂ asimilasyonunda düşüş sağlar (Clairmont vd.1986, Gonzalez ve Lynch 1997). Ayrıca ağır mangan toksisitesi antioksidant enzimin yapısını değiştirir, böylece ROS (Reaktif Oxygen Species) seviyelerinde artmaya öncülük ederek hücre membranına zarar verir, filiz ve köklerin büyümesini azaltır (Xue vd. 1995).

Metal iyon transport proteinleri, bitki hücresindeki metal homeostasisin kontrolü için çok büyük önem taşımaktadır. Mangan hücreye AtIRT1, HvIRT1, OsYSL2 ve AtNRAMP1 gibi transportörlerle aktif taşıma ile alınır. AtIRT1 ve HvIRT1 gibi multi-spesifik metal iyon transportörleri plazma membranına lokalize olur, demir, mangan, kadmiyum ve çinkoyu taşıyabilir (Pedas vd.. 2008; Vert vd. 2002; Korshunova vd.1999). OsYSL2 (sar strip1(ys1) bir metal-NA transportörüdür ve demir ve mangan-NA kompleksinin floemde transportunu sağlar (Koike vd. 2004; Ishimaru vd. 2010). Buna ek olarak AtNRAMP1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1) özellikle kökün büyüme alanlarında spesifik yüksek ekspresyonuyla Mn^{2+} yetmezliği durumlarında indüklenir (Cailliatte vd. 2010). Bitkilerde Mn^{2+} toleransında rol oynayan, mangan transportörleri vakuollerde lokalize olduğu rapor edilmiştir. Kalsiyum iyon transportu olarak bilinen AtCAX2 mangan ve kadmiyumu transfer edebilir ve CDF protein ailesinin bir üyesi olan ve *Stylosanthes hamata* dan saflaştırılmış ShMTP1 Mn^{2+} transportu sağlar (Delhaize vd. 2003). Ek olarak AtNRAMP3 ve AtNRAMP4 Mn^{2+} homeostasisini kontrol eder ve mezofil hücrelerinde optimal fotosentezde vakuol sağlanmasıyla Mn^{2+} salgılanır (Lanquar vd. 2010).

Bunun yanı sıra yukarıda bahsedilen transportörler salgı arayollarıyla aktive olurlar. AtECA1 transportörleri Mn^{2+} ve Ca^{2+} yi ER a transfer eder, böylelikle Mn^{2+} ve Ca^{2+}

homeostasisini sağlamış olurlar (Wu vd. 2002). AtMTP11 CDF nin bir üyesidir ve endositoz aracılığıyla aşırı mangani ekarte etmek için golgi aparatının içine taşır (Peiter vd. 2007), AtMTP11nin pre-vakuolar komponentlercede taşınabileceğini belirtilmiştir (Delhaize vd. 2007). AtECA3 bir Ca-ATPase dir ve golgi aparatında ya da golgi de lokalize olur ve Mn²⁺ sınırlanmasında (Mills vd. 2008) ve Mn²⁺ toksisitesinde (Li vd. 2008) önemli rol oynar.

Deniz pancarı, *Beta maritima* birçok değişken çevre koşullarında hayatta kalma yeteneğine sahiptir ve stres dayanıklı direnç genleri içerir (Doney 1993). Deniz pancarları deniz kenarlarındaki yüksek tuz konsantrasyonunda büyüyebilirler. Bunun yanı sıra cercospora ve rhizomania gibi birçok ciddi hastalığa karşı direnç oluştururlar (Stevanato vd. 2001). Deniz pancarı köklerinde 36-113 mg.kg⁻¹ (kuru ağırlık) gibi yüksek oranda Mn²⁺ biriktirmektedir (Sillanpää 1982). Bu çalışmada da fonksiyonel genomik metodu kullanılarak *Beta maritima*' dan mangan taşıyıcı genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Bitki materyali, büyüme koşulları ve örnekleme

Beta maritima TR 51196 çeşitleri Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, temin edilmiştir. Tohumlar steril torfta çimlendirilmiş ve bitki büyüme odalarında yetiştirilmiştir. Fideler, pompa ile havalandırılmış ve ½ Hoagland bitki büyüme solüsyonuna alınarak, 25 °C'de 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık, %50 nem ve 400 µmol m⁻².s⁻¹ ışık yoğunluğunda büyütülmüştür. Uygun büyüme sağlandığında, son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde Mn²⁺ büyüme solüsyonuna eklenmiş ve 12 saat boyunca bitkiler mangana maruz bırakılmıştır. Bu 12 saat boyunca 0. saat kontrol grubu olacak şekilde, her 3 saatte bir gerçek zamanlı PZR için kök ve yaprak örnekleri toplanmıştır.

2.2 Maya suşları ve cDNA kütüphanesi taraması

Yabani maya suşu, *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa; his3; leu2; met15; ura3*) ve onun izogenik haploid delesyon mutasyonları; YGL167C (*Δpmr1*), YOR316C (*Δcot1*) ve YDR135C (*Δycf1*) maya delesyon kütüphanesinden (Invitrogen) temin edilmiştir. Mayaların büyütülmesinde, YPD besi yeri (%2 glikoz, %2 pepton, %1 maya özütü ve %2 agar (katı besi yeri için) ve SD besi yeri (%2 glikoz, %0.7 aminoasit içermeyen YNB ve urasil içermeyen %0.3 oranında uygun aminoasitler) kullanılmıştır.

Mangan ile muamele edilen *Beta maritima* fidelerinden, pAG426GPD vektörüne atılmış cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur (Bozdağ G. 2009 İYTE kütüphanesi Tez T000198 QH433.B79). Bu cDNA kütüphanesi *Δpmr1* maya mutantına aktarılarak ve 2.7 mM MnCl₂ içeren besi yerinde taranmıştır. Transformasyonlarda Lityum Asetat metodu kullanılmıştır (Burke vd. 1994). Spot testi için, gece boyunca büyüyen kültürler (180 rpm, 30 °C'de), 600 nm'deki optik yoğunlukları göre, 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002 oranlarında distile suyla seyreltilerek farklı metallerle muamele edilmiş olan (8 mM Mn²⁺, 1 mM Co⁺², 150 µM Cd⁺², 1.8

mM Ni²⁺, 110 mM B²⁺ ve ya metalsiz) SD katı besi yerlerine spotlanmıştır. Maya hücreleri beş gün boyunca 30°C' de katı besiyerinde inkübe edilerek fotoğraflanmıştır.

2.3 Hücre içi mangan seviyesinin tespiti

Beta maritima'dan Mn²⁺ muamelesi sonrasında elde edilmiş olan 2 klonun ve boş vektörün (*pAG426GPD*) transforme edildiği $\Delta pmr1$ maya hücrelerinin hücre içi Mn²⁺ konsantrasyonları Mizuno vd. 2005'den yararlanılarak ölçülmüştür.

Gece boyunca büyüyen kültürler 1/1000 oranında seyreltilerek son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde MnCl₂ eklenmiş ve hücreler büyüme konsantrasyonları göre 48 – 60 saat arasında büyütülmüştür. Daha sonra, hücreler 10 mM EDTA ile 3 kez yıkanıp 70°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiş ve 5 mg miktarındaki maya hücreleri % 65 HNO₃ ile parçalanıp, filtrelenmiştir. Özütlemler, Mn²⁺ miktarları Agilent 7500ce İndüktif Eşleşmiş Plazma - Kütle Spektrometre Cihazı (ICP-MS) ile belirlenmiştir (Agilent Teknolojileri).

2.4 Hücre içi protein lokalizasyon (GFP)

P426GPD-EGFP vektörü kullanarak proteinlerin mayadaki lokalizasyon işlemleri Gateway klonlama tekniği ile yapılarak floresans mikroskopta gözlemlenmiştir (Kaya, 2009).

2.5 cDNA'ların Gerçek Zamanlı PZR analizi

Toplanan kök ve yaprak örneklerinden toplam RNA, RNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak elde edilmiş ve Genomik DNA kalıntıları, Dnase (Fermentas) enzimi muamelesiyle uzaklaştırılmıştır. RNA'lardan cDNA eldesi için cDNA sentez kiti (Fermentas) kullanılmıştır. Üç tekrarlı bağımsız gerçek zamanlı PZR analizi için Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) ve iQ5 RT-PCR cihazı (Bio-rad) kullanılmıştır. Referans gen olarak Beta actin kullanılmıştır . Primer dizileri aşağıdaki gibidir. Beta vulgaris actin primerler dizileri: BvACT1RTF-AGACCTTCAATGTGCCTGCT ve BvACT1RTR-TCAGTGAGATCACGACCAGC. *B. maritima* MTP 10 primer dizileri: BmMTP10RTF-ACGAGCATACTTTTCGGTTCCCA ve BmMTP10RTR-ACTTCCTGGAGTTGCTCGAGCTTT. *B. maritima* MTP 11 primer dizileri: BmMTP 11RTF-AAGGCTGTACAAGTGTGGGATTCG ve BmMTP11RTR-AGTGGATCCAGACCACAGCTCAAA. Karşılaştırmalı gen ekspresyonları Beta actine göre normalize edilmiştir. Sonuçların analizi için, Pfaffl modeli kullanan Bio Rad iQ5 cihazının programı kullanılmıştır. Sıfırıncı saat gen ekspresyonları, referans noktası olarak alınarak, her 3. saatte ki karşılaştırmalı gen ekspresyon seviyeleri de bu referans noktasına göre (1'e sabitlenerek) hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 Mangana toleransı olan BmMTP10 ve BmMTP11 in belirlenmesi

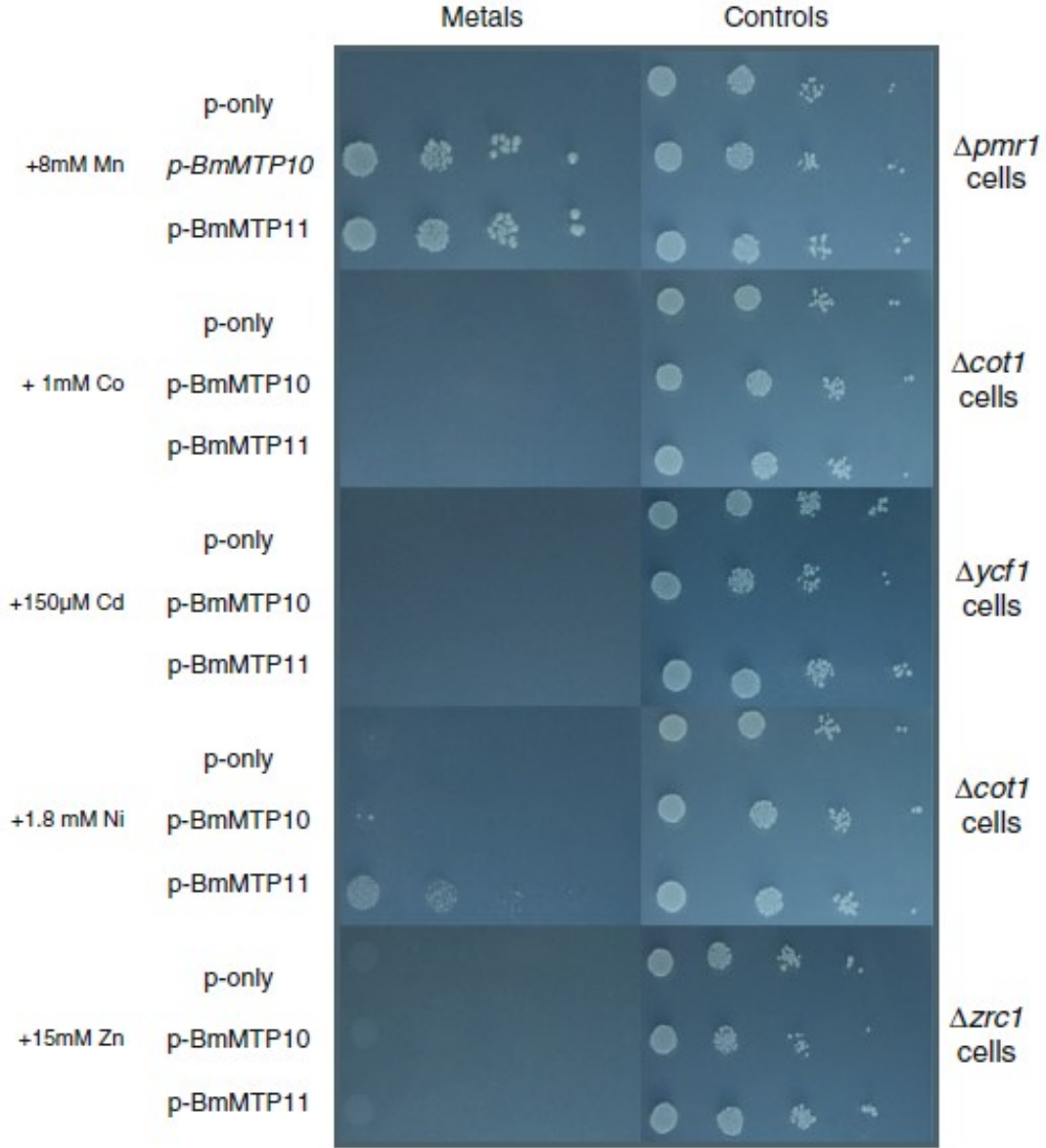
B. maritima dan Mn^{2+} tolerans genini belirlemek için, Mn^{2+} duyarlı maya türü olan $\Delta pmr1$ de *B. maritima* cDNA kütüphanesini taradık. PMR1 Mn^{2+} ve Ca^{2+} yi golgi aparatına yüklemeye ilişkili P-tipi ATPase ailesinin bir üyesidir (Lapinskas vd. 1995; Mandal vd. 2000). Maya hücreleri PMR1 den yoksundur bu sebeple büyüme ortamlarında ki yüksek Mn^{2+} konsantrasyonlarına hassastır. Maya taramalarında sadece iki koloni toksik seviyelerdeki Mn^{2+} da büyüyebildi. İkinci transfer deneyinde Mn^{2+} tolerans fenotipi konfirme edildi. Konformasyon deneyi, bu iki genin maya hücrelerine 8 mM Mn^{2+} konsantrasyonuna kadar direnç verdiğini gösterdi (Şekil 1).

Evrimsel ve sekans analizlerinden sonra cDNA kütüphanesinden izole edilen bu iki gene sırasıyla *A. thaliana* da homologları olan AtMTP10 ve AtMTP11 gibi BmMTP10 ve BmMTP11 ismi verildi. Sekans analizleri BmMTP10 un açık okuma bölgesinin (ORF) 948 nukleotidden oluştuğunu ve proteine çevrilmiş 316 amino asid içerdiğini gösterdi. BmMTP10 karşılığı olan nukleotid sayısı 972 ve amino asid sayısı 324 tür.

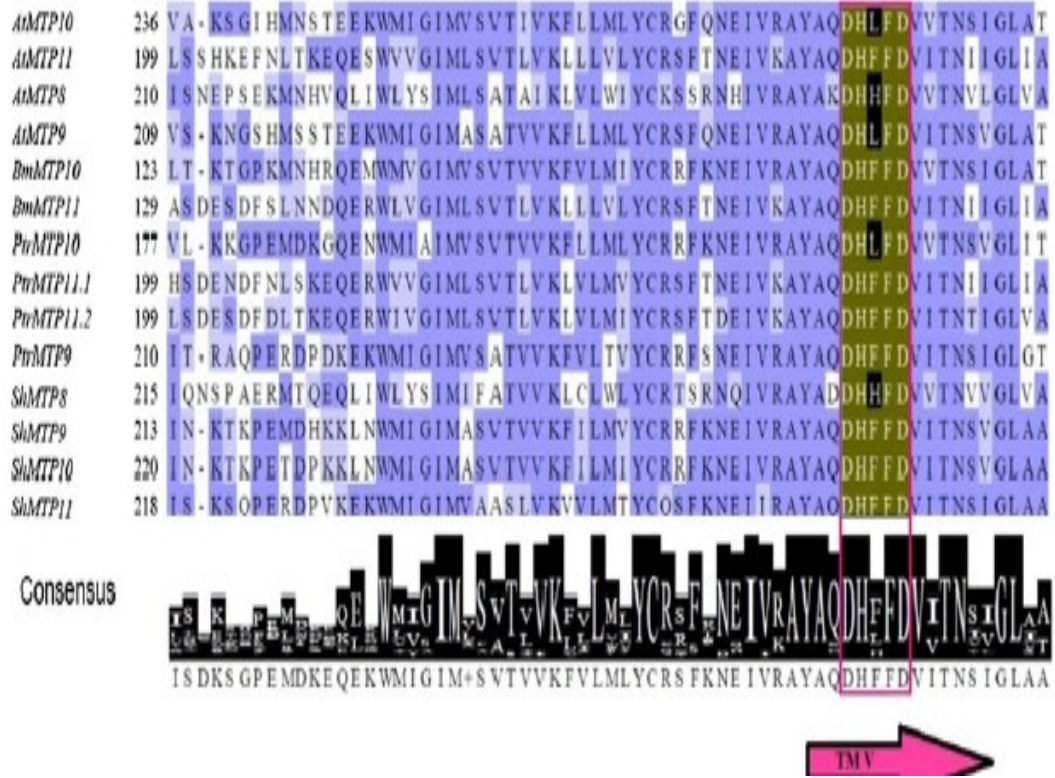
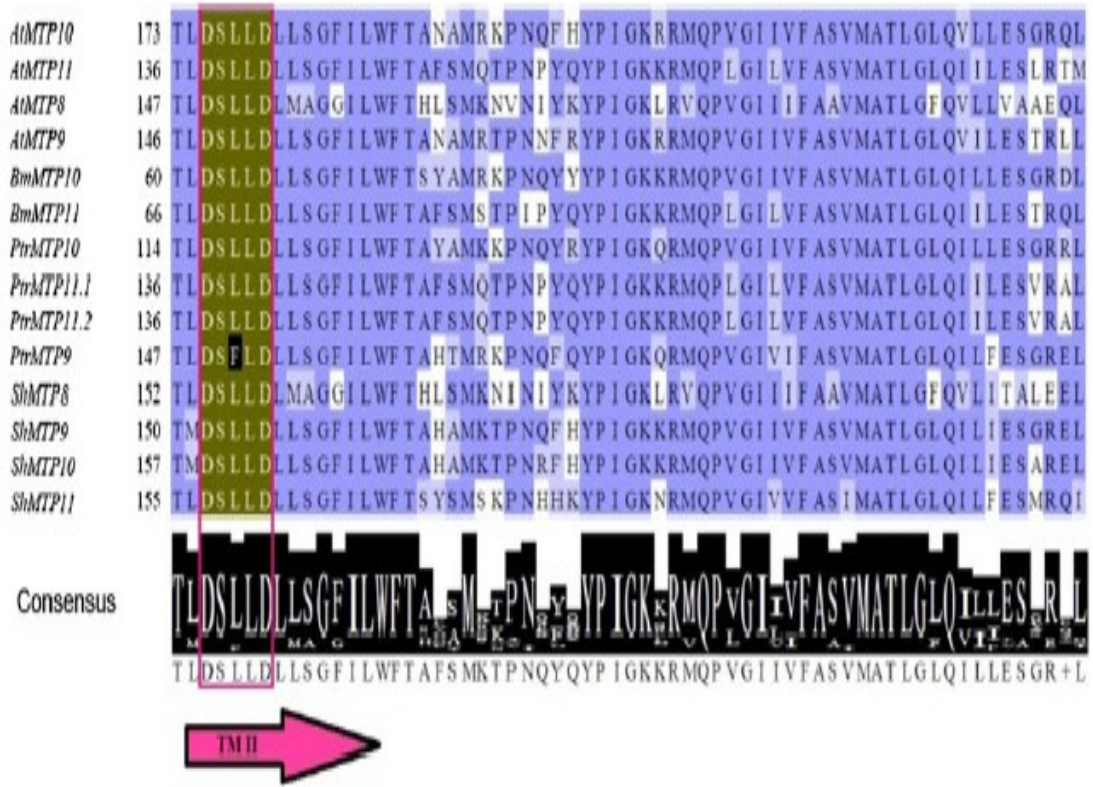
BmMTP11 proteininin benzer fonksiyonlu akrabalarını bulmak için BLASTP programından yararlanıldı. BmMTP10 ve BmMTP11 in yakın akrabaları amino asid dizisi açısından karşılaştırıldı. Çoklu dizi analiz sonuçlarına göre, BmMTP10 ve BmMTP11 korunmuş amino asid domainleri içerdiği ve ayrıca bunların CDFs protein ailesinin üyelerinde olduğu tesbit edildi (Şekil 2).

BmMTP10 ve BmMTP11 in metal substrat seçiciliğini anlamak için, BmMTP10 ve BmMTP11 in diğer divalent katyonlar ile metal toleransı sağlayıp sağlayamayacağı test edildi. Analizler için farklı maya mutant ırkları kullanılarak, devamlı çalışan promotör kontrolü altında BmMTP10 ve BmMTP11 ifadenmesi ile boş vector pAG426GDP transforme edilmiş hücrelerin büyüme sonuçları karşılaştırıldı. Şekil 1 de görüldüğü üzere bu iki gen Mn^{2+} sensitif fenotipin büyümesini sağladı. Bu genler toksik Co^{2+} , Cd^{2+} ve Zn^{2+} ye karşı toleranslı değildi. Sadece BmMTP11 proteini toksik nikel kısmen tolerans gösterdi (1.8mM). Bu sonuçlar gösteriyor ki iki transpotırda Mn^{2+} a karşı yüksek spesifikliğe sahiptir.

BmMTP10 ve BmMTP11 in amino asid sekansları içinde bulunan DXXXD motifi Mn-CDF ailesinin üyelerinde bulunmaktadır (Montanini vd. 2007). BmMTP10 sekansı PtrMTP10, ShMTP9 ve AtMTP10 ile yüksek homoloji göstermiştir. Ek olarak BmMTP11 sekansının PtrMTP11 ve AtMTP11 ile yüksek benzerlikte olduğu saptanmıştır. BmMTP11 ve BmMTP10 arasında da %67 oranında benzerlik saptandı. NJ filogenetik analizler için bir çoklu sekans dizisi içeren 12 farklı amino asid sekansı kullanıldı (Şekil 3). Bu analiz sonucu BmMTP10 ve BmMTP11 in evrimsel mesafeyi baz alarak 2 farklı küme içinde olduğu görülmüştür.

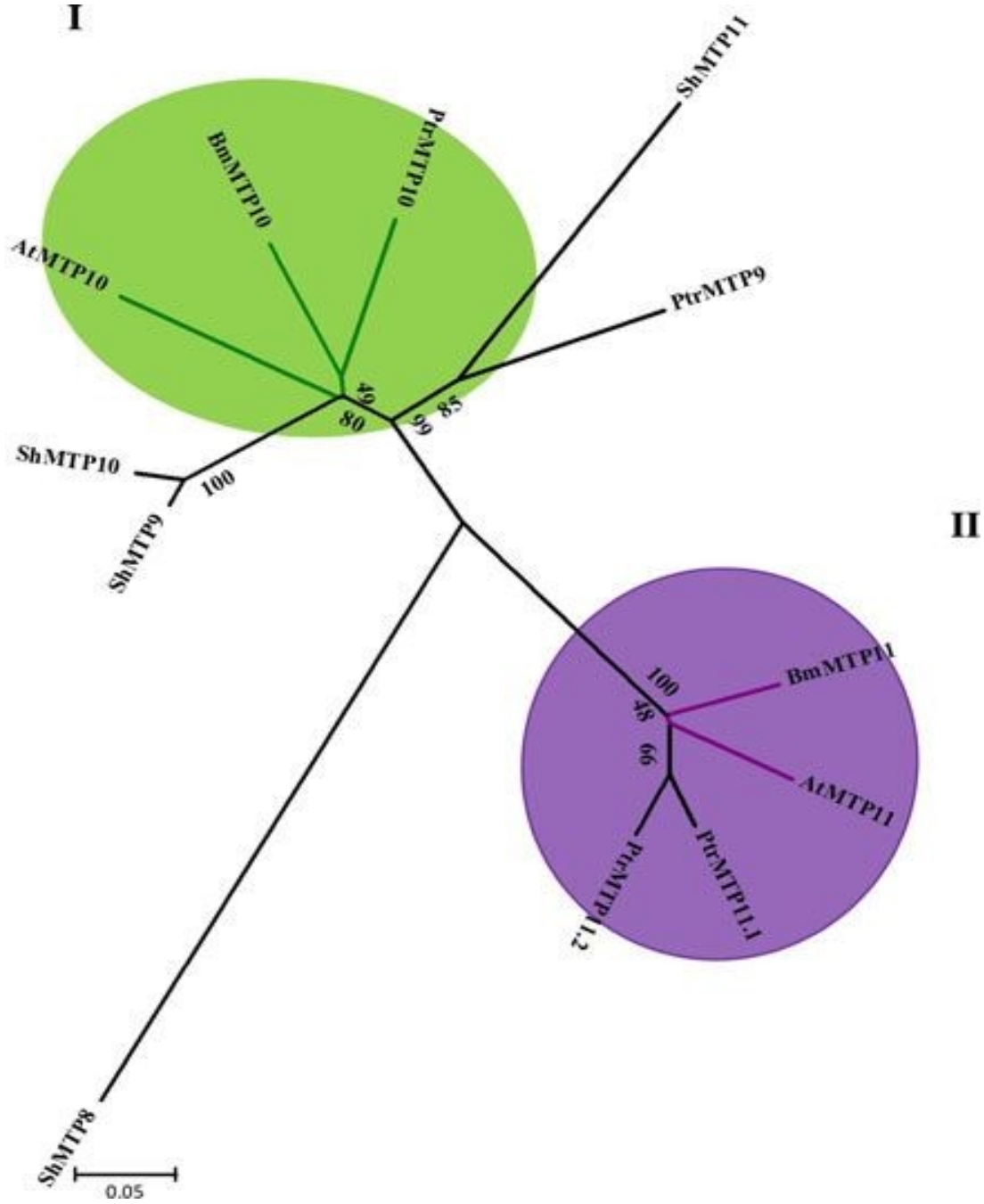


Şekil 1. BmMTP10 ve BmMTP11in maya hücreesindeki fenotipleri. Maya hücreleri boş vektöre (p-only) veya p-BmMTP10 ya da p-BmMTP11 transforme edildi ve dört seri seyreltme yapılarak (0.2, 0.02, 0.002, ve 0.0002, OD600) fazla miktarda metal iyonu içeren SD ortamına spotlama yapıldı. Platelere 30°C de 5 gün inkübe edildi ve fotoğraflandı.



Şekil 2. BmMTP10 ve BmMTP11 in diğer Mn-MTP proteinleri ile korunmuş bölgelerini gösteren amino asid sekansları. Aynı kolondaki aynı renkler BmMTP10 ,BmMTP11 ve Mn-

proteinlerinin arasındaki korunmuş-ortak amino asitleri gösterir. Korunmuş-ortak amino asit sekansı vurgulanmış ve TMII ve TMV domainleri sırasıyla işaretlendi. Tahmin edilen TM domainleri SOSUI web hizmeti kullanılarak tespit edildi.

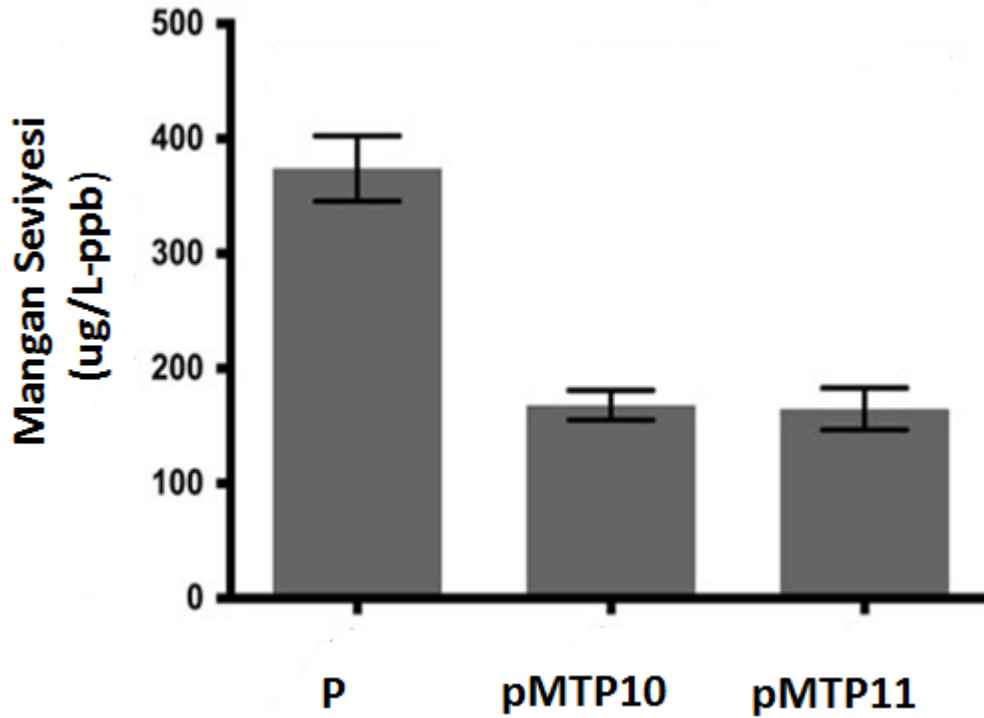


Şekil 3. Mn-MTP nin filogenetik ağacı. Komşu birleşme filogenetik ağaç baz alınarak MEGA5 ile çoklu amino asit dizisi oluşturuldu. Kümeler BmMTP10 ve BmMTP11 e mesafece yakın

olmasına göre mor ve yeşil olmak üzere renklerle gösterilmiştir. BmMTP11 ve BmMTP10 a en yakın olan proteinler de aynı dallanma hizası rengiyle işaretlenmiştir. Skala barları her bir bölgedeki 0,05 amino asit yer değiştirmesinin evrimsel uzaklığını göstermektedir.

3.2 BmMTP10 ve BmMTP11 in ifadenmesi

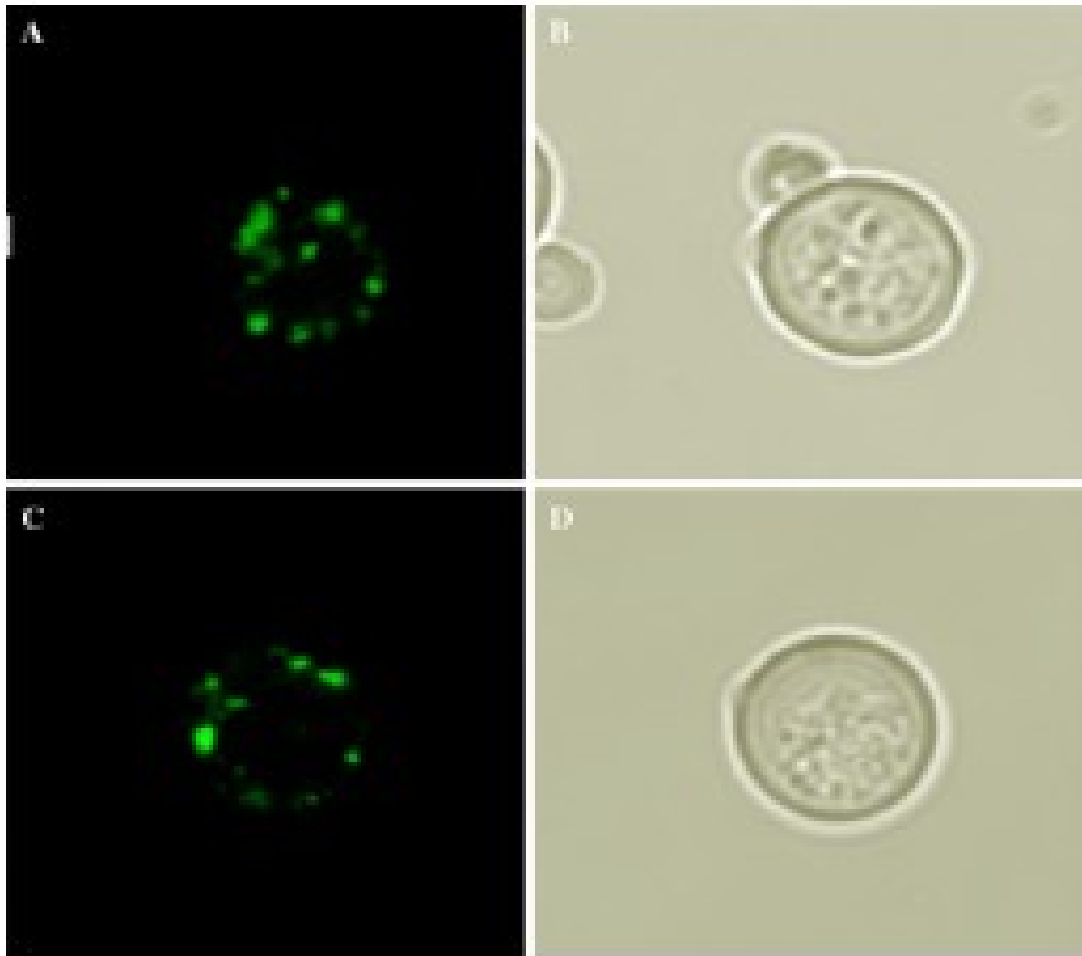
Literatürde, metal detoksifikasyonunda membrane proteinlerinin hücre içi metal seviyesini düşürerek fonksiyon göstermesi ile ilgili bir çok örnek bulunmaktadır (Mizuno vd. 2005). BmMTP10 ve BmMTP11 proteinlerinin her ikisinde TM (trans membrane) domaini içerdiği için metalin dışarı taşınmasında fonksiyon gösterdiği düşünüldü. Bu sebeple hücre BmMTP10, BmMTP11 ve boş vektörü içeren mayaların hücre içi Mn^{2+} seviyeleri ICP-MS ile analiz edildi. Şekil 4 te görüldüğü üzere; PAG426GPD boş plasmid ile transforme edilen $\Delta pmr1$ hücrelerinde BmMTP10 ve BmMTP11 ile transforme edilen hücrelere göre belirgin bir Mn^{2+} birikimi gözlemlendi. BmMTP10 ve BmMTP11 in $\Delta pmr1$ hücreleri içinde ifadenmesiyle Mn^{2+} seviyesi boş vektör hücrelerine karşın sırasıyla %55 ve %56 oranında düştü. Bu sonuçlar, BmMTP10 ve BmMTP11 aşırı ifadenmesi sayesinde hücre içi Mn^{2+} seviyesinin düşürülmesinde rolleri olduğunu ortaya koydu.



Şekil 4. BmMTP10 ve BmMTP11 hücre içi mangan seviyeleri. 30°C'de 48 saat (pBmMTP10 ya da p-BmMTP11 hücreleri için) ya da 30°C'de (p-only hücreleri için) 1mM Mn^{2+} ilave edilmiş SD ortamında büyütülen $\Delta pmr1$ maya hücrelerinde hücre içi mangan konsantrasyonu. Hücreler kontrol olarak boş vektör ile ya p-BmMTP10 ya da p-BmMTP11 vektör ile transforme edildi. Barlar ortalama +/-SEM mangan konsantrasyonunu temsil eder.

3.3 BmMTP10 ve BmMTP11 lokalizasyonu

BmMTP10 ve BmMTP11 tahmin edilen beş TM domainleri ile membran proteini gibi gözükmekteydi. Bu nedenle bu proteinlerin hücresel lokalizasyonları yapıldı. Her iki proteinde C-terminal bölgelerinden GFP ile lokalizasyon deneyi için işaretlendi. BmMTP10 ve BmMTP11 in hücre içindeki ifadelenenmesinin C-terminal GFP-füzyon düzenlenmesi için mikroskop analizleri yapıldı ve maya golgi lokalizasyon proteini olan Pmr1p (Mandal vd. 2003) ve Gyp1p (Du ve Novick 2001) in noktali modeline benzer sonuçlar elde edildi. Sonuçlar BmMTP10 ve BmMTP11 in lokalizasyonunun golgi aygıtının lokalizasyonuna benzerlik gösterdiğini ortaya koydu (Şekil 5).

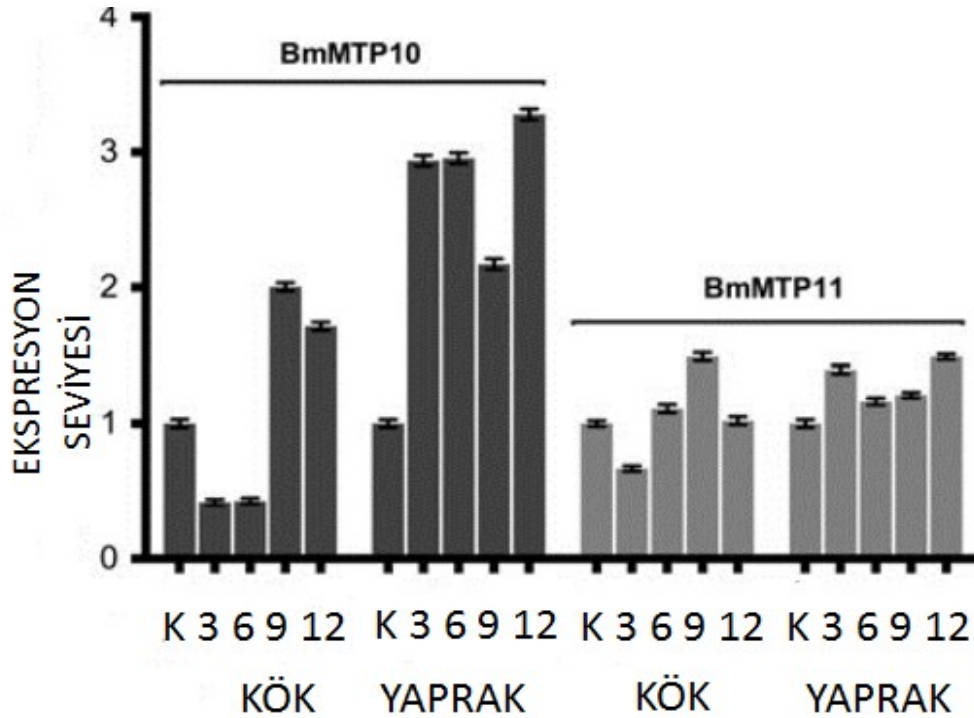


Şekil 5: BmMTP10 ve BmMTP11 in maya hücrelerinde lokalizasyonu. BmMTP10: GFP ve BmMTP11: golgi aygıtını anımsatan noktali bir model olarak lokalize olan GFP füzyon proteini. InvSc1 maya hücrelerinin ifadelenenmesinin Konfokal lazer tarama mikroskop görüntüsü. BmMTP10: GFP (a) ve BmMTP11: GFP (c) indüksiyondan 5 saat sonra

performans gösterdi. Parlak-alan görüntüsü (b, d) sırasıyla a, c de gösterilen hücrelerin görüntüsü.

3.4 BmMTP10 ve BmMTP11 in ifadenenme analizleri

Bazı çalışmalarda abiotic stres tolerans genleri transkripsiyonel seviyede indüklenme gösterir (Nakashima vd.2007; Sunkar vd. 2003). Bu bağlamda *B. maritima* bitkilerinin 2 mM Mn^{2+} muamelesine maruz kaldığında transkripsiyonel seviyede bir indüklenmeye maruz kalıp kalmadığı analiz edildi. Kantitatif gerçek zamanlı PZR (Q-RTPCR) yöntemi kökte ve yapraktaki transkripsiyonel seviyedeki cevabı analiz etmek amacıyla kullanıldı. İki milimolar Mn^{2+} a maruz bırakılan bitkideki BmMTP10 un kökte ve yapraktaki transkripsiyon seviyesinde dinamik düzenli bir model gösterdi. BmMTP10 un kök hücrelerinde ifadenenme seviyesi 9 saat muameleden sonra iki misli indüklendi. Yaprakta ise üç saatlik bir muameleden sonra indüklenme yaklaşık üç katına çıktı ve sabit kaldı. Buna karşın; kök ve yapraktaki dokularda BmMTP11 in ifadenenme seviyesinde kayda değer bir değişme gözlenmedi (Şekil 6).



Şekil 6. *Beta maritima* da BmMTP10 ve BmMTP11 in kök ve yapraktaki ifadenenmesi. Bitkiler 12 saat (bitkiler her 3 saatte bir toplandı) 2mM Mn^{2+} a maruz kaldı. cDNA , kontrol grubu olarak Mn^{2+} a maruz kalmadan önce kök ve yapraklarda toplandı. Bütün ifadenenme

seviyeleri BvACT1 (housekeeping) geni ile normalize edildi. Transkript seviyesinin kat-değişim değeri her dört durumdada ilişkili kontrol grubu hesaplandı. Barlar kontrollerle ilgili transkriptte yaklaşık +/- SEM fold-change değerlerini gösterir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerde hücredeki yüksek metal konsantrasyonunu düşürmeye dayalı 3 metal tolerans mekanizması bulunmaktadır. İlk ve en çok bilinen mekanizma plazma membranına gömülü trasport proteinlerle hücreden fazla metalin uzaklaştırılmasıdır (Kim vd. 2004; Persans vd. 2001). Bununla birlikte bu güne kadar hiçbir TM proteininin Mn^{2+} dışı atımında rol oynadığı tespit edilmemiştir. İkinci mekanizma ise, daha önce Mn^{2+} detoksifikasyonunda rol oynadığı bilinen AtCCX3, ShMTP ve AtCAX2 gibi vakuolde lokalize olan trasportörlerle fazla metali vakuolde toplayan mekanizmadır (Delhaize vd. 2003; Hirschi vd. 2000; Morris vd. 2008). Son mekanizma ise; PtMTP11.1 ve AtMP11 proteinlerinin yaptığı vesikül bağlantılı eksitoz ile manganın atılımıdır (Peiter vd. 2007).

Bu çalışmada *B. maritima* da Mn^{2+} transport proteini kodlayan iki MTP tespit edildi ve bu genler mayada ifadelendiğinde aşırı Mn^{2+} seviyelerine tolerans gösterdiği görüldü (Şekil 1). Metal tolerans deneyleri çeşitli mutantlarda gerçekleştirildi ve bu iki gen Co^{2+} , Cd^{2+} ve Zn^{2+} ye karşın kayda değer bir Mn^{2+} toleransı sağladı. Ayrıca $\Delta Cot1$ maya hücreleri BmMTP11 ile transforme edildi ve kısmen zayıf bir Ni^{2+} toleransı gözlemlendi.

BmMTP10, BmMTP11 ve diğer Mn-CDF proteinleri arasındaki sekans benzerliği analizlerinde PtrMTP10 (%83 amino asid benzerliği) ve AtMTP10 (%80 amino asid benzerliği) un önemli derecede BmMTP 10 a benzediği görülmüştür. Ek olarak AtMTP11 (%86 amino asid benzerliği) in BmMTP11 ile yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. Karşılaştırmalı protein analiz sonuçları Mn-CDF ailesi içindeki bulunan DXXXD motifinin, BmMTP10 ve BmMTP11 in içinde olduğunu göstermiştir (Şekil 2) (Montanini vd. 2007). Filogenetik ağaç grup1 in BmMTP10 ile yakınlığını ve grup 2 nin BmMTP11 ile yakınlığını işaret etmektedir (Şekil 3).

Önceki çalışmalarda, mangan ya plasma membranından dışarı ya golgi aygıtına direkt atılımla ya da AtMTP de gösterildiği gibi vezikül yardımcı eksositoz ile hücre dışına atıldığı gösterilmişti (Peiter vd. 2007). Bu çalışmada da manganın hangi yolla atıldığını anlamak için C-terminali işaretlenmiş BmMTP-GFP füzyon proteinleri mayada ifadelendi ve iki proteininde golgi aygıtında lokalize olduğu ve metal atılımının golgi üzerinden yapıldığı gözlemlendi.

B.maritima ya 2 mM Mn^{2+} ilavesinden sonra BmMTP10 ve BmMTP11 in gen ifadelenme seviyeleri analiz edildi. BmMTP10 un hem kökte hem de yaprakta gen ifadelenme seviyesi indüklendi ancak aynı işi yapan Arabidopsis ATMTP11 geninde tam tersi

sonuçlar gözlemlenmişti. BmMTP11 in ifadelene seviyesinde ise toksik Mn²⁺ ile mumelesi ile bağlantılı hiçbir düzenleme görülmedi. Yaptığımız in vivo çalışma sonuçları, iki proteinin mangan tolerans rollerinin olduğunu göstermesine rağmen transkript seviyesi Mn²⁺ toksisitesinin toleransında direk rollerinin olmadığını gösterdi.

Maya (Durr vd.1998) ve memeli hücrelerinde (Kaufman vd. 1994) yapılan çalışmalarda Mn²⁺ in N- ve O-bağlı protein glikolizasyonunda esansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir. Dahası esas görevi Mn²⁺ detoksifikasyonunun olan PMR1 pompası, glikolizasyon için Mn²⁺ sağlamaktadır (Durr vd. 1998). Mayada ifadelenen BmMTP10 ve BmMTP11in Mn²⁺ toleransı sağladığı ve golgi aygıtında lokalize olduğu gözlendi fakat bunların toksik Mn²⁺ konsantrasyonunun bitkide ifadelene seviyesinde belirgin bir düzenleme gözlenemedi. Tahminen BmMTP10 ve BmMTP11 glikolizasyon prosesi için Mn²⁺ iyonu sağlamak amacıyla golgi membranında ifadelendi ve mayada ki PMR1 transportir ile benzer şekilde fazla Mn²⁺ detoksifikasyonunu sağladı.

Özetle *B. maritima* dan ilk Mn²⁺ tolerans proteini kodlayan iki gen tanımladık ve karakterize ettik. Proteinlerin golgi aygıtında lokalize edilerek, salgı yolağındaki bir atılım mekanizmasını kullanarak mangan toleransında fonksiyonları olduğu gösterildi. İleriki çalışmalarda, bu proteinler kullanılarak toksik seviyede mangan içeren topraklarda bitkiler yetiştirilebilir ve fitoremidasyon çalışmaları ile topraktaki ağır metallerin temizlenmesi sağlanabilir.

Kaynaklar

- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inzé D Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO Journal* 10 (7):1723, (1991)
- Burke, D., D. Dawson, and T. Stearns. *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. CSHL Press, NewYork,1994.
- Cailliatte R., Schikora A., Briat JF., Mari S., Curie C., High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions, *The Plant Cell Online* 22 (3):904, (2010).
- Delhaize E., Kataoka T., Hebb DM., White RG., Ryan PR., (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance, *The Plant Cell Online* 15 (5):1131, (2003).
- Delhaize E., Gruber BD., Pittman JK., White RG., Leung H., Miao Y., Jiang L., Ryan PR., Richardson AE .,A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance. *The Plant Journal* 51 (2):198-210, (2007).
- Doney DL .,Broadening the genetic base of sugarbeet, *J Sugar Beet Res* 30:209-219, (1993).
- Du LL¹, Novick P.**, Yeast rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p, ***Mol Biol Cell***. 12(5):1215-26,2001.
- Durr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK, The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* 9(5):1149-62,(1998).**
- Gonzalez A., Lynch JP., Effects of manganese toxicity on leaf CO₂ assimilation of contrasting common bean genotypes, *Physiologia Plantarum* 101 (4):872-880, (1997).
- Hänsch R., Mendel RR., Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Current Opinion in Plant Biology* 12 (3):259-266, (2009).
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L., and Wagner, G.J. Expression of Arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124, 125–133, 2000).
- Kaufman RJ., Swaroop M., Murtha-Riel P., Depletion of manganese within the secretory pathway inhibits O-linked glycosylation in mammalian cells, *Biochemistry* 33 (33):9813-9819, (1994).

- Kenten RH., Mann PJ., The oxidation of manganese by plant extracts in the presence of hydrogen peroxide, *The Biochemical journal* 45 (3):255-263, (1949).
- Koike S., Inoue H., Mizuno D., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa NK., OsYSL2 is a rice metal nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem, *The Plant Journal* 39 (3):415-424, (2004).
- Korshunova YO., Eide D., Gregg Clark W., Lou Guerinot M., Pakrasi HB., The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* 40 (1):37-44, (1999).
- Lanquar V., Ramos MS., Lelievre F., Barbier-Brygoo H., Krieger-Liszky A., Krämer U., Thomine S., Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency, *Plant physiology* 152 (4):1986, (2010).
- LaLi X., Chanroj S., Wu Z., Romanowsky SM., Harper JF., Sze H. A distinct endosomal Ca²⁺/Mn²⁺ pump affects root growth through the secretory process, *Plant physiology* 147 (4):1675, (2008).
- Marschner H., (1995) Mineral nutrition of higher plants, ed:Petra M., vol:3 ,Academic Press, San Diego, (2012). Pp:200.
- Mandal, D, Woolf, TB, Rao, R: Manganese selectivity of Pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue Gln783 in transmembrane segment 6, Residue Asp778 is essential for cation transport, *J Biol Chem* 2000 275:23933–23938, (2000).
- Mandal D, Rulli SJ, Rao R: Packing Interactions between transmembrane helices alter ion selectivity of the yeast Golgi Ca²⁺ /Mn²⁺ -ATPase Pmr1. *J Biol Chem* 278:35292–35298, 2003.
- Maze P .,The Role of Special Elements (Boron, Copper, Zinc, Manganese, Etc.) in Plant Nutrition, *Annual Review of Biochemistry* 5 (1):525-538, (1936).
- Mills RF., Doherty ML., Lopez-Marques RL., Weimar T., Dupree P., Palmgren MG., Pittman JK., Williams LE. ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in *Arabidopsis*, *Plant physiology* 146 (1):116-128, (2008).
- Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N., Obata, H.,. Cloning of three ZIP/ NRAMP transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺ — transport abilities. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 793–801,(2005).
- Morris J., Tian H., Park S., Sreevidya CS., Ward JM., Hirschi KD.,AtCCX3 is an *Arabidopsis* endomembrane H⁺-dependent K⁺ transporter, *Plant physiology* 148 (3):1474 ,(2008).
- Nakashima K., Tran L. S., Van Nguyen D., Fujita M., Maruyama K., Todaka D., et al. ,Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* 51 617–630 (2007).

- Ono T-A., Noguchi T., Inoue Y., Kusunoki M., Matsushita T., Oyanagi H., X-ray Detection of the Period-Four Cycling of the Manganese Cluster in Photosynthetic Water Oxidizing Enzyme, *Science* 258 (5086):1335-1337, (1992).
- Pedas P., Ytting CK., Fuglsang AT., Jahn TP., Schjoerring JK., Husted S., Manganese Efficiency in Barley: Identification and Characterization of the Metal Ion Transporter HvIRT1, *Plant physiology* 148 (1):455-466, (2008).
- Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pedas P, Husted S, Maathuis FJM, Blaudez D, Chalot M, Sanders D. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Plant biology*, 104(20): 8532–8537,(2007)
- Persans M. W., Nieman K., and Salt D.E., Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *PNAS*, vol. 98 u no. 17 u 9995–10000, (2001)
- Sillanpaa M., Micronutrients and the Nutrient Status of Soils: A Global Study, *FAO Soil Bulletin No. 48*, FAO/ Finnish International Development agency, Rome, (1982).
- Stevanato P., Biaggi MD., Skaracis GN., Colombo M., Mandolino G., Biancardi E., The sea beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*) of the Adriatic coast as source of resistance for sugar beet. *Sugar Tech* 3 (3):77-82, (2001).
- Sunkar R., Bartels D. and Kirch H., Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance, *The Plant Journal*, **Volume 35**, **Issue 4**, pages 452–464, (2003).
- Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinot ML., Briat J-F., Curie C., IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth, *The Plant Cell Online* 14 (6):1223-1233, (2002).
- Wu Z., Liang F., Hong B., Young JC., Sussman MR., Harper JF., Sze H., An endoplasmic reticulum-bound $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn^{2+} stress, *Plant physiology* 130 (1):128, (2002).
- Xue J., Li J., Bi D., Ma A., Cheng P., Effects of nitrate accumulation of soil on growth and manganese concentration of pepper in protected cultivation, *Journal of Nanjing Agricultural University* 18:53-57, (1995).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. HÜSEYİN ÇAĞLAR KARAKAYA
Proje No:	113Z401
Proje Başlığı:	Deniz Pancarı Bitkisinde Mangan Toleransında Rol Oynayan Genlerin Tanımlanması
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2013 - 01/09/2014
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	23353.6
Öz:	Bir mikronutrient olan mangan, bitkilerde birçok enzimin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Manganın aşırı birikmesi toksik olmaktadır. Metal tolerans proteinleri (MTP), katyon difuzyon proteinleri (CDF) familyasından olup hücredeki fazla metali dışarı pompalayarak metal dengelenmesinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada, deniz pancarı bitkisinden 2 MTP proteininin mayada aşırı ifadenmesi, fazla mangan seviyesini düşürerek tolerans sağlamıştır. Genler Golgide lokalize olmuştur. Bu genlerin Arabidopsis MN-CDF AtMTP11 ile homolog olması bitkiler aleminde evrimsel olarakda korunduğunu göstermektedir.
Anahtar Kelimeler:	Deniz pancarı, mangan, maya
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır