



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Buğday (*Triticum aestivum* L.) Proteomik Çalışmalarında Yeni
Nesil İki Boyutlu Sıvı Kromatografi (2D-LC) Sistemi
Kullanımı**

**Dilara MAYTALMAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Programı**

**I. Danışman
Doç. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ
II. Danışman
Dr. Semra HASANÇEBİ**

Haziran, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Buğday (*Triticum aestivum* L.) Proteomik Çalışmalarında Yeni
Nesil İki Boyutlu Sıvı Kromatografi (2D-LC) Sistemi
Kullanımı**

**Dilara MAYTALMAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Programı**

**I. Danışman
Doç. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ
II. Danışman
Dr. Semra HASANÇEBİ**

Haziran, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 14/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Muammer ÜNAL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Serap ÇAĞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Orhan KÜÇÜKER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 6964 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

İstanbul Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında bana yüksek lisans yapma olanağı tanıyan saygı değer hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni destekleyen ve rehberlik eden birinci tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Gül Cevahir Öz'e ve çalışmanın TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmesini sağlayan, bilgi ve tecrübeleri ile her aşamada sonsuz bir sabır, özveri ve inançla yanımda olan, yardım ve katkılarını esirgmeden bana yol gösteren ikinci tez danışmanım ve çok kıymetli hocam Dr. Semra Hasançebi'ye teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmemde benden bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarı çalışanlarından Dr. Fahriye Ertuğrul'a, ve çalışmamı kolaylaştıran Rahmi Büyükkeskin'e, ayrıca Dr. Yavuz Öztürk'e ve Dr. A.Tarık Baykal'a teşekkür ederim. Ayrıca, her türlü destekleri ve yardımları ile hep yanımda olan arkadaşlarım, Abdülmecid Gökçe'ye, Begüm Gizem Gözen'e, ve özellikle de Irmak Taşanyürek'e ve Taylan Yıldız'a yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan, beni maddi ve manevi olarak her yönden destekleyen ve hiçbir fedakarlığı esirgemeyen annem Seçkin Maytalman'a, babam Adnan Maytalman'a, abim Emre Maytalman'a ve yengem Zinnur Maytalman'a çok teşekkür ederim. Bu yoğun çalışma sürecinde bana göstermiş oldukları anlayıştan ve sabırdan dolayı tüm aileme minnettarım.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarı'nda yürütülmekte olan TÜBİTAK tarafından desteklenen 109T293 numaralı COST projesi kapsamında gerçekleştirilmiş ve İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından 6964 no'lu tez projesi olarak da desteklenmiştir

Haziran, 2011

Dilara MAYTALMAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. GENOMDAN PROTEOMİĞE	2
2.2. PROTEOMİĞİN SUNDUĞU OLANAKLAR.....	9
2.3. BİR PROTEOMİK ÇALIŞMADA AŞAMALAR	13
2.3.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması	14
2.3.2. Proteinlerin İki Boyutlu (2D) Ayrımı.....	14
2.3.2.1. Proteinlerin 2D-PAGE Yöntemiyle İki Boyutlu Ayrımı	14
2.3.2.2. Proteinlerin 2D-LC Yöntemiyle İki Boyutlu Ayrımı.....	18
2.3.3. Proteinlerin Tanımlanması	20
2.3.3.1. Kütle Spektrometre (MS) Analizleri	21
2.3.3.2. Biyoinformatik.....	23
2.4. BİTKİLERDE PROTEOMİK ÇALIŞMALAR	24
2.5. BUĞDAY VE SARI PAS HASTALIĞI	28
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI.....	31
3.1.1. Bitki Materyali Hazırlığı	31
3.1.2. Protein İzolasyonu.....	31
3.1.2.1. TCA/Aceton Yöntemi ile Protein İzolasyonu.....	32
3.1.2.2. Mg/NP-40 Yöntemi:	33
3.1.3. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini	34
3.1.4. Proteinlerin Tek Boyutlu SDS-PAGE’de Analizi	35
3.1.4.1. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması.....	35
3.1.4.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi	37
3.1.4.3. Coomassie Boyama	37
3.1.5. Proteinlerin İki Boyutlu Ayrımı	38
3.1.5.1. Cam Malzemelerin Hazırlanması	38
3.1.5.2. Solüsyonların Hazırlanması.....	38
3.1.5.3. PF-2D Cihazının Hazırlanması	39
3.1.5.4. Protein Örneklerinin Hazırlanması	42
3.1.5.5. BCA Yöntemiyle Protein Miktar Tayini	42
3.1.5.6. Proteinin Örneğinin Yüklenmesi.....	43

3.1.5.7. I.Boyut Ayrımı	44
3.1.5.8. II. Boyut Ayrım	46
3.1.5.9. Kromotogram Verilerinin Analizi	47
3.1.5.10. PF-2D de Ayrılan I. ve II. Boyut Fraksiyonların Jelde Yürütülmesi ...	47
3.1.5.11. Gümüş Boyama	48
3.1.6. Proteinlerin Tanımlanması	49
3.1.6.1. Kütle Spektrometre Analizleri	49
3.1.6.2. Verilerin Analizi (Biyoinformatik)	50
3.2. BUĞDAYDA DAYANIKLILIK CEVABINDA ROL ALAN PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ	50
3.2.1. Bitki Materyali Hazırlığı	50
3.2.1.1. Patojen Kaynağı.....	52
3.2.1.2. Bitkinin Enfekte Edilmesi	52
3.2.1.3. Örnek Alınması	53
3.2.1.4. Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik Olarak Belirlenmesi	54
3.3. PROTEİN İZOLASYONU	55
3.4. PROTEİNLERİN İI BOYUTLU AYRIMI	55
3.5. PROTEİNLERİN TANIMLANMASI.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI	56
4.1.1. Protein İzolasyonu.....	56
4.1.2. Proteinlerin PF-2D Sisteminde İki Boyutlu Ayrımı.....	58
4.1.2.1. Tampon Optimizasyonu.....	58
4.1.2.2. Sisteme Yüklenecek Protein Miktarının Optimizasyonu	66
4.1.3. Verilerin Analizi	67
4.1.3.1. Sanal Jel Haritalarının Oluşturulması	67
4.1.3.2. Protein Profillerinin Karşılaştırılması.....	68
4.1.4. Kütle Spektrometre Analizleri.....	72
4.2. BUĞDAYDA DAYANIKLILIKTA ROL ALAN PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ.....	73
4.2.1. Bitkinin Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik Ve Makroskopik Olarak Belirlenmesi	74
4.2.2. Protein İzolasyonu ve PF-2D Sisteminde İki Boyutlu Ayrım.....	76
4.2.3. Biyolojik Tekrarların Karşılaştırılması	77
4.2.4. Enfekte ve Kontrol Örneklerinin Karşılaştırılması	80
4.3. KÜTLE SPEKTROMETRE ANALİZLERİ.....	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	82
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	105

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Omik teknolojiler.....	3
Şekil 2.2	: Buğday genomu dizileme projesinde yer alan ülkeler ve dizileyecekleri kromozomlar.....	4
Şekil 2.3	: Çeşitli organizmalarda genom büyüklüğü ve gen sayısı.....	5
Şekil 2.4	: Transkriptom çalışmalarında kullanılan teknolojiler.....	7
Şekil 2.5	: Santral dogma kuramının şematik gösterilişi.....	7
Şekil 2.6	: Bir genden farklı bir çok proteinin anlatımı.....	8
Şekil 2.7	: Proteomikteki teknolojik gelişimin tarihsel süreci.....	10
Şekil 2.8	: Aynı genom ve genlere sahip hücrelerin farklı ekspresyonu sonucu oluşan fenotipler.....	12
Şekil 2.9	: Bir proteomik çalışmanın evreleri.....	13
Şekil 2.10	: İzoelektrik odaklama prensibinin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.11	: 2D-PAGE’de proteinlerin iki boyutlu ayırım şeması.....	16
Şekil 2.12	: 2D-PAGE ile iki boyutlu ayrılan farklı protein örneklerinin karşılaştırılması.....	17
Şekil 2.13	: 2D-LC sistemi ile ayrılan farklı protein profillerinin karşılaştırılması.....	18
Şekil 2.14	: Kütle spektrometresinin çalışma prensibinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.15	: 1995-2005 yılları arasında, çeşitli organizmalarda yapılmış proteomik çalışmaların sunulduğu makalelerin sayısı.....	25
Şekil 2.16	: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar.....	28
Şekil 2.17	: Enfekte buğday yaprağında <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> sporlarının görünümü.....	29
Şekil 3.1	: Bradford yöntemiyle protein miktar tayininde mikropalakada BSA standart ve örneklerin yerleşimi.....	35
Şekil 3.2	: Tek boyutlu SDS-PAGE için düzeneğin hazırlanması.....	36
Şekil 3.3	: PF-2D Sistemi.....	40
Şekil 3.4	: Örneklerin PD-10 kolondan geçirilmesi.....	42
Şekil 3.5	: I. boyut kolonunda proteinlerin pI noktalarına göre ayırımı.....	45
Şekil 3.6	: Proteinlerin kolonda hareketi.....	46
Şekil 3.7	: Bitkilerin ekimi ve etiketlenmesi.....	51
Şekil 3.8	: Kullanılacak bitki materyalinin şematik gösterimi.....	51
Şekil 3.9	: Patojen sporlarının enfeksiyon için hazırlanması.....	52
Şekil 3.10	: Bitkilerin inokülasyonu.....	53
Şekil 4.1	: Protein izolasyonunda kullanılan 2 yöntemin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.2	: Ticari tampon ile PF-2D’de yapılan ayırım sonucu meydana gelen I. boyut pH gradienti.....	59
Şekil 4.3	: Barre ve Solioz (2006) makalesinde belirtildiği şekilde hazırlanan %10 polybuffer içeren eluent tamponu kullanılarak PF-2D’de yapılan ayırım sonucu elde edilen pH gradienti.....	60
Şekil 4.4	: %11 polybuffer içeren eluent tamponu kullanılarak PF-2D’de yapılan ayırım sonucu elde edilen pH gradienti.....	62
Şekil 4.5	: %12.5 polybuffer içeren eluent tampon kullanılarak PF-2D’de yapılan ayırım sonucu meydana gelen I. boyut kromatogramı.....	63
Şekil 4.6	: Ticari kit ve optimize edilen tamponlarla (start tampon, eluent tampon (%12,5 polybuffer)) oluşturulan pH gradientlerinin karşılaştırılması.....	65

Şekil 4.7	: Ticari kit ve optimize edilen tamponlarla yapılan ayırım sonucunda elde edilen farklı fraksiyonlara ait kromatogramların karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.8	: Farklı miktardaki proteinlerin PF-2D’de iki boyutlu ayırımı sonucunda oluşan fraksiyonların SDS-PAGE ile görüntülenmesi.....	66
Şekil 4.9	: PF-2D sisteminde farklı miktarlardaki proteinlerin I. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.10	: PF-2D’de iki boyutlu ayırımı yapılan örneklerin ProteoVue programında oluşturulan sanal jel haritaları.....	68
Şekil 4.11	: DeltaVue programında iki örneğe ait protein profillerinin karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.12	: DeltaVue programı ile iki örneğe ait 4.01-4.02 pH aralığındaki protein profillerinin üst üste çakıştırılarak karşılaştırılması.....	70
Şekil 4.13	: PF-2D’de ayırımı yapılan iki örneğe ait 5.24-5.55 pH aralığındaki protein piklerinin tek tek karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.14	: LC-ESI-MS/MS analizinde elde edilen sonuçlar.....	72
Şekil 4.15	: Yapılan inokulasyon çalışmalarında enfeksiyon cevabının mikroskopik olarak görüntülenmesi.....	75
Şekil 4.16	: Dayanıklı ve hassas çeşitlerin makroskopik görüntüsü.....	76
Şekil 4.17	: İzgi2001 de enfeksiyonun 72. saatinde alınan yaprak örneklerinden (enfekte ve kontrol) izole edilen proteinler.....	77
Şekil 4.18	: Kontrol grubuna ait pH gradientleri ve I. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.19	: Enfeksiyon grubuna ait pH gradientleri ve I. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.20	: 3 biyolojik tekrara ait II. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.21	: İki biyolojik tekrara ait 10. fraksiyondan seçilen 58,59,60 nolu proteinlerin ESI-MS/MS analiz sonuçları.....	79
Şekil 4.22	: Biyolojik tekrarların tek tek protein bazında karşılaştırılması.....	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Bitkilerde yapılan proteomik çalışmalar	27
Tablo 2.2	: Ülkelerin yıllara göre ürettikleri buğday miktarı	28
Tablo 3.1	: BSA standartlarının hazırlanması	34
Tablo 3.2	: BCA yöntemi	43
Tablo 3.3	: İzgi2001 çeşidinin özellikleri.....	50
Tablo 4.1	: Ticari tamponla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırımına ait rapor	59
Tablo 4.2	: %10 polybuffer içeren eluent tamponuyla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırma ait rapor örneği.....	61
Tablo 4.3	: %11 polybuffer içeren eluent tamponuyla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırma ait rapor örneği	62
Tablo 4.4	: %12.5 polybuffer içeren eluent tamponuyla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırma ait rapor örneği.....	64
Tablo 4.5	: 10 adet II. boyut fraksiyonundan LC-ESI-MS/MS ile tanımlanan proteinler	73
Tablo 4.6	: Enfekte ve kontrol örneklerinin karşılaştırılması sonucu LC-ESI-MS/MS analizi ile tanımlanan proteinler.....	81

SEMBOL LİSTESİ

APS	: Amonyumpersülfat
DTT	: 1, 4- Dithiothreitol
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
IAA	: İminodiasetik asit
MgCl₂	: Magnezyum klorür
NH₄HCO₃	: Amonyum bikarbonat
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
M	: Molar
mM	: Milimolar
MW	: Moleküler Ağırlık
m/z	: Kütle/yük
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florid
PVPP	: Polyvinilprolidon
Rpm	: Devir/dakika
xg	: Merkez kaç kuvveti
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	: Trikoloroasetik asit
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
V	: Volt
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

ÖZET

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) PROTEOMİK ÇALIŞMALARINDA YENİ NESİL İKİ BOYUTLU SIVI KROMATOĞRAFI (2D-LC) SİSTEMİNİN KULLANIMI

Proteom çalışmaları, bir biyolojik sistemde, belirli bir evrede mevcut biyolojik süreçlerde görevli olan tüm proteinlerin analiz edilmesine olanak sağlar. Bu çalışmalar, özellikle bitkilerde son derece karmaşık olan biyotik/abiyotik stres toleransı cevabında etkin veriler ortaya koyması nedeniyle önemlidir. Ancak diğer organizmalarla karşılaştırıldığında bitkilerde proteomik çalışmaların son derece az olduğu görülmektedir. Bunun en önemli nedenleri bitkisel dokulardaki sert hücre çeperleri, çok çeşitli pigmentlerin ve sekonder metabolitlerin varlığı nedeniyle ortaya çıkan metodolojik sıkıntılardır. Sunulan tez çalışması kapsamında, yeni nesil teknolojilerden yararlanılarak bu sıkıntıların azaltılması ve bitkilerde proteomik çalışmaların yaygınlaştırılmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Proteom çalışmalarında çeşitli evrelerde bulunan farklı birçok hücrenin oluşturduğu dokuların parçalanması sonucunda meydana gelen protein karışımının ayrılması gereklidir. Protein karışımlarının ayırımında iki boyutlu jel (2D-PAGE) sistemleri günümüzde halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin önemli dezavantajları nedeniyle son yıllarda iki boyutlu sıvı kromatografi (2D-LC) sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler çok sayıda total protein örneğinin daha hızlı, güvenilir ve güçlü biçimde ayırımı sağlanabilmektedir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında bir 2D-LC sistemi olan PF-2D'nin bitki proteomik çalışmalarında kullanılmak üzere optimizasyonu yapılmış ve bu çalışmalar tamamlandıktan sonra da sistemin kullanılabilirliğini ortaya koymak üzere bir model çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla buğdayda, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* adlı biyotrofik mantarın neden olduğu sarı pas hastalığına dayanıklılıkta rol alan proteinlerin belirlenmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır. Enfeksiyonun 72. saatinde, kontrol ve enfekte bitkilerden yaprak örnekleri alınarak protein izolasyonu yapılmış, ardından proteinler PF-2D sisteminde iki boyutlu ayrılarak tek tek karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalarda farklı anlatım düzeyi gösteren proteinler LC-ESI-MS/MS ile tanımlanmışlardır.

SUMMARY

NEW GENERATION TWO DIMENSIONAL LIQUID CHROMATOGRAPHY (2D-LC) SYSTEM USING ON WHEAT (*Triticum aestivum* L.) PROTEOMICS STUDIES

Proteomic studies allow the analysis of all proteins which have a role in the biological process in a biological system at a particular phase. Proteomics is very important to produce the efficient data about extremely complex response against to the biotic/abiotic stress in plants. However in plants the number of the proteomic study is very low compared with other organisms because of their rigid cell walls, complex and a wide variety of secondary metabolites, pigments, proteases, polyphenols, polysaccharides, starch and lipids. In the present thesis is aimed to reduce the methodological restrictions by using the new technologies and contribute of the dissemination of the plant proteomics.

In a proteomic study, a protein mixture occurs as a result of disintegration of tissue which are composed of many different cells at different phases. First and most important step of proteomics is separation of all proteins in this mixture. Two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) are widely used for this step. But this method has lots of disadvantages such as loss of hydrophobic proteins, application difficulties, low reproducibility, take a long time vs. Therefore in recent year, two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) systems are developed to provide faster, reliable and powerful separation of large number of total protein samples. In the scope of the thesis PF-2D which is a 2D-LC system, is optimized for using the plant proteomic studies. After completion of the optimization studies, a model study carried out for demonstrate the utility of the system

For this purpose, a study on wheat was performed to determine of the proteins that have role on resistance mechanism against to yellow rust disease which is caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. At the 72. hours after inoculation, the leaf samples were harvested from infected and non-infected control plants to isolate total proteins. Afterwards the proteins are separated by PF-2D system and compared one by one. In this comparisons differentially expressed proteins were selected and identified by LC-ESI-MS/MS.

1. GİRİŞ

Proteom, canlı bir hücre, organel, doku veya organizmada gen anlatımı sonucu sentezlenen tüm protein türlerini kapsar. Proteomik sözcüğü ise bir biyolojik sistemdeki belirli bir koşulda ve belirli bir zamandaki her bir proteini tanımlamayı, gen anlatım profilini ortaya koymayı, hücre içi yerleşimini, aktivitesini, kontrol mekanizmalarını, transkripsiyon sonrası düzenlemelerini, moleküler etkileşimlerini, üç boyutlu yapısını ve işlevini belirlemeyi amaçlamaktadır (Hirano ve diğ., 2004; Finnie, 2006). Gelişen ve hızlanan proteom analizleri sonucu elde edilen veriler, herhangi bir koşulda *in vivo*'da anlatım yapan genlerin temel, yapısal ve işlevsel özelliklerini ortaya koymaktadır. Ayrıca genomik ve EST (Expressed Sequence Tag) veritabanlarının hızla genişlemesi de proteinlerin tanımlanmasında ve translasyon sonrası düzenlemeler sonucu ortaya konan protein profillerinin belirlenmesinde son derece yararlı olmaktadır. Proteomik, sunduğu bu önemli yararlar nedeniyle son yıllarda önemli bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak metodolojik sorunlar nedeniyle bitki proteomiği alanındaki çalışmalar diğer organizmalarla karşılaştırıldığında sınırlı kalmıştır. Ülkemizde ise proteomik çalışmalar son yıllarda yaygınlaşmaya başlamış olmakla birlikte bitki proteomiği alanında çalışan yalnız birkaç grup bulunmaktadır. Bu alandaki çalışmaların yaygınlaşması ve gerekli bilgi birikimine sahip kritik araştırmacı kitlesinin gelişmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

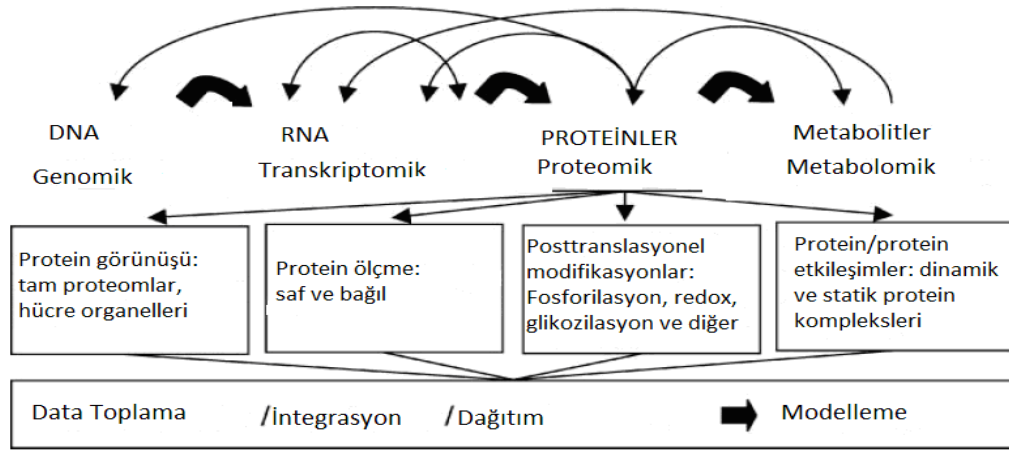
Sunulan tez çalışması bu ihtiyaç doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarla, yeni nesil 2D-LC sisteminin kullanımı optimize edilerek bitki proteomiği alanındaki metodolojik sıkıntıların azaltılmasına ve ülkemizde bu alandaki yetişmiş araştırmacı altyapısının oluşturulmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca bitki materyali olarak buğdayın kullanılması ile de büyük ve karmaşık yapıya genoma sahip bitkilerde proteom analizlerinin daha kolay, hızlı ve etkin biçimde gerçekleştirilmesine de olanak sağlanması amaçlanmıştır. Son olarak, sunulan tez çalışması ülkemiz için beslenme ve ekonomik açıdan son derece değerli ve stratejik bir ürün olan buğdayda karşılaşılan sorunların çözümünde proteomiğin sunduğu olanakların ortaya konması açısından da son derece kıymetlidir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. GENOMDAN PROTEOMİĞE

Endüstrileşmiş ülkelerde görülen hayat beklentisi ve yaşam kalitesindeki artışa bağlantılı olarak tıp ve biyoloji bilimlerindeki keşifler de büyük bir ivme kazanmıştır. Bu bilimler, 20. yüzyılın başında, makroskopik olayları anlamayı amaçlarken yüzyılın bitişiyle, biyolojik olayları daha iyi kavramaya yönelik mikroskopik ve nanoskopik dünyalara giriş yapılmıştır (Varga, 2004). Özellikle genetik bilimindeki baş döndürücü gelişmeler yüzyılın son çeyreğinde tüm genoma ait DNA dizisinin çıkarılmasını öngören çalışmalarla yeni bir biyolojik çağın başlangıcına yol açmıştır. Bu çağda organizmaların çeşitli biyolojik süreçlerinde rol alan hücrel metabolizmaların aydınlatılması yönünde genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik olarak adlandırılan “OMİK” teknolojileri ortaya çıkmıştır (Dettmer, 2004).

Omik, Yunanca kökenli bir kelime olup, “tümü” veya “hepsi” anlamına gelmektedir (Mutch ve diğ., 2005). Bu yüzden omik teknolojileri en genel tanımı ile bir organizmada bulunan belli molekül gruplarına dair ne varsa bu moleküllerin tamamını farklı açılardan incelemek anlamını ifade etmektedir (Şekil 2.1). **Genomik**; bir organizmanın genomunu oluşturan DNA moleküllerinin nükleik asit içeriği, dizilimi ve organizasyonunu incelerken, **Transkriptomik**; bir hücre genomunda bulunan genlerin anlatımı sonucu oluşan RNA transkriptlerinin anlatım profillerini eş zamanlı, karşılaştırmalı veya seri olarak inceler. **Proteomik** ise genlerin son ürünü olan, hücrelerin yapısında yer alan veya biyokimyasal olayların gerçekleşmesinde görev yapan protein moleküllerinin toplamını farklı açılardan incelemek için kullanılır. Omik teknolojilerinin en sonucusu olan **Metabolomik** ise bir hücre veya canlıdaki tüm metabolik yolların çeşitli kademelerinde sentezlenen, kimi organizmanın yaşamsal faaliyetleri için mutlak kimi sadece belli koşullar için gerekli metabolitlerin yani metabolomu oluşturan tüm moleküllerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasını hedeflemektedir (Akiyama ve diğ., 2008).

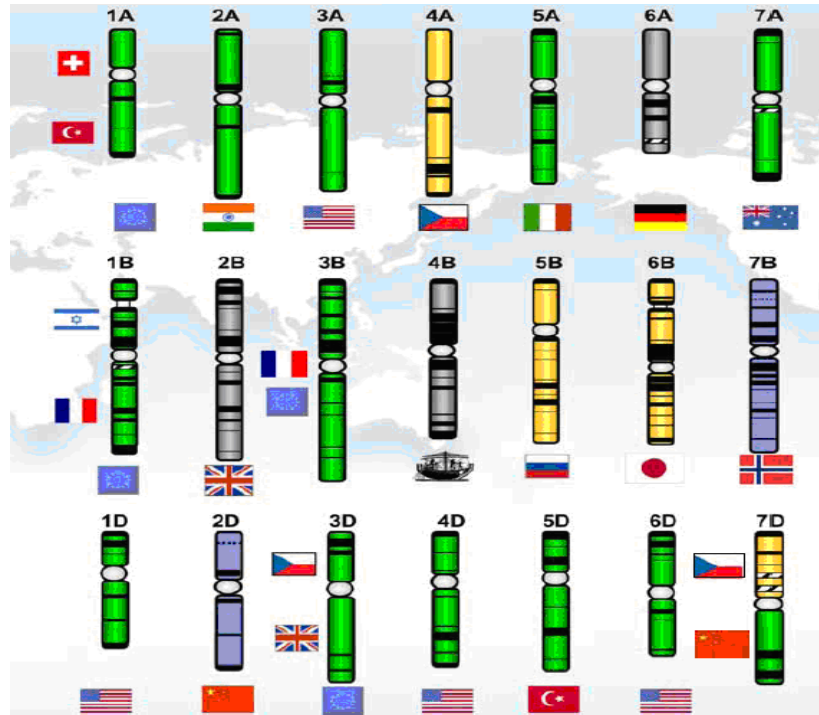


Şekil 2.1: Omik teknolojiler (Baginsky ve diğ., 2007)

“GENOM” terimi bir canlının hücreleri içinde bulunan genetik programı taşıyan DNA molekülünün tamamını ifade etmektedir. Genom büyüklüğü organizmadan organizmaya büyük farklılık gösterir. Bilinen en küçük genom 600.000 baz çifti (bç) ile bir bakteriye ait iken insan genomu 3.000.000.000 bç, buğday genomu ise 17.000.000.000 bç den oluşmaktadır (Salamini ve diğ., 2002). Ökaryotik organizmalarda genom, kromozom setleri halinde organize olmuştur ve her kromozom birçok gen içermektedir. Ancak organizmadan organizmaya değişimle birlikte genel olarak gen sayısı genomun küçük bir kısmını kapsar. Örneğin 17 milyar bç lik buğday genomunun yaklaşık % 1 ini, 3 milyar bç lik insan genomunun ise yaklaşık % 2 sini genler oluşturmaktadır (Salamini ve diğ., 2002). Geri kalan kısım, tekrarlanan diziler, gen anlatımını düzenleyici bölgeler ile fonksiyonu bilinmeyen dizilerden oluşmaktadır. Mevcut yöntemlerle bu kadar büyük genomlar içinde dağınık olarak yer alan genlerin belirlenmesinin zorluğu karşısında genom projeleri doğmuştur. İnsan genom projesinin ilk örneğini oluşturduğu bu projeler “DNA dizi analizi ile genomun yapısını anlamak, genlerin yerini tespit etmek ve nasıl çalıştığını ortaya koymak mümkündür” öngörüsü ile başlatılmıştır (Alberts, 1998). Bununla birlikte asıl amaç bir organizmanın tüm genomunu dizileyerek genetik şifreleri çözmek ve genetik kaynaklı sorunların kökenini tespit etmektir. Ayrıca farklı türler arasındaki benzer genleri karşılaştırmak ve bu genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerini belirlemek gibi evrimsel açıdan da son derece önemli bulguları ortaya koymak diğer önemli hedefti (Lander ve diğ., 2001). Sonuçları açısından insanlık tarihinin en önemli projelerinden biri olan insan genom projesi ile insan genomunda bulunan üç milyar nükleotid dizilenerek nükleotid içeriği belirlenmiş ve bu bilgiler işlenerek insan

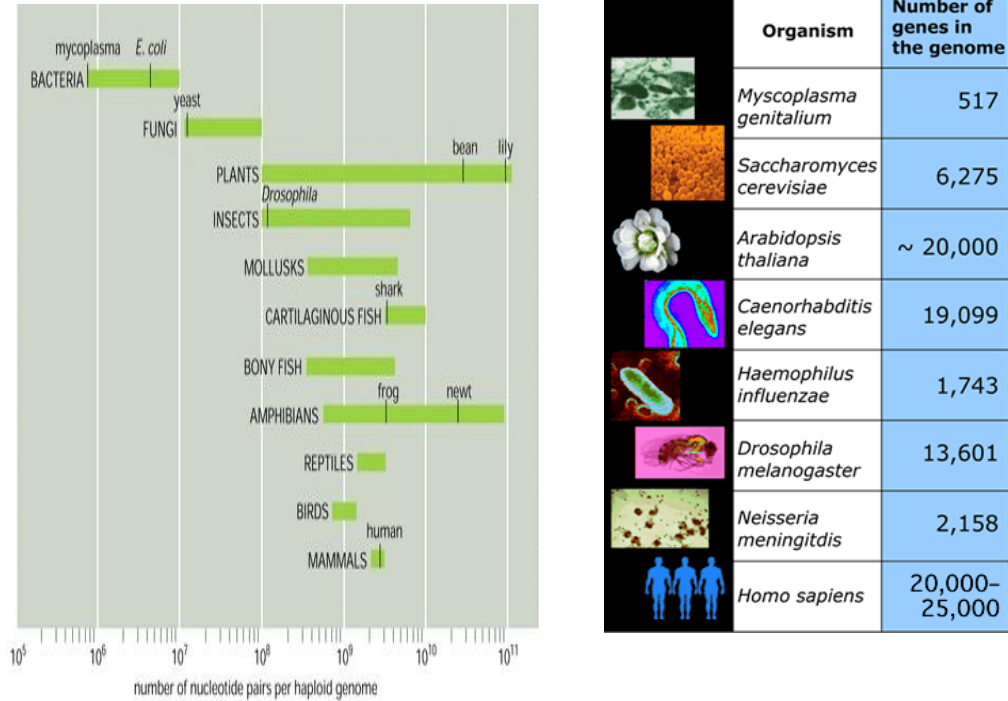
genomunun yapısı ve içeriği, başka bir deyişle biyolojik bir anlamı olabilecek birimleri (genler, çevrilmeyen transkripsiyon birimleri, mikroRNA'lar, düzenleme üniteleri, transkripsiyon faktörleri) tanımlanmaya çalışılmıştır (Demiralp, 2008).

1990 yılında başlayan insan genom projesinin uzun yıllar alacağı öngörülmüş ancak proje devam ederken buna paralel olarak teknoloji de hızla gelişmiş ve 2001 yılında taslak bulguların yayınlanmasının ardından 2003 yılında proje tamamlanmıştır. Bunu takiben birçok organizmanın genom dizisi kısa sürede çıkarılmıştır (Begüm ve diğ., 2007). Dizileme teknolojisi halen gelişmeye devam etmektedir. Bugün işlem hacmi çok yüksek cihazlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle büyük genomlu organizmaların dahi dizileme çalışmaları baş döndürücü bir hızla tamamlanabilmektedir. Örneğin önemli bir besin kaynağı olan buğday için, genomunun çok büyük olması nedeniyle böyle bir çalışma düşünülemezken bu teknolojiler sayesinde Türkiye'nin de içinde bulunduğu bir çalışma grubu tarafından 2005 yılında buğdayın tüm genom dizisinin oluşturulması yönünde bir konsorsiyum oluşturulmuştur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Buğday genomu dizileme projesinde yer alan ülkeler ve dizileyecekleri kromozomlar (www.wheatgenome.org, 10 Ağustos 2009)

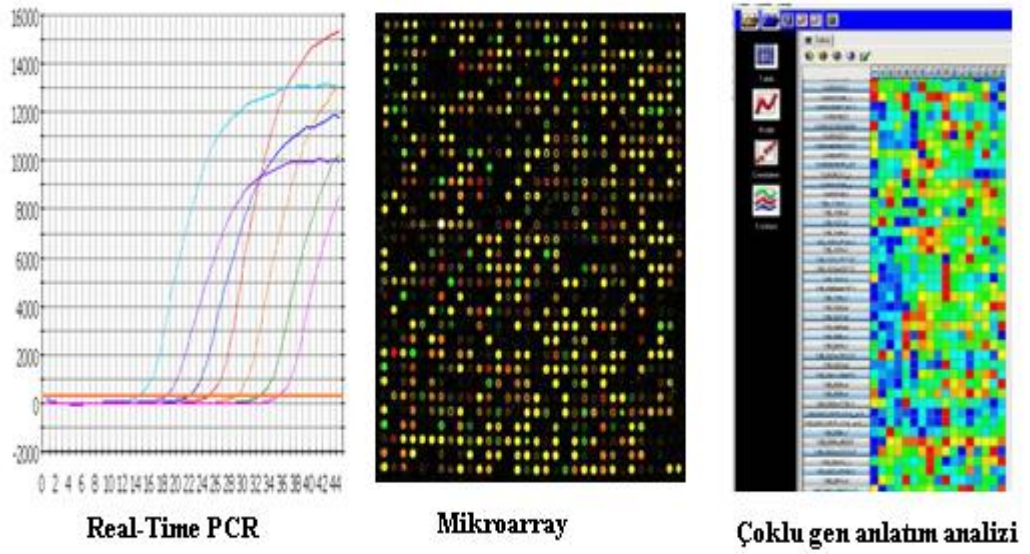
Genom projelerinin ortaya koyduğu bir başka gerçek organizmaların beklenenden daha az gen içermesi olmuştur. Örneğin, insan genomu için 100.000 kadar gen varlığı tahmin edilirken gerçek sayının 20-25.000 civarında olduğu görülmüştür (Nedelkov ve diğ., 2006). Bitkiler dünyasına bakıldığında aradopsis için tahmin edilen rakam 40.000, gerçek ise 25.000, pirinç için tahmin edilen 50.000 iken gerçekte yaklaşık 40.000 (Sasaki, 1997), mısırdaki ise 56.000 tahmin edilirken gerçekte 24.000 genin olduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.4). Dolayısıyla genom projelerinin açığa çıkardığı bu sonuçlar, organizmaların bu kadar az sayıda genle bu kadar karmaşık olayları nasıl gerçekleştirdiği sorusunu da doğurmuştur (Patterson ve diğ., 2000).



Şekil 2.3: Çeşitli organizmalarda genom büyüklüğü ve gen sayısı
(<http://prospector.ucsf.edu>, 20 aralık 2010)

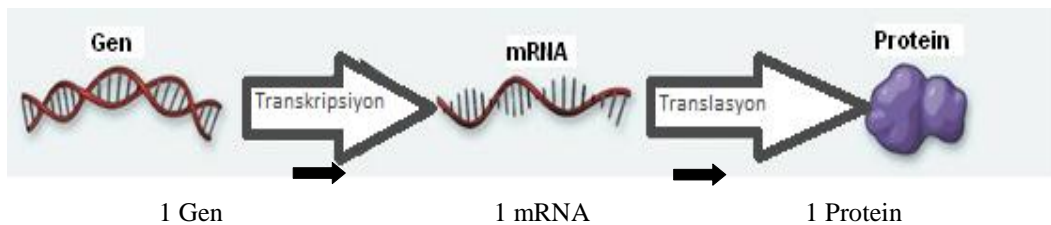
Genom dizileme çalışmaları, genetik bilimine ve bu alandaki teknolojik gelişime büyük katkılar sağlamış olmakla birlikte elde edilen bilgiler biyolojik süreçlerin sadece tüm genomun dizilmesi ile çözülemeyeceğini de ortaya koymuştur (Allouis ve diğ., 2003). Bunun hemen ardından ortaya çıkan işlevsel genomik yaklaşımı, genlerin ve onların çıktılarının biyolojik rollerini belirlemeyi kısaca genomik bilgiye biyolojik bir anlam kazandırmayı hedeflemektedir. Bir organizmanın tüm biyolojik karakterlerinin ortaya çıkmasında, tüm hücrelerinin ahenk içinde çalışıp bütünü oluşturmasında ve tüm

uyaranlara karşı verdiği cevapta sayısız protein görev yapmaktadır ve bu proteinler genlerin ürünüdür. İşlevsel genomikte dikkatler ilk olarak RNA ekspresyon seviyelerine çevrilmiştir ve bu nedenle (Evans ve diğ., 1999) transkriptleri ara moleküllerdir ve transkriptomik olarak adlandırılan RNA ekspresyonun geniş ölçekli analizinde (Eggers ve diğ., 1994) organizmanın genleri hangi oranda kullanıldığı, hangi genlerin ifade edilerek proteinlere dönüştürüldüğünün belirlenmesi, gen ürünlerinin modifikasyonları, hücrede buldukları yerler ve göreceli miktarlarının anlaşılması amaçlanmıştır. Bunun için Real-Time PCR, DNA çip (mikroarray) teknolojisi ve gen anlatımının seri analizi (SAGE) gibi kimi yüksek teknolojik yöntemlerin (Şekil 2.3) yanı sıra çeşitli gen susturma yöntemleri de işlevsel genomikte kullanılan başlıca yaklaşımlardır (Blanchard ve diğ., 1998). Bu yöntemlerin kullanımı ile RNA alt birimlerinin ve tamamının kantitatif ekspresyon profillerinin ortaya konması sağlanmıştır (Kodadek, 2002). Örneğin DNA mikroarray teknolojisi kanser hücrelerindeki gen anlatımının karakterize edilmesinde oldukça kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır. İnsan akciğer epitelyum hücreleri tarafından anlatımının yapılan yaklaşık 5500 gen, akciğer kanserli doku genleri ile karşılaştırılmıştır. Böylece kanserleşme sürecinde rol oynayan gen takımları hakkında bilgi edinmek mümkün olmuştur (Ahoroni ve diğ., 2001). Bu yöntemin kanser tedavisindeki bir diğer önemli rolü ise gen anlatımının durumlarına göre kanserleşen hücrelerin sınıflandırılabilmesidir. Örneğin, önceden tespit edilemeyen malignan melanoma hücrelerinin alt tipleri, ekspresyon paternleri ile belirlenebilmektedir (Chapman, 2002). Elde edilen transkript verileri, bir organizmanın biyolojik süreçlerinde fonksiyonel olan protein sayısının sahip olduğu gene karşılık çok fazla olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca genom kapsamında elde edilen nükleotid dizisi, genetik haritalar, gen anlatım profilleri gibi genetik bilgilerin, hücrelerdeki karmaşık biyolojik olayları yürüten proteinler ile kalitatif veya kantitatif olarak örtüşmediğini göstermiştir (İslam ve diğ., 2003). Bir başka deyişle RNA ekspresyonunun, protein seviyesinde meydana gelen değişikliklerle zayıf bir doğrusal ilişkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Transkriptomla elde edilen çok sayıda bilgi az sayıda soru cevaplarken pek çok başka yeni soruyu da gündeme getirmiştir (Şahin ve diğ., 2005). Bu sayede omik teknolojisinin son basamaklarında yer alan “proteomik” ve “metabolomik” teknolojilerinin başlangıç noktası olarak kullanılmasının, daha kısa sürede daha çok soruyu cevaplayabileceği gerçeği ortaya çıkmıştır.



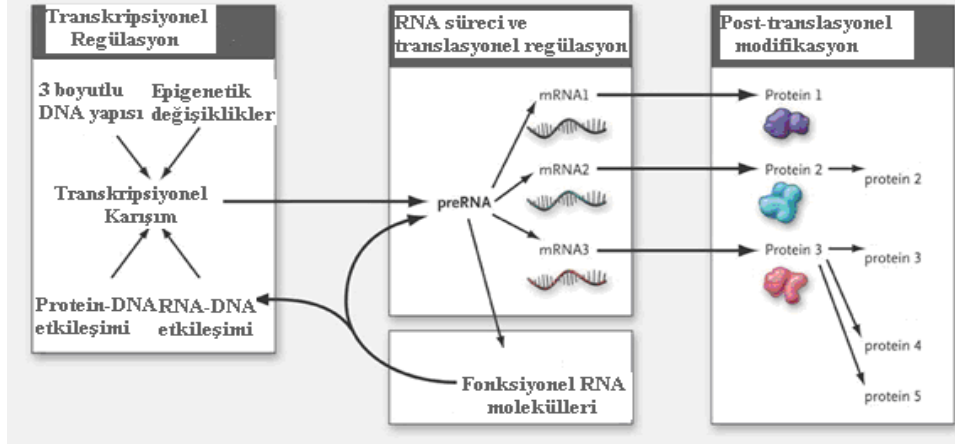
Şekil 2.4: Transkriptom çalışmalarında kullanılan teknolojiler
(www.microarray.swmed.edu, 1 Mayıs 2009)

Yürütülen transkriptom ve proteom düzeyindeki yeni araştırmalar sonucunda; i) gen anlatımının çeşitli regülasyon mekanizmaları ile kontrol edilerek çok değişebildiğini, ii) gen füzyonları ve transkripsiyon sonrası düzenlemeler sonucu bir genden çok sayıda mRNA'nın sentezlenebildiğini, iii) farklı kırılma mekanizmaları ile de bir mRNA'dan birden fazla farklı polipeptidin oluşturulmasının mümkün olduğunu ortaya koymuştur. Kısacası bir organizmanın az sayıda genle birçok biyolojik fonksiyonu gerçekleştirebilmesinin bir nedeni, bir genin birden fazla proteini sentezleyebilmesidir (Schwab, 2003). Devam eden çalışmalar bu görüşü destekler nitelikte pek çok veri ortaya konmuş ve "SANTRAL DOGMA" olarak adlandırılan 1 genden bir mRNA molekülünün ve bundan da bir proteinin dolayısıyla "1 gen=1 protein" kuramının (Şekil 2.5) doğru olmadığı göstermiştir (Anderson ve diğ., 2004).



Şekil 2.5: Santral dogma kuramının şematik gösterilişi
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 27 Mayıs 2010)

Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, genler tarafından anlatımı yapılan on binlerce proteinin birçoğunun çeşitli aşamalarda post translasyonel modifikasyona (PTM) uğrayarak bir çok farklı proteine dönüştüğünü de (Şekil 2.6) açık bir biçimde ortaya koymuştur (Feero ve diğ., 2010).



Şekil 2.6: Bir genden farklı bir çok proteinin anlatımı
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 27 Mayıs 2010)

Bir protein, polipeptid zinciri aşamasından itibaren, fonksiyonunu etkileyebilecek çok çeşitli PTM lara uğrayabilmektedir (Anderson and Seilhammer, 1997). Fosforilasyon, glikozilasyon, sülfasyon, nitrasyon, glikasyon, açılasyon, metilasyon, proteolitik bölünme ve çeşitli oksidasyon formları, proteinlerin uğradığı 200 farklı PTM den sadece bir kısmıdır (Unimod, 2010). Dolayısıyla bir biyolojik sistemde bulunan toplam proteinlerin sayısının, mevcut genlerin sayısından çok daha fazla olmasının bir diğer nedeni de PTM dir. Bu bilgiler doğrultusunda bir hücreye ait genlerin transkripsiyonu ile sentezlenen mRNA lardan yola çıkılarak öngörülen proteinlerin varlığı, miktarı ve populasyonu, gerçekte hücrede bulunan proteinler ile örtüşmemektedir. Dolayısıyla bir organizmada genom ve gen anlatım analizlerinin tek başına biyolojik olayları açıklamakta yetersiz olduğu artık net olarak bilinmektedir (Feero ve diğ., 2010).

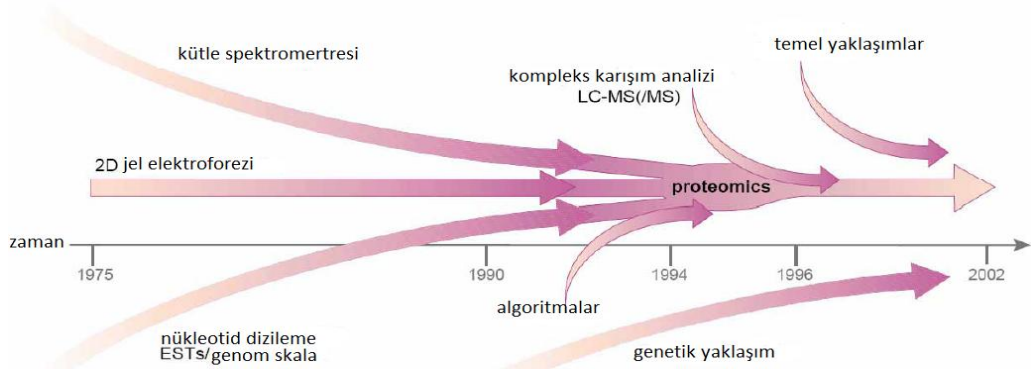
Sonuç olarak, biyolojik süreçte sorumlu genlerin belirlenmesinde, bu süreçte rol alan proteinlerin başlangıç noktası olarak seçilmesi ve buradan hareketle gene doğru bir yol izlenmesi daha doğru bir yaklaşım olarak bilim dünyasında kabul görmüştür. Diğer yandan organizmaların az sayıda gen içermelerine rağmen son derece karmaşık hücresel

olayları kolayca yürütülebiliyor olmaları durumu göz önüne alındığında, genom çalışmalarına karşılık proteom biliminin, 1.000 misli daha fazla veri içermesi pek çok sorunun daha hızlı cevaplanacağına da habercisidir (Salekdeh ve diğ., 2002). Proteomik çalışmaların bir diğer önemli avantajı da, genom ve proteom arasında tamamlayıcı nitelikteki verileri sağlanması yönünden son derece değerli sonuçlar üretmesidir (XUE ve diğ., 2010).

2.2. PROTEOMİĞİN SUNDUĞU OLANAKLAR

Biyolojik olayların moleküler mekanizmasını ortaya koymak üzere yürütülen genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik çalışmaların hepsi modern sistemler biyolojisinin temellerini oluşturmaktadır (Karataf ve diğ., 2007). Bu sistemin temellerden biri olan proteom, hücreden hücreye farklılık gösterdiği gibi iç ve dış uyaranlara yanıt olarak biyokimyasal etkileşimler aracılığı ile de sürekli bir değişim halindedir. Ancak geliştirilen yeni teknolojiler sayesinde, proteom analizleri ile daha kolay ve hızlı protein tanımlanması gerçekleştirildiği gibi bu proteinlerin, işlevleri ve ilgili bağlantı ağlarının aydınlatılmasını sağlayacak önemli bilgiler de elde edilmiştir (Şekil 2.7). Proteomik yaklaşımlarla biyolojik mekanizmalarda iş gören enzim ve proteinlerin belirlenmesinin yanı sıra karmaşık biyokimyasal mekanizmaların çözümlenmesine önemli katkılar sağlayacak protein düzeyinde bilgiler ortaya konmaktadır (Gygi ve diğ., 2000). Bir organizmada hastalık ya da dayanıklılık gibi birçok biyolojik sürece özgün olarak yapılan proteomik uygulamalarla bu süreçlerde rol oynayan proteinlerin anlatım profilleri belirlenmektedir (Fröhlich ve Arnold, 2006). Böylece hücre içinde ve hücreler arasında gerçekleşen kimyasal tepkimeler, hücrelerin canlılıklarını nasıl korudukları, birbirleriyle nasıl haberleştiklerinin, hücre yapısının ve çeşitliliğinin nasıl gerçekleştiği ortaya konmaktadır (Alberts ve diğ., 1994). Bu sebeplerden dolayı proteomik, biyolojik sistemlerin işleyişinin aydınlatılması bakımından çok önemli bir teknolojidir. Ayrıca proteomik belli karakterlerin belirlenmesi ve izlenmesinde etkin biçimde kullanılacak biyomarkörlerin geliştirilmesine de olanak sağlamaktadır. Bu açıdan bakıldığında proteomik, tanı ve ilaç geliştirmede, hastalıkların seyrinin ve/veya terapötik uygulamaların etkilerinin izlenmesinde, hastalıklara özgü proteinlerin belirlenip hastalığın ilerleyişi hakkında

ilişki kurulmasında, biyolojik süreçlerin geliştirilmesinde ve hedef patojen proteinlerinin tanımlanmasında çok önemli uygulamalara sahiptir (Nedelkov, 2008).



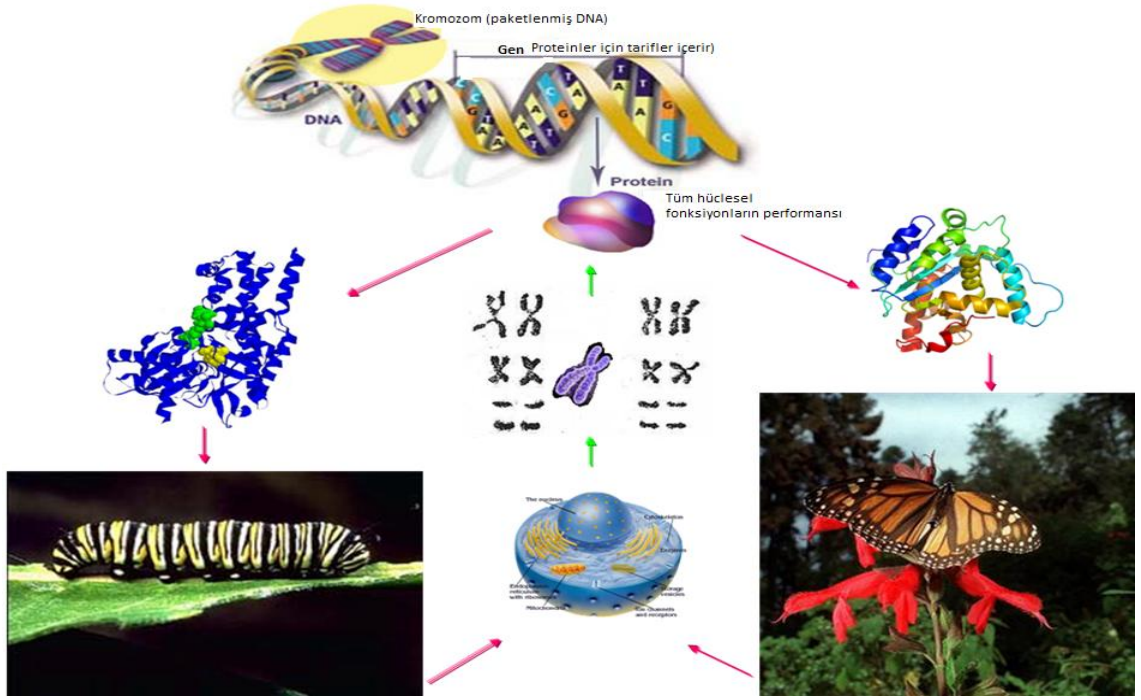
Şekil 2.7: Proteomikteki teknolojik gelişimin tarihsel süreci (www.maths.leeds.ac.uk, 8 Haziran 2010)

“Protein” kelimesinin Latincedeki karşılığı ‘yaşayan varlıklar için gerekli azotlu öge’ dir. Proteinler, amino asitlerin (aa) her birinin bir karboksil grubunun bir diğerinin amino grubuna bağlanmasıyla meydana gelen zincir şeklindeki büyük organik bileşiklerdir (Bulduk, 2004). Değişik proteinler, değişik sayı ve çeşitte aa içerirler. Yapıyı oluşturan aa ler birbirlerine peptid bağlarıyla bağlandıklarından polipeptid yapısına sahiptir. Bazı proteinler tek bir polipeptidden meydana geldikleri gibi bazıları da birkaç polipeptidin bir araya gelmesiyle oluşabilirler. Her bir protein, belli bir aa dizisine ve sayısına, belirli bir molekül ağırlığına, kimyasal içeriğe ve üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Genlerin anlatım ürünleri olan proteinler, hücrelerin yapısal bileşenidir. Enzim olarak çeşitli biyokimyasal olaylara katılmak, organik ve inorganik birçok maddenin taşınmasında görev almak gibi çok farklı görevlere sahiptir (Andon ve diğ., 2002).

Canlı bir hücre, organel, doku veya organizmada gen anlatımı sonucu sentezlenen proteinlerin tamamına proteom denir ve ilk kez 1994 yılında, Marc Wilkins tarafından önerilerek ve kabul görmüştür (Özcengiz, 2007). Proteomik sözcüğü ise bir biyolojik sistemde, belirli bir koşulda ve belirli bir zamandaki her bir proteini tanımlamayı, gen anlatım profilini ortaya koymayı, hücre içi yerleşimini, aktivitesini, kontrol mekanizmalarını, transkripsiyon sonrası düzenlemelerini, moleküler etkileşimlerini, üç

boyutlu yapısını ve işlevini belirlemeyi ifade eder (Hirano ve diğ., 2004; Finnie, 2006). Proteomik, mRNA ekspresyon analizinden farklı olarak, doku ya da hücre fonksiyonlarını daha açık ve gerçekçi biçimde ortaya koymayı sağlar. Bu nedenle son 20 yıldır, proteomik araştırmacıları dokularda, vücut sıvılarında ve hücrelerdeki değişik fizyolojik durumlarda yer alan proteinlerin ve protein türevlerinin anlatım düzeyini ve kimliğini saptamak için araştırmalar yapmaktadırlar (Baginsky ve diğ., 2007). Bu çalışmalarda, biyolojik fonksiyonları daha iyi anlayabilmemizi sağlayabilecek bilgilerin elde edilmesi, organizmaların çeşitli uyarılara/etmenlere karşı verdiği cevabın ortaya konması, hastalık ya da direnç gelişimi gibi yalnızca çeşitli koşullara ait protein profilinin yani moleküler imzanın belirlenmesi hedeflenmektedir. Proteomikte asıl hedef hücresel olaylarda rol alan protein düzeyindeki tüm bileşenlerin karakterizasyonunu yapmak ve bu bilgilerden yola çıkarak bu olaylardan sorumlu genleri belirlemektir (Pandey, 2000).

Proteomik teknolojisinin öneminin anlaşılması ve yaygınlaşmasında genom projelerinin rolü büyüktür. Genomik araştırmalarda çeşitli biyolojik süreçlerden sorumlu olan genler belirlenmeye ve tanımlanmaya çalışılmış ancak organizmanın, tanımlanan bu genleri hangi oranda kullandığı hakkında bilgi sağlanamamıştır (Kim ve diğ., 2004). Bilindiği üzere bir organizmayı oluşturan farklı yapı ve fonksiyona sahip çok sayıda hücre bulunmaktadır. Organizmanın karmaşıklığına göre bu sayı binlerden milyarlara kadar değişebilmektedir ve eşey hücreleri hariç organizmanın tüm hücreleri aynı genoma sahiptir. Ancak tüm hücrelerde bulunan bu genlerin anlatım profilleri, seviyeleri ve zamanları hücreden hücreye farklılık göstermekte ve sonuç olarak bir organizmada aynı genom ve genlere sahip ancak yapı ve işlev bakımından bir birinden çok farklı hücre ve doku bulunmaktadır (Schwab, 2003). Örneğin bitkilerin çiçeklerinde bulunan ve koku moleküllerini üreten hücreler, yapraklarda bulunan stomalar ile köklerinde bulunan hücreler aynı genom ve genlere sahipken yapı ve fonksiyon bakımından birbirinden çok farklıdır. Yaşamın çeşitli evrelerinde farklı organizmalar bu durumu en iyi açıklayan örneklerdir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Aynı genom ve genlere sahip hücrelerin farklı ekspresyonu sonucu oluşan fenotipler (www.genetiklab.com, 3 şubat 2011)

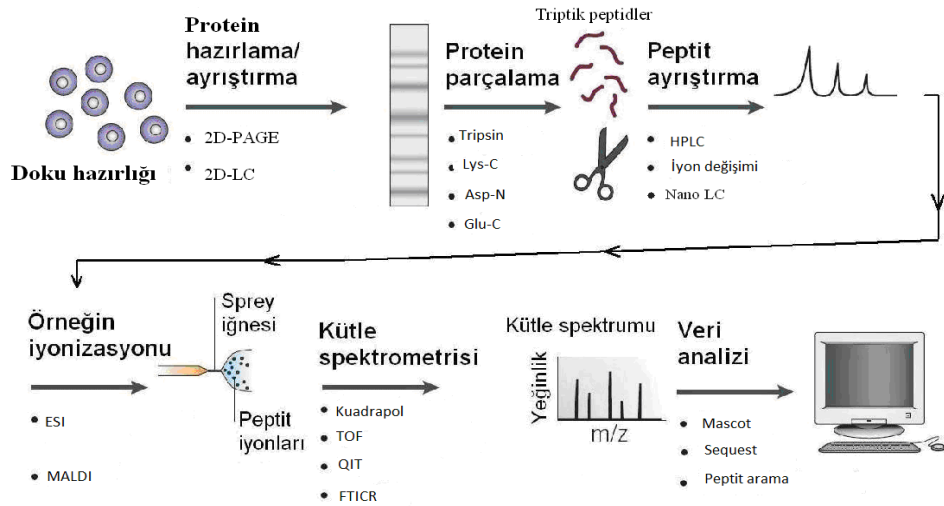
Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar proteinlerin beklenenden çok daha kompleks yapılarda olduğunu ve diğer proteinlerle etkileşime girerek hücre tipine ya da aynı hücrede farklı biyolojik süreçlere göre değişime uğradığını göstermiştir. Ayrıca proteinler, içsel ve dışsal etmenlere karşı organizmanın cevabını oluşturmak üzere hızlı biçimde sentezlenmeleri ve/veya yıkılmaları nedeniyle DNA ve RNA kadar stabil değildir ve genom bir organizmada bir tane iken proteom birden fazla sayıdadır (Fleming ve diğ., 2004). Bir organizma ya da dokuya ait proteom, her hücrede aynı olmamasına rağmen organizmada gerçekleşen olayların belirteçidir. Günümüzde proteinleri, farklı amaçlara yönelik olarak farklı yönleriyle inceleyen ve farklı isimlerle anılan proteomik alanları ortaya çıkmıştır. Bunlar;

- ekspresyon proteomiği; hücre ya da dokuda ifade edilen proteinleri belirler,
- yapısal proteomik; proteinlerin üç boyutlu tayiniyle uğraşır,
- işlevsel proteomik; proteinlerin işlevlerini ortaya koymayı hedefleyer,
- kemoproteomik; proteinlerin hangi moleküllerle etkileştiğini belirlemeye çalışır,
- hücre haritası proteomiği; protein-protein etkileşimi ve hücre içindeki yerleşimlerinin belirlenmesini hedefler (Nedelkov ve diğ., 2006).

2.3. BİR PROTEOMİK ÇALIŞMADA AŞAMALAR

Proteomik çalışmalar, proteinlerin kompleks ve dinamik yapıları nedeniyle genomik çalışmalardan daha zordur ve ancak bir biyolojik sistemde belli bir koşul ve belli bir zaman dilimindeki mevcut proteinlerin analizine olanak tanımaktadır. Bununla birlikte canlının yaşamı boyunca karşılaştığı çeşitli durum ve streslere karşı geliştirmiş olduğu metabolik ve düzenleyici reaksiyon yollarının detaylı biçimde incelenmesi son derece önemli bir alandır (Chinnusamy ve diğ., 2004; Salekdeh ve diğ., 2002).

Proteomik çalışmalarda, hücrelerdeki genlerin anlatımını doğru biçimde ortaya koymak için öncelikle proteinlerin diğer hücrel moleküllerden ayrılarak elde edilmesi gerekmektedir. Daha sonraki süreçte elde edilen protein karışımının doğru ve hassas biçimde birbirinden ayrılması zorunludur. Tek tek birbirinden ayrılan proteinler proteaz enzimleri yardımıyla peptidlerine parçalanır ve kütle spektrofotometresinde peptid kütle parmak izleri aa dizileri elde edilir (Şekil 2.9). Son aşamada bu veriler çeşitli biyoinformatik yazılımlar aracılığıyla uluslararası veri tabanlarında bulunan verilerle karşılaştırılarak protein tanımlanması yapılmaktadır (Irar ve diğ., 2010).



Şekil 2.9: Bir proteomik çalışmanın evreleri (Mora ve diğ., 2000).

2.3.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Bir proteomik çalışmada ilk aşamayı oluşturan örnek hazırlığı (protein ekstraksiyonu) sırasında proteinler hücre dışına çıkarılır ve diğer hücre bileşenlerinden ayrılır. Bunun için çalışılacak hücrelerin bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin serbest hale getirilmesi gereklidir. Mekanik ya da kimyasal olarak parçalanmış çok sayıda hücreye ait moleküler içerik, proteinlerin yanı sıra protein olmayan pek çok molekül ve bileşiğide içermektedir. Elde edilen bu moleküler karışım, proteinlerin fizyolojik özelliklerini koruyabilecekleri bir sıvı tampon içine alınır ve hücreden arındırılmış lizat (CFL) olarak adlandırılır (Kim ve diğ., 2003). CFL hazırlamak için çeşitli organizmalara ve dokulara yönelik farklı teknikler kullanılmaktadır. Örneğin, hücreye fiziksel bir güç uygulanarak mekanik olarak parçalayıp, hipotonik bir çözelti içerisine koyup çok az bir parçalama kuvveti uygulayarak ozmotik olarak parçalamak da mümkündür. Elde edilen lizat her biri kendi proteomuna sahip, farklı aşamalarda birçok hücre veya bu hücrelerin oluşturduğu bir dokudan meydana gelen bir protein karışımı içerir. Bu karışımda bulunan proteinlerin moleküler büyüklüğü, yükleri, hidrofobisiteleri ve yapıları çok büyük çeşitlilik göstermektedir (Patterson ve Aebersold, 2003; Rose ve diğ., 2004). Proteomik çalışmalarda bu karışım halindeki proteinlerin tanımlanabilmesi için öncelikle protein olmayan moleküllerden daha sonra da birbirinden ayrılması gerekmektedir (Park, 2004).

2.3.2. Proteinlerin İki Boyutlu (2D) Ayrımı

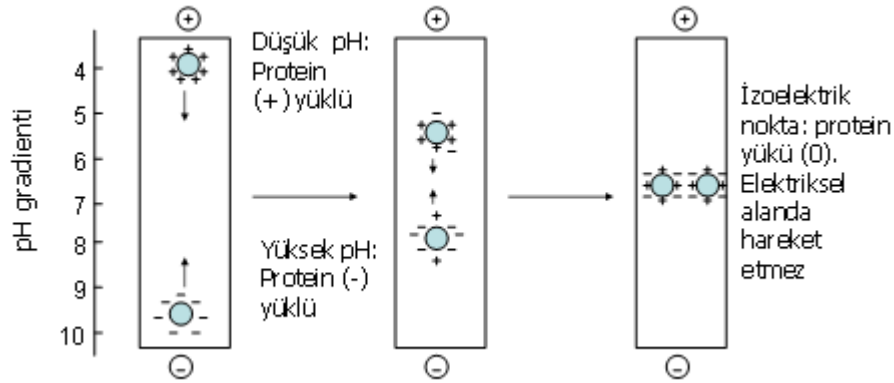
2.3.2.1. Proteinlerin 2D-PAGE Yöntemiyle İki Boyutlu Ayrımı

Birçok biyolojik molekül gibi proteinlerin ayrımında da elektroforez yöntemi yaygın biçimde kullanılmaktadır. Elektroforezin çalışma ilkesi; molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken katettiği mesafe farklılıklarına dayanmaktadır (Dovich, 1997). Elektroforezde katedilen mesafe, net yük ile doğru, molekül büyüklüğü ve ortamın viskozitesi ile ters orantılıdır. Elektroforezde destek ortam olarak agaroz ve nişasta jelleri kullanılmakla birlikte genellikle daha yüksek çözünürlükte ayırım için PAGE tercih edilmektedir (Weber ve diğ., 1972).

Proteinlerin ayrılmasında kullanılan SDS-PAGE tekniğinde denatüre edici maddeler bulunmaktadır. Bu maddeler sayesinde proteinlerin alt birimleri birbirinden ayrılarak incelenir. Proteinlerin tek boyutlu ayrımında kullanılan SDS-PAGE de belli bir

proteinin saflığı ve yapısı incelenirken bir yandan da az sayıda proteinden oluşan karışımların ayrılması sağlanmaktadır. Ancak proteomik çalışmalarda bir hücreyi oluşturan tüm proteinlerden oluşan bir karışım söz konusu olduğundan ayırım gücü daha yüksek yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (Fröhlich ve diğ., 2006).

SDS-PAGE yöntemi ile izoelektrik odaklamanın (IEF) bileşimi olan 2D elektroforez, kompleks protein karışımlarının ayrımında kullanılan önemli bir tekniktir. Bu yöntem ilk olarak 1975 yılında O' Farrel tarafından tanımlanmıştır ve moleküller birinci boyutta izoelektrik noktalarına (pI) göre ikinci boyutta ise büyüklüklerine göre ayrılmaktadırlar. Klasik elektroforezden farklı olarak IEF (Şekil 2.10), proteinlerin bir pH gradientinde pI ya göre ayrılması prensibine dayanır (Reisner ve diğ., 1975). Bu yöntemde; pH gradienti, düşük molekül ağırlıklı amfoterik maddelerin (amfolitler) yardımıyla oluşturulur. Bu moleküller, proteinler gibi bir pI sahip oldukları için uygun pH noktalarında net elektrik yükleri sıfırdır.

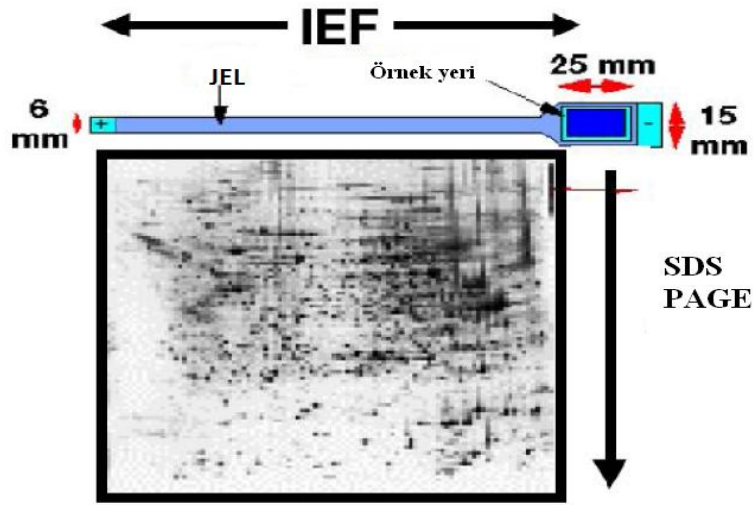


Şekil 2.10: İzoelektrik odaklama prensibinin şematik gösterimi
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 10 şubat 2011)

IEF de elektroforez için kullanılan tampon sistemi yerine, anotta kuvvetli bir asit, katotta da kuvvetli bir baz kullanılır. Jel ortamına da gerektiği kadar amfolit solusyonu katılır. Sisteme akım verilir ve amfolitler pI ya göre jelde düzenlenirler. En asidik olan anoda, en bazik olan da katoda doğru ilerler. Bunun sonucu jel içinde anottan katoda doğru artan, 2.5-11 arasında bir pH gradienti oluşur. Bu basamak, agaroz veya poliakrilamid jel gibi büyük porlu bir ortamda gerçekleştirilir. Bir proteinin çözünürlüğü pI noktasında minimum olduğu ve protein molekülü bu pH net bir yük taşımadığı için

elektrik alanında hareket edemez. Dolayısıyla IEF jele uygulanan örnekteki proteinler, jel üzerinde net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak dururlar (Şekil 2.11). Son yıllarda çeşitli firmalar tarafından istenilen pH aralığına sahip IEF stripleri geliştirilmiştir ve ticari olarak satılmaktadır.

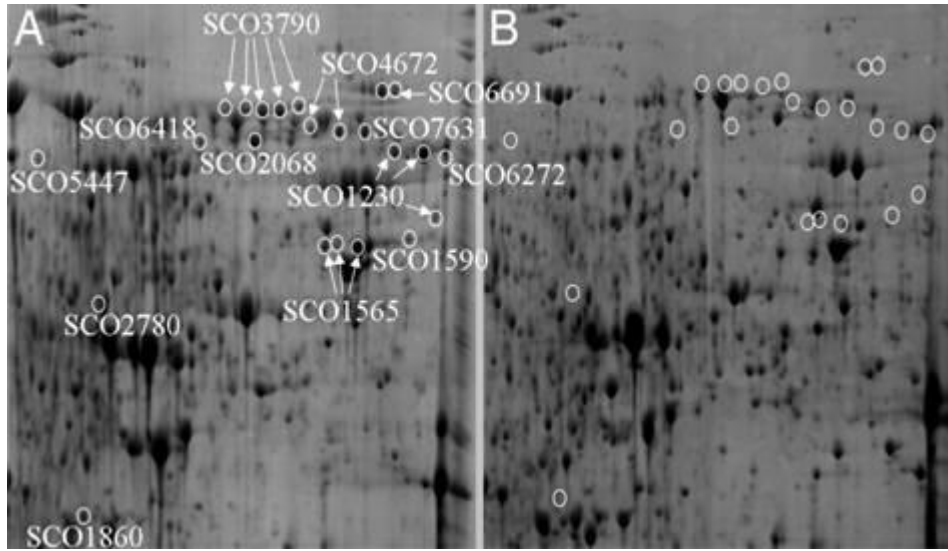
I. boyut ayırım pH değerine göre gerçekleşmesinden sonra II. boyut ayırım aşamasına geçilir. II. boyut ayırım için genellikle lineer veya gradient şekilli bir poliakrilamid kullanılır ve proteinler bu boyutta molekül ağırlıklarına göre ayrılır. IEF işleminden sonra jel tüpünden çıkarılan IEF stripleri (jelleri) II. boyut ayırım için SDS içeren ince bir poliakrilamid gradient jel plağıyla temas haline getirilir ve elektroforez işlemi başlatılır. pI noktalarına göre IEF üzerinde belli pH noktalarında toplanan proteinler II. ayırında molekül büyüklüklerine göre ayrılmaktadır (Perrot ve diğ., 1999).



Şekil 2.11: 2D-PAGE’de proteinlerin iki boyutlu ayırım şeması
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2 Aralık 2010)

İşlemin sonunda polipeptidler boyanarak görünür hale getirilir. En çok kullanılan boyar madde “Coomassie blue” dur. Daha duyarlı bir boyama tekniği ise gümüş boyamadır. Coomassie boyamayla genellikle 25 ile 50 ng civarında proteinlerin görüntülenmesi sağlanırken, gümüş boyama 5 ng seviyesindeki proteinlerin tespitine izin veren daha hassas bir tekniktir (Futcher ve diğ., 1999).

İyi bir ayırım ve boyamanın ardından tek bir jelde en az 1000 farklı proteinin görüntüsü elde edilebilmekte ve böylelikle 2 ayrı jelde farklı protein örnekleri tespit edilebilmektedir (Şekil 2.12). Jel görüntülendikten sonra fotoğrafı çekilebilir, ya da densitometre ile taranarak analiz edilebilir (Gygi ve diğ., 1999). Radyoaktif olarak işaretlenmiş proteinlerin analizinde de otoradyografi yöntemlerinden yararlanır. Bu yöntemle polipeptidlerin analizinin başarılı sonuçlar vermesi beklenmiş fakat yapılan çalışmalar bunun aksini göstermiştir. Örneğin *E. coli* üzerindeki bir çalışmada teorik olarak 7000 polipeptid lekesi tanımlanabileceği ileri sürülmüş; çalışma gerçekleştiğinde otoradyografi tekniği ile 1100 leke saptanırken coomassie boyama ile yaklaşık 400 polipeptid saptanabilmiştir. Bu durum, 2D-PAGE yöntemindeki çeşitli sınırlamalar nedeniyle bir proteomdaki mevcut proteinlerin önemli bir kısmının analiz edilmediğini göstermektedir.



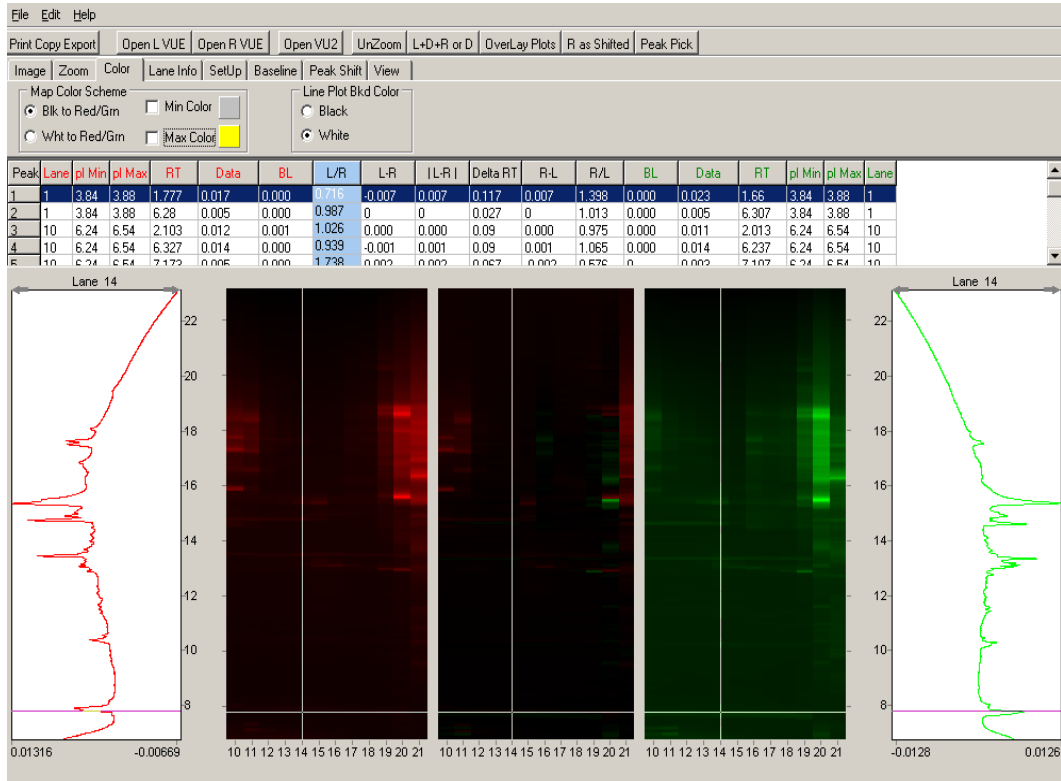
Şekil 2.12: 2D-PAGE ile iki boyutlu ayrılan farklı protein örneklerinin karşılaştırılması

Günümüze kadar bu teknikle pek çok farklı protein örneğinin çalışılması yapı ve fonksiyonlarının analizi mümkün olsa da; yöntemin zorluğu, zaman alıcı olması, duyarlılığının ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi önemli sorunlar bulunmaktadır. Dolayısıyla bu yöntemle bir çalışmanın tamamlanması oldukça uzun bir zaman alır. Her örneğin ayrı bir jelde yürütülmesi ise jellerin karşılaştırılmasında sıkıntılar doğurmaktadır. Özellikle suda çözünemediği için sıklıkla 2D-PAGE yönteminde ayrımı yapılamayan, başka bir deyişle kaybedilen hidrofobik proteinler sistemin önemli

dezavantajlarından biridir. Bu yüzden daha çok proteinin ayırımına olanak sağlayan 2D-LC (iki boyutlu sıvı kromatografisi) sistemleri geliştirilmiştir (Edgar ve diğ., 2004).

2.3.2.2. Proteinlerin 2D-LC Yöntemiyle İki Boyutlu Ayırımı

Bir proteomun ayrılmasında 2D-PAGE yöntemindeki, düşük çözünürlük, hidrofobik proteinlerin kaybı ve düşük tekrarlanabilirlik nedeniyle çok daha güçlü analitik tekniklere gereksinim olduğu açıktır. Oysa bir proteomda bulunan proteinlerin önemli bir kısmı hidrofobiktir. Bu nedenle bir hücredeki genlerin anlatımını doğru biçimde ortaya koymak için bu proteinlerin analizlerine ihtiyaç vardır. Dolayısıyla 2D-PAGE tekniğine alternatif olarak geliştirilen 2D-LC teknikleri bu proteinlerinde analizine olanak verecek nitelikte tasarlanmışlardır (Şekil 2.13). Sıvı kromatografinin proteomiğe yaklaşım amacı protein karışımlarını yüksek çözünürlükte fraksiyonlara ayırarak sanal jel haritalarında görüntülemek ve protein miktar farklılıklarını ortaya koymaktır (Zorb ve diğ., 2010).



Şekil 2.13: 2D-LC sistemi ile ayrılan farklı protein profillerinin karşılaştırılması

Klasik sıvı kromatografisi tekniği düşük tekrarlanabilirlik sağlayan ve analizcinin el becerisine dayalı bir teknik olup kaba ayırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. “Yüksek performanslı sıvı kromatografisi” (HPLC) ise daha hassas ayırım sağlamak üzere kısa difüzyon yoluna ve hızlandırılmış hareketli faza sahiptir. İlk modern HPLC cihazı 1965 yılında Yale Üniversitesi’nde Csaba Horvath tarafından geliştirilmiştir. Tekniğin kısa bir özeti 1966 yılında Nature dergisinde yayınlanmıştır. Bu sistemde zamanla apolar sabit fazların ve polar hareketli fazların kullanıldığı ters faz kromatografisi ön plana çıkmıştır. Horvath ters faz kromatografisi teorisini ortaya koyarken Kirkland silika partiküllerine uzun zincirli hidrokarbon ve diğer bir grup organik molekülleri kovalent bağ ile bağlayarak bağlı sabit fazların gelişimine öncülük etmiştir. 1971 yılında Kirkland ve Synder’in yayınladığı “Modern Practice of Liquid Chromatography” adlı kitap bu tekniğin anlaşılması ve yaygınlaşmasında önemli bir yere sahiptir. Bugün HPLC tekniği en çok kullanılan analitik tekniklerindedir. Son yıllarda yeni nesil teknolojiler arasında yerini alan ve HPLC tekniğinin fraksiyonlama sistemi ile kombine edilmesi ile oluşturulmuş 2D-LC sistemi proteomik çalışmalar için yüksek çözünürlükte protein ayırımı sağlamak üzere geliştirilmiştir. 2D-LC ayırma tekniğinde, proteinler birinci boyutta “chromatofocusing“ (CF) ile pI noktalarına göre, ikinci boyutta ise yüksek performans ters faz kromatografi (high performance reversed phase column, HPRP) ile hidrofobisite özelliklerine göre ayrıştırılarak fraksiyonlanmaktadır. Sistemin bir diğer önemli özelliği 2D-LC fraksiyonlarında ayrılan proteinlerin tanımlanması ve örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için gelişmiş bilgisayar programlarının da sisteme dahil edilmesidir. Proteom analizleri için tasarlanan bu sistemin diğer bir avantajı da, ham protein özütlerinin birkaç adımda saflaştırıldıktan sonra analiz edilmesidir. Böylece protein profillerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen verilerin, 2D-PAGE yöntemine oranla daha tekrarlanabilir ve güvenilir olmasını sağlar (Agrawal ve diğ., 2005; Lambert, ve diğ., 2005). Başka bir deyişle iki boyutlu jel sistemlerinin yerine 2D-LC tekniklerinin kullanımı çok sayıda total protein örneğinin daha hızlı, güvenilir ve güçlü biçimde ayırımına imkan sağlar (Fröhlich ve Arnold, 2006). Sistemin bir diğer önemli özelliği ise bir hücre/organizmaya ait proteomun önemli bir kısmını oluşturan hidrofobik yapıdaki ve pek çoğu da düzenleyici protein olan düşük anlatımlı proteinlerin, suda çözünemediği için 2D-PAGE de kaybolmasına karşın 2D-LC yöntemi ile ayırımının gerçekleştirilebilmesidir (Finnie, 2006).

Protein ayrımı için tez çalışmasında da kullanılacak olan ve Beckman Coulter firması tarafından geliştirilmiş olan “ProteomeLab PF-2D sistemi” (Protein fractionation two dimensional) 2D-LC tekniğinin bir örneğidir. Cihaz, total protein karışımlarını pI ve hidrofobitesine göre fraksiyonlarına ayırmakta ve bu ayırım işlemleri sırasında elde ettiği kromatogramları “ProtoVue” yazılım programı ile analiz ederek protein profillerini ortaya koyan sanal jel haritalarına dönüştürülmektedir. Ayrıca başka bir yazılım programı olan “DeltaVue” ile de elde edilen sanal jel haritalarından iki farklı örneğe ait protein profillerini karşılaştırarak anlamlı biçimde farklılık gösteren proteinleri belirleyebilmektedir. Daha sonraki aşamada farklı anlatım özellikleri gösteren bu proteinler, dizi özgün proteaz enzimleri ile kesilip MS (kütle spektrometre) analizleri ile tanımlanmaya çalışılmaktadır. PF-2D ile ilgili ayrıntılı bilgiye materyal metod kısmında yer verilmiştir.

2.3.3. Proteinlerin Tanımlanması

Organizmalarda işlevleri birbirinden farklı olan birçok protein bulunmaktadır. Bu farklılıklar, proteinlerin aa içeriklerinden, dizilimlerinden ve üç boyutlu yapısından kaynaklanmaktadır. Genlerin ürünleri olan proteinler, yapı ve fonksiyonlarını belirlemek için gerekli olan bilgiyi aa dizilerinde barındırdıklarından dolayı proteinlerin tanımlanmasında kütle analizlerinin yanısıra aa dizileme çalışmaları da çok önemlidir.

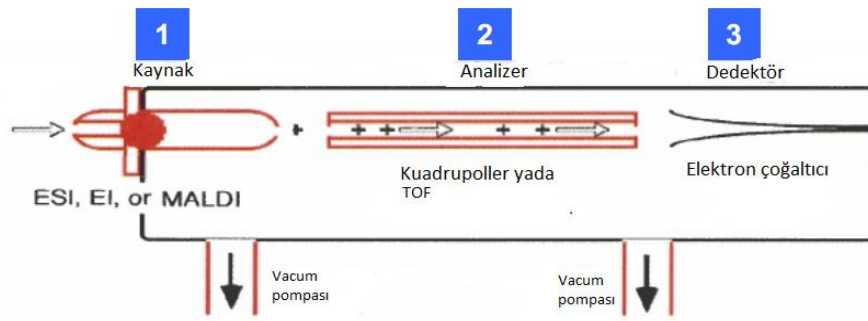
Bir proteomik çalışmada elektroforetik veya kromatografik yöntemlerle iki boyutlu ayrımı gerçekleştirilen çok sayıda protein elde edilebilmekte ve bu sayede proteinlerin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları hakkında fikir sahibi olunmaktadır. Ancak bu bilgiler, proteinleri tanımlamada MS analizine ihtiyaç vardır. MS cihazları, çok küçük aa dizi değişikliklerini dahi belirleyecek düzeyde hassastırlar ve hem parmakizi hem de aa dizileme çalışmaları ile çok benzer ekspresyon yapan genlerin ayrılmasına olanak tanır (Pirondini ve diğ., 2006). Elde edilen MS/MS spektrumları manüel olarak ya da geliştirilmiş yazılım programları ile işlenebilir ve veri tabanlarındaki aa dizileri ile karşılaştırarak proteinlerin tanımlaması yapılabilir (Watson ve diğ., 2003). Bu metodoloji hızla gelişerek daha kısa sürede, kolay ve doğru biçimde proteinlerin tanımlanmasını ve karakterizasyonunu sağlayacak eski ve yeni protein kimyası tekniklerine uyarlanabilir hale getirilmiştir (Roberts, 2002). Böylelikle hem peptidin

bütünü hakkında hem de aa kompozisyonu hakkında bilgi elde edilmesi sağlanmıştır. MS e verilmeden önce aralarından bazılarının seçilmesi gerekmektedir. Tanımlanacak proteinlerin öncelikle diğerleri arasından seçilmesi gerekmektedir. II boyutlu ayırmadan sonra bu proteinlerin seçilmesi tüm proteinlerin kontrol grupta bulunanlarla karşılaştırılarak farklı olanların belirlenmesiyle sağlanır. Daha sonra bu proteinler geri kazanılıp enzimlerle kesilip kısa peptidlere bölünmekte ve MS analizleri ile aa dizileri belirlenmektedir.

2.3.3.1. Kütle Spektrometre (MS) Analizleri

Son yıllarda geliştirilen MS cihazları, çok küçük aa dizi değişikliklerini dahi belirleyecek düzeyde hassastırlar ve hem peptid parmakizi hem de aa dizileme çalışmaları ile çok benzer ekspresyon yapan genlerin ayrılmasına olanak tanırırlar (Pirondini ve diğ., 2006). Bu cihazlar, genel olarak örneklerin iyonlaştırılmasını sağlayan bir kaynak, bu iyonları kütle/yük (m/z) oranına göre ayıran bir analizör ve ayrılan iyonları yakalayan bir dedektörden oluşmaktadır. 1980 li yılların sonlarına doğru geliştirilen ve protein/peptid yapılarında herhangi bir değişime neden olmayan iyonlaştırma kaynaklarının geliştirilmesi ile proteomik çalışmalar çok önemli bir ivme kazanmıştır (Meng ve diğ., 1990). Bu iyonlaştırma kaynakları matrix-assisted laser desorption/ionization-MALDI ve Nobel ödüllü electrospray ionization-ESI'dır. Bir iyonlaştırma kaynağı farklı analizörler (Time-of-flight-TOF, Quadrupole-Q, Quadrupole Ion Trap, QIT ve Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) ile bir araya getirilerek amaca uygun daha hassas ölçüm yapan MS metodları geliştirilebilmektedir (Şekil 2.14). Bugün protein tanımlamaları, büyük oranda MALDI TOF dan elde edilen protein/peptid kütle parmakizi (PMF) ile ESI-MS/MS analizlerinden elde edilen amino asit dizi bilgisine dayanmaktadır (Chace ve diğ., 1999). Bitki proteomik çalışmalarında da yaygın olarak kullanılan MALDI-TOF MS, yüksek işlem hacmi, ekonomik oluşu ve tuz toleransı nedeniyle tercih edilmekle birlikte yeterli genom dizi bilgisi bulunmayan türlere ait proteinlerin tanımlamaları için uygun değildir. Ayrıca pek çok bitki türünde olduğu gibi büyük genomlu organizmalar için de başarı oranı önemli ölçüde düşmektedir (Kirpekar ve diğ., 1998). Bu nedenle ESI-MS/MS metodunda ardı ardına yapılan MS (Tandem MS) analizleri sonucu elde edilen peptidlere ait aa dizi bilgisi, protein tanımlamalarında daha güvenilir sonuçlar ortaya koymaktadır. Özellikle son yıllarda pek çok laboratuvar tarafından kullanılmaya

başlanan “Capillary LC” (CapLC) ile bağlantılı ESI-MS/MS sisteminde birden fazla proteine ait olan triptik peptidler öncelikle CapLC kolonunda ayrılmakta daha sonra da kütle spektrometresi tarafından m/z değerine göre seçilmekte ve zinciri oluşturan amino asitlerine parçalanarak analiz edilmektedir. Özellikle son yıllarda nano litre akışlı CapLC sistemlerinin geliştirilmesiyle, çok daha güçlü bir peptid ayrımı gerçekleştirilebilmekte ve yüksek hassasiyette kütle analizleri yapılabilmektedir. Bunun yanı sıra nano litre akışlı LC-ESI MS/MS sistemleri, çok daha az miktarlarda örnek ve çözücü kullanımına olanak sağlaması nedeniyle de bitki proteomik çalışmalarında tercih edilmektedirler (Patterson ve Aebersold, 2003; Chen ve diğ., 2005; Thillement ve diğ., 2006). Bu nedenle tez çalışmasında PF-2D sisteminde ayrılan ve tanımlanmak üzere seçilen proteinlerin kütle analizleri LC-ESI-MS/MS de yapılmıştır.



Şekil 2.14: Kütle spektrometresinin çalışma prensibinin şematik gösterimi

(1) İyon kaynağı: moleküler iyonların üretildiği ve kütle kararlılık birimine iletiildiği ünite (MALDI, ESI) (2) Kütle kararlılık birimi (the mass analyzer): iyonlar m/z oranlarına göre ayrılır (TOF) (3) İyon detektörü: Sinyaller belirlenir, ileri aşamalar için veriyi bilgisayara aktarır.

Elde edilen MS/MS spektrumları manuel olarak ya da geliştirilmiş yazılım programları ile işlenmekte ve veri tabanlarındaki aa zincirleri ile karşılaştırarak proteinlerin tanımlaması yapılabilmektedir (Watson ve diğ., 2003). Bu metodoloji hızla gelişerek daha kısa sürede, kolay ve doğru biçimde proteinlerin tanımlanmasını ve karakterizasyonunu sağlayacak eski ve yeni protein kimyası tekniklerine uyarlanabilir hale getirilmiştir (Roberts, 2002).

2.3.3.2. *Biyoinformatik*

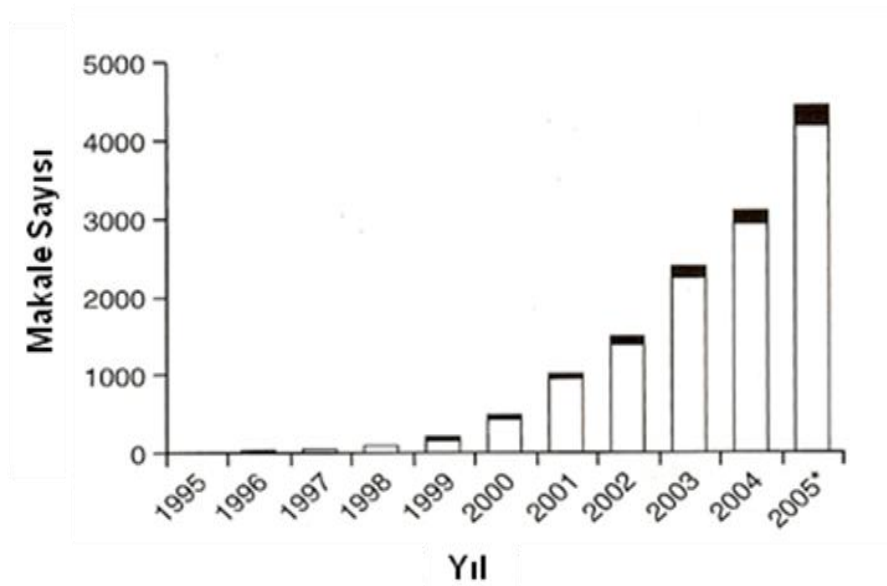
Biyoinformatik, 1970 li yıllardaki DNA dizileme teknolojilerindeki gelişmelerden hemen sonra ortaya çıkan yeni ve önemli bir bilim dalıdır. Biyoinformatiğin amacı, biyolojik deneyler ve gözlemsel çalışmalardan elde edilen verilerin yönetimi, depolanması, analizi ve yorumlanmasına olanak sağlamaktır. Biyolojik araştırmalarda ortaya çıkan veri boyutunun çok büyük olması, bilgisayar ve bilgisayar yazılımlarının bu tip araştırmalarda kullanılmasını zorunlu kılmıştır. Yeni bir disiplin olan biyoinformatiğin çok geniş bir çalışma alanına sahip olması nedeniyle literatürde birçok tanımı bulunmaktadır. Bunlardan Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi NCBI'nın (National Center for Biotechnology Information) internet sayfasında yer alan tanıma göre biyoinformatik, biyoloji, bilgisayar bilimi ve bilgi teknolojilerinin birleşiminden oluşan bir disiplindir. Biyoinformatik moleküler biyolojinin sayısal/hesaplama (computational) dalı olarak da tanımlanmaktadır (Claverie ve diğ., 2007). Elde edilen yüksek boyuttaki verilerin, veri tabanlarında saklanması ve internet üzerinden tüm araştırmacıların bu veri tabanlarına ulaşabilmesine olanak sağlanması bu konulardaki çalışmaları hızlandırmıştır. Yine bu veri tabanlarının bulunduğu internet siteleri aracılığıyla geliştirilen veri analiz araçlarına da ücretsiz olarak ulaşılabilir. Biyoinformatik alanında oluşturulan veritabanlarının büyük bir kısmı nükleik asitlere ait bilgileri içermektedir (Solomon, 2009). Proteom alanında üretilen bilgi genom bilgileri ile karşılaştırıldığında çok az oluşu veri tabanında yansımış ve protein tanımlamasında veri tabanının yetersiz oluşu önemli bir kısıt olarak ortaya çıkmaktadır. Oysa protein verileri nükleotid verilerinden daha önce, 1960'lı yılların başlarında toplanmaya başlanmıştır. Bilgisayar olanaklarının olmadığı bu dönemde, elde edilen diziler kağıt üzerine yazılmıştır. Veri sayısı ve boyutunun çok az olduğu bu dönemde, kağıt üzerine yazılan bu diziler yan yana konularak analizler ve karşılaştırmalar elle yapılmıştır. Bilgisayarların kullanılmaya başlanması ve dizilerin metin olarak bilgisayar ortamına aktarılması toplanan veri boyutunun artmasına neden olmuştur. Şu an protein dizi verilerini toplayan ve kullanıma sunan üç önemli hizmet sağlayıcı bulunmaktadır: Swiss-Prot, Protein Bilgi Kaynağı Veritabanı (PIR) ve Protein Veritabanı (PDB). (Ouzounis ve diğ., 2003). Bu veri bankalarında yer alan bilgiler, kütle sonucu elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucu sağlanan eşleşmelerden protein hakkında tanımlamaya gidilmektedir. Bunun için Mascot, Profound gibi farklı yazılım paketleri vardır. Bu veri tabanlarında peptid kütlelerinin sayıları protein

veritabanındaki her giriş için tahmin edilen kütleyle eşleştirilmektedir. Bu “PepSea” ve “MS-Fit” programlarının temel dayanağıdır. Genel olarak tüm bu yazılım paketleri iyi kalitedeki spektranın olduğu durumlarda iyi sonuçlar verir. Hangi program olursa olsun proteinlerin tanımlanması gözlemlenen proteinlerin sayısına, ölçümlerin doğruluğuna ve özel türlerin genom büyüklüğüne bağlıdır. Daha küçük genomlar için protein tanımlanmasında başarılı; daha büyük genomlar için ise başarı oranı önemli ölçüde düşer (Özcan ve diğ., 2007). Ancak buğday bitkisi büyük bir genoma sahip olmasına rağmen önemli bir besin kaynağı olması nedeniyle genom ve transkriptom düzeyinde çok çalışılmıştır. Son yıllarda proteomik çalışmaların sayısı da günden güne artmaktadır. Ayrıca tüm genomun dizilenmesine de başlanmıştır. Bu nedenle protein tanımlamasında başarı oranı hiç de az değildir. Son yıllarda ülkemizde de yetersiz olmakla birlikte, biyoinformatik alanında çalışma yapan ekiplerin oluşturulduğu görülmektedir. Biyoinformatiğin giderek önem kazanması sonucunda, biyoistatistikçiler kendilerini biyoloji alanında geliştirerek yapılan çalışmalara daha fazla katılmakta ve katkı sağlamaktadır.

2.4. BİTKİLERDE PROTEOMİK ÇALIŞMALAR

Proteomik çalışmaların başladığı 1995 yılından bugüne, insan ve maya gibi diğer organizmalarla karşılaştırıldığında bitki proteomik çalışmalarının sayısı oldukça azdır (Heazlewood ve Millar, 2006). Bitkisel dokulardaki sert hücre çeperleri, karmaşık ve çok çeşitli sekonder metabolitlerin varlığı, fazla miktardaki pigmentler, proteazlar, polifenoller, polisakkaritler, nişasta ve lipitler total protein örneklerinin hazırlanması ve proteinlerin ayrımı sırasında pek çok soruna neden olmaktadır. Çalışma zorluğuna ek olarak örneğin elde edildiği bitki dokusuna bağlı olarak Ribulose-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCo) gibi bazı proteinler yüksek miktarda bulunabilmekte ve düşük anlatımlı proteinleri maskeleyebilmektedir. Bu nedenle bu sorunu çözmek için tıpkı hücresel bileşenler, organeller ve multiprotein komplekslerinde olduğu gibi bitki proteom çalışmaları yapılmaya başlanmıştır (Robertson, 1997; Thielement ve diğ., 2006).

Bitki proteomik çalışmalarının yaygınlaştırılması konusunda gösterilen çabalara rağmen 2006-2007 yılı verilerine bakıldığında bitkiler alanında sadece 100 proteomik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı tüm genomları dizilenmiş birkaç bitkide yapılmıştır. Bunun nedeni proteomik çalışmalardan elde edilen peptid kütle parmakizi sonuçlarının tanımlanmasının kolayca mümkün olmasıdır. Bu çalışmaların 28 *Arabidopsis*, 11 pirinç ve diğer kalan 61 ise 24 farklı bitki türünde gerçekleştirilmiştir (Jorin ve diğ., 2007). 2007- 2008 yılları arasında ise yaklaşık olarak 250 tane yayınlanmış bitki proteomiği çalışması bulunmaktadır. Bu makalelerde genellikle *Arabidopsis thaliana* ve pirinç (*Oryza sativa*) üzerine yapılmıştır. Son yıllarda başka bitkilere ait tüm genom çalışmalarının yanı sıra birçok bitkide de çeşitli genomik araştırmalar yapılmaktadır. Böylece birçok bitki için çok sayıda dizi bilgisi veri bankalarına işlenmiştir ve bu veriler her geçen gün artmaktadır (Şekil 2.15). Bahsedilen gelişmeler sayesinde dünya genelinde daha çok bitkide proteomik çalışma yapılması yönünde çaba harcanmaktadır.



Şekil 2.15: 1995-2005 yılları arasında, çeşitli organizmalarda yapılmış proteomik çalışmaların sunulduğu makalelerin sayısı. Siyah renkli alanlar ise bitki proteomik makalelerini ifade etmektedir (Heazlewood ve Millar, 2006).

Buğdayda gerçekleştirilen proteomik çalışmaların sayısı da tüm zorluklarına rağmen azımsanmayacak düzeydedir ve bu çalışmalara; 1) çevresel koşulların ve gelişim sürecinin tohum depo proteinlerinin kompozisyonuna etkisinin incelenmesi, (Skylas ve diğ., 2000), 2) dane dolumu ile ilişkili biyokimyasal mekanizmaların çözümüne yönelik amiloplast proteinlerinin tanımlanması (Andon ve diğ., 2002) 3) sıcaklık stresinin dane dolumu ve kalitesine etkisinin belirlenmesi (Majoul ve diğ., 2003), 4) kromozom delesyonlarının tohum proteinlerinin anlatımına etkisinin ortaya konması (Islam ve Hirano, 2003a), 5) diploid, tetraploid ve hezaploid buğday genotiplerinde genom etkileşimlerinin proteom düzeyindeki yansımalarının incelenmesi (Islam ve Hirano, 2003b), 6) abiyotik (tuzluluk, kuraklık) stres etmenlerine karşı bitki tolerans cevabının aydınlatılması (Majoul ve diğ., 2000), 7) çeşitli fungal hastalıklara (*Fusarium graminearum*-head blight, *Bipolaris sorokiniana* –Black point ve *Puccinia triticina*-leaf rust) karşı direnç mekanizmalarının incelenmesi (Wang ve diğ., 2005; Rampitsch ve diğ., 2006; Zhou ve diğ., 2006) örnek olarak verilebilir

Bitkilerde genel olarak çeşitli kalite özelliklerinin incelenmesi, biyotik-abiyotik stres toleransı, hastalık ve dayanıklılık cevabı ile ilişkili protein profillerinin ortaya konması bu mekanizmalarda kilit rol oynayan (Tablo 2.1) proteinlerin belirlenmesi, biyomarkörlerin geliştirilmesine yönelik proteomik çalışmalar da yapılmaktadır (Renaut ve diğ., 2009).

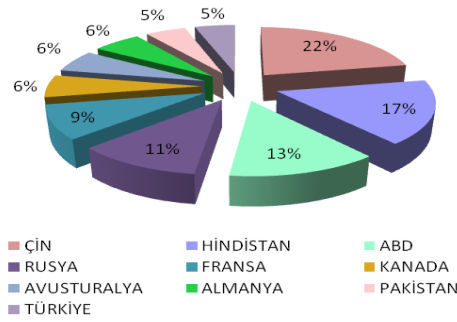
Bu şekilde gerçekleştirilen çeşitli amaçlara yönelik çalışmalar ile bitki proteom araştırmalarında karşılaşılan metodolojik zorlukların indirgenmesinin yanı sıra hassasiyeti ve çözünürlüğü geliştirip, karmaşıklığı azaltılmaya çalışılmaktadır.

Tablo 2.1: Bitkilerde yapılan proteomik çalışmalar

Bitki	Amaç	Referans
Biber (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Tüm kromoplastların proteom analizi	Siddique et al. , 2006
Buğday	Tüm amiloplastların proteom analizi	Balmer et al. , 2006
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hücre kültüründen izole edilen vakuollerin proteom analizi	Jaquinod et al. ,2006
<i>Arabidopsis thaliana</i> ve Arpa	Mezofil hücrelerinde yer alan vakuoler sükröz taşıyıcı yapıların belirlenmesi	Endler et al. , 2006
Pirinç (<i>Oryza sativa</i>)	Birincil kökler ile lateral köklerin karşılaştırmalı proteom analizi	Liu et al. , 2006
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kloroplast biyogenezindeki kusurların proteom analizi	Rudella et al. ,2006
Pirinç	Pirinçteki tüm etiyoplastların proteom analizi	Kleffmann et al. , 2007
Karnabahar Tomurcukları	Vakuollerin proteom analizi	Schmidt et al. , 2007
Ispanak (<i>Spinacia oleracea</i> L.)	Kloroplasttaki mRNA işleminin ve degradasyonunun proteom analizi	Baginsky et al. , 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Yapraklardaki peroksizomların proteom analizi	Reumann et al. , 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sitozolik ribozomların proteom analizi	Caroll et al. , 2007
Şeftali (<i>Prunus persica</i> L.)	Bitkilerin yüksek sıcaklığa karşı verdiği cevabın proteom analizi	Renaut et al. , 2008
Kara Kavak	Kadmiyum stresine karşı bitkilerin verdiği cevabın karşılaştırılması	Visioli et al. , 2009
<i>Agrostis</i> spp.	Sıcaklık stresine karşı köklerin verdiği cevapların proteom analizi	Xu et al. ,2009
Soya (<i>Glycine max</i>)	Soyanın tuz stresinin belirlenmesi kök ve hipokotillerindeki proteom analizi	Aghaei et al. , 2009
Buğday	Su stresine maruz buğday kök hücrelerinde su stresi cevabının aydınlatılması	Kong et al. , 2009

2.5. BUĞDAY VE SARI PAS HASTALIĞI

Tez çalışmasında bitki materyali olan buğday (*Triticum aestivum* L.), buğdaygiller (Poaceae) ailesinden gelen, karasal iklimi tercih eden ve bütün dünyada ıslahı yapılmış tek yıllık otsu bir bitkidir (Chen ve diğ., 2005). Türkiye buğday üretimi açısından dünyadaki önemli üreticilerden biridir (Şekil 2.16). Dünyada da üretim açısından ilk sıralarda yer almaktadır (Tablo 2.3).



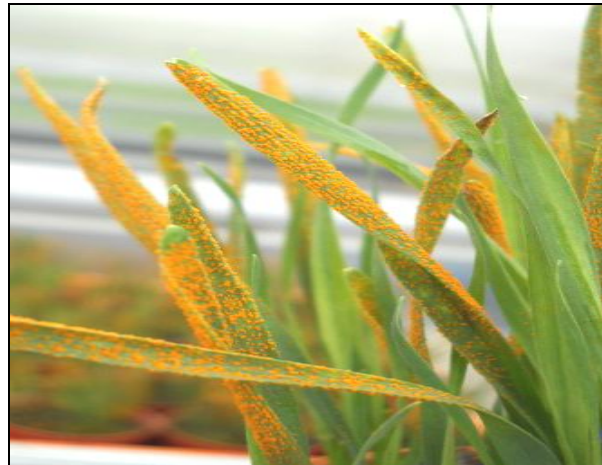
Şekil 2.16: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar (<http://faostat.fao.org>, 20 Ağustos 2008)

Tablo 2.2: Ülkelerin yıllara göre ürettikleri buğday miktarı (milyon ton) (<http://en.wikipedia.org>, 5 Nisan 2011)

Ülkeler	2009	2008	2007	2006	2005
EU	138.7	150.3	120.1	126.7	135.4
China	115.0	112.5	109.9	104.5	96.3
India	80.7	78.6	74.9	69.4	72.0
Russia	61.7	63.7	49.4	45.0	47.6
United States	60.3	68.0	53.6	57.3	57.1
France	38.3	39.0	33.2	35.4	36.9
Canada	26.5	28.6	20.6	27.3	25.6
Germany	25.2	26.0	21.4	22.4	23.6
Pakistan	24.0	21.0	23.5	21.3	21.6
Australia	21.7	21.4	13.0	10.8	25.1
Ukraine	20.9	25.9	13.8	14.0	18.7
Turkey	20.6	17.8	17.7	20.0	21.0
Kazakhstan	17.0	12.6	16.5	13.5	11.1
United Kingdom	14.4	17.2	13.4	14.7	15.0
Iran	13.5	8.0	15.9	14.5	14.5
Poland	9.8	9.3	8.4	7.1	8.6
Egypt	8.5	8.0	7.4	8.3	8.1

Kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık miktarının azlığı veya fazlalığı, gelişim için gerekli olan maddelerin yetersizliği, pestisitler ve ağır metaller abiyotik stres etmenleri; virus, bakteri, mantar gibi patojenler, böcek gibi zararlılar ve diğer organizmalar biyotik stres etmenleri arasında yer alır (Comai ve Madlung, 2004). Biyotik ve abiyotik stresler, ekonomik önemi olan tahıllar dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmakta, bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltmakta, normal fonksiyonlarını değiştirmekte ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilmektedir (Lichtenhaler, 1996). Buğday üretimini etkileyen pek çok biyotik ve abiyotik stres etmenleri arasında pas hastalıkları önemli yer tutar. Pas hastalıkları dünya genelinde buğday ekim alanlarında verimi azaltan en önemli etmenlerdendir (Düşünceli ve diğ., 1999). Buğdayda ortaya çıkan pas hastalıkları; kök pası, yaprak pası ve sarı pastır. Bu hastalıkların her birine, *Puccinia* denen pas mantarının belli bir türü neden olmakta ve bitkideki görünümüne göre isimlendirilmektedir (Marsalis ve Goldberg, 2006). Genel olarak pas hastalıkları, bitki direncini azaltmakta, yetişkin bitkilerde tohum olgunlaşmasını sınırlamakta ve çiçeklenme sırasında veya öncesinde birçok zarara neden olmaktadır.

İlk kez Gadd tarafından Avrupada 1777 yılında tanımlanan sarı pas hastalığı (Eriksson ve Henning, 1896), adını mantarın sarı renkli sporlarından almaktadır. Yapraklarda ve başaklarda oluşan sarı renkli üredinianın ip şeklindeki görüntüsünden (Şekil 2.17) dolayı “çizgi pası” da denmektedir (Curtis ve diğ., 2002).



Şekil 2.17: Enfekte buğday yaprağında *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici* sporlarının görünümü
(fotoğraf kaynağı: TÜBİTAK 109T293 no'lu proje çalışmasından)

Sarı pas hastalığı ülkemizde de hemen hemen bütün bölgelerde görülmektedir ve verimsiz tohum eldesi sonucunda % 80 lere varan önemli derecede ürün kaybına neden olmaktadır. Hastalık yaprak, sap ve başaklarda görülmekle birlikte, tipik belirtilerin görüldüğü yer yapraklardır. Yaprakların üst yüzeyinde makina dikişi şeklinde ve sarı renkte püstüller oluşur. Bu püstüllerin dizilişi bir çizgiyi andırdığı için bu pasa çizgi pası da denilmektedir (Tör, 1998).

Hastalık buğday tarlalarında ilkbaharda hava sıcaklığının 10-15°C (optimum 11°C) olduğu zaman görülmeye başlar. Enfeksiyonun oluşumunda sıcaklık ve nem çok önemlidir. Patojen spor nemli bir bitki yüzeyi ile karşılaştığında çimlenmesi tetiklenmekte ve çimlenme tüpleri gelişerek bitki hücrelerinin içlerine kadar nüfuz etmektedir. Hastalığın gelişimi için şartlar uygun olduğunda enfeksiyon 6-8 saatte tamamlanmakta iki hafta sonra püstüllerden hastalığın yayılmasına neden olacak özellikteki ürediosporlar oluşmaktadır (Roelfs ve diğ., 1992).

Bitkilerde stres etmenlerinin neden olduğu zararların en aza indirgenmesinde kullanılan en etkili ve çevreci yöntem dayanıklı genotiplerin kullanılmasıdır (Li ve diğ., 2006). Bu genotiplerin geliştirilmesinde dayanıklılıkla ilişkili kilit göreve sahip proteinlerin ve bu proteinleri şifreleyen genlerin belirlenmesi son derece önemlidir. Bu nedenle buğdayda sarı pas hastalığı ile ilişkili olarak ulusal ve uluslar arası birçok araştırma kuruluşunda bu genlerin belirlenmesine yönelik moleküler düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda genom ve transkriptom düzeyinde pek çok bilgi elde edilmiş ancak bu bilgilere rağmen dayanıklılığın nasıl oluştuğu tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun en önemli nedeni, genomik ve transkriptomik verilerden yola çıkılarak öngörülen proteinlerin varlığının, miktar ve popülasyonunun hücrede bulunan proteinlerle örtüşmemesidir (Anderson ve Seilhammer, 1997). Buğdayda sarı pas dayanıklılık mekanizmasında iş gören hedef enzim ve proteinlerin belirlenmesinde proteomiğin sunduğu olanaklardan yararlanmak son derece önemlidir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Sunulan tezin deneysel çalışmaları iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamayı oluşturan “optimizasyon çalışmaları”, total proteinlerin iki boyutlu sıvı kromatografi sisteminde yüksek çözünürlükte ayrımının sağlanacağı en uygun koşulları belirlemek üzere yapılan deneyleri kapsamaktadır. İkinci aşama da ise sistemin bitki proteomiği alanında kullanımına yönelik bir model çalışma gerçekleştirildi. Bu model çalışmada “buğdayda dayanıklılık cevabında rol oynayan proteinlerin belirlenmesi” kapsamında *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ürediosporları ile enfekte edilmiş ve enfekte edilmemiş kontrol gruba ait total protein örneklerinin 2D-LC sisteminde ayrımı, karşılaştırılması ve farklı anlatım düzeyine sahip proteinlerin tanımlanması çalışmaları yer almaktadır.

3.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

3.1.1. Bitki Materyali Hazırlığı

Bu tez çalışmasında, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) tarafından geliştirilerek tescil edilmiş olan (İzgi2001) kışlık ekmeklik buğday çeşidi bitki materyali olarak kullanıldı. Bu çeşide ait 100 adet tohum steril torf toprağı içeren plastik saksılara ekildi. Tohumlar çimlendikten sonra 15 günlük genç fideler 15 gün sonra 2 yapraklı dönemde iken hasat edilerek sıvı azotta şok dondurmaya maruz bırakıldı ve protein izolasyonu yapıncaya kadar -80°C de muhafaza edildi.

3.1.2. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu, proteomik çalışmalarda total protein örneklerinin II boyutlu ayrımının daha hassas ve daha doğru biçimde yapılabilmesi için ilk ve en önemli aşamadır. Bu nedenle öncelikle literatür çalışması yapılarak buğday proteomiği çalışmalarında kullanılan protein izolasyon yöntemleri belirlendi. Bunlar arasında yaygın olarak kullanılan TCA/Aseton yöntemi ile yaprak dokularında yoğun olarak bulunan RuBisCo proteinlerinin ayırmaya olanak tanıyan Mg/NP40 yönteminin tez çalışması kapsamında uygulanmasına karar verildi.

3.1.2.1. TCA/Aseton Yöntemi ile Protein İzolasyonu

Damerval (1986) tarafından geliştirilen TCA/Aseton yöntemi için kullanılan çözeltiler;

PVPP (Sigma77627) ; 0.1 gr PVPP (1 gr doku için)

TCA; 100g TCA (Sigma T9159), 100 ml saf suda çözündürüldü.

% 10 TCA/ ASETON; 10 ml TCA, 90 ml aseton (J.T. Baker 8002) ile karıştırıldı ve % 0.07 olacak şekilde DTT (Sigma 43815) ilave edilip çözündürüldü.

Yıkama Solüsyonu ; % 0.07 olacak şekilde tartılan DTT 100 ml aseton içinde çözündürüldü.

Çözündürme Solüsyonu ; 7 M Urea (Sigma U0631) , 2 M Thiurea (Sigma T7875) , % 2 Chaps (Sigma C3023) , % 1 DTT olacak şekilde tüm bileşenler tartılıp tek tek 50 ml çift distile suda çözündürüldü ve son hacmi 100 ml ye tamamlandı.

Proteaz İnhibitör Karışımı (Sigma P9599) ; Toz halde bulunan proteaz inhibitör karışımı içeriği 1 ml çift distile suda çözündürüldü. 1 gr doku için 50 µl kullanıldı.

Yöntemin uygulanmasında ilk adım, dokuların parçalanması ve hücre içeriğinin serbest hale getirilmesidir. Bunun için 1 gr yaprak dokusu sıvı azot kullanılarak soğuk koşullarda vibrasyonlu öğütücüde (RETSCH MM301) iyice toz haline gelene kadar parçalandı. Parçalama işlemine başlamadan önce polissakkarit bileşiklerinin proteinlere bağlanmasını engellemek için yaklaşık olarak 1 gr yaprak dokusuna 0.1 gr PVPP ilave edildi. Parçalamanın ardından dokular üzerine 10 ml %10 TCA/aseton ilave edilerek dokular iyice homojenize edildi ve homojenat ilk 4 saat her 20 dakikada bir vortekslenerek -20°C de gece boyu bekletildi. Daha sonra 5600 rpm de +40°C de 15 dakika santirfuj edilerek proteinler çöktürülüp üst faz atıldı. Pelletin üzerine 10 ml yıkama çözeltisi ilave edilerek vortekslendi ve -20°C de 1 saat bekletildi. 6000 rpm de 10 dakika santrifujlendikten sonra üst sıvı atıldı. Bu işleme yıkama çözeltisi renksiz hale gelene kadar devam edildi. Son yıkama işleminden sonra üst sıvı atıldı ve pellet oda sıcaklığında aseton kokusu kalmayınca kadar kurutuldu. Kurutulan protein çökeltisi 2 ml çözündürme solüsyonu ve 50 µl protez inhibitör karışımı ilave edilerek içinde çözündürüldü. Çözünmeyi artırmak için 5 kez 5 saniye 7 W sonikasyon (MSE soniprep 150) uygulandı. Daha sonra protein olmayan küçük molekül ağırlıklı bileşenleri ve nükleik asitleri uzaklaştırmak üzere yüksek devirde santirfuj aşamaları yonteme eklendi (Rampitsch, 2006). Bunun için önce 30.000 xg de 30 dakika sonra ise 100.000 xg de 1 saat santirfuj edildi. Çökelti atıldı ve total protein karışımınının 100 µl si miktar tayini ve

protein kalitesinin değerlendirebilmesi için ayrıldı, kalanı ise yapılacak işlemler için Lo-Bind tüplere alınarak II boyutlu ayırma başlayınca kadar -80°C de saklandı.

3.1.2.2. Mg/NP-40 Yöntemi:

Yaprak dokularından izole edilen total protein içeriğinin yaklaşık % 50 sini RuBisCo proteinleri oluşturmaktadır. Bu tip yoğun proteinler anlatım düzeyi düşük proteinleri maskelediğinden proteomik çalışmalarda önemli bir sorun oluşturmaktadır. Mg/NP40 yöntemi bu soruna yönelik olarak RuBisCo proteinlerinin eliminasyonu için Kim ve diğeri (2003) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler;

PVPP ; 0.1 gr PVPP (1 gr doku için)

Lizis Tampon ; 0.5 M TrisHCl pH 8.3 (Roche 122010), % 2 Igepal (Sigma I7771) , 20 mM MgCl₂ (Sigma M8266) , % 2 Beta-Mercaptoethanol, (Applichem A1108) , 1 mM PMSF (Sigma P7626) olacak şekilde tüm bileşenler tartılıp tek tek 50 ml çift distile suda çözüldürüldü ve son hacmi 100 ml ye tamamlandı.

%50 PEG4000 ; 50 gr PEG4000 (Sigma 95904) 100 ml çift distile suda çözüldürülmüştür.

Proteaz İnhibitör Karışımı (Sigma P9599) ; 1 ml çift distile suda çözüldürüldü. 1 gr doku için 50 µl kullanıldı.

Çözüldürme Solüsyonu ; 7.5 M Urea (Sigma U0631), 2.5 M Thiurea (Sigma T7875), % 12.5 Gliserol (Sigma 6279), 62.5 mM TrisHCl pH 7.8, 6.25 mM Tris (2 carboksietil fosfin, TCEP) (Sigma C4706), % 12.5 Oktil Beta –D-glukopironosid (OG) (Sigma 08001)

Bu yöntem ile 1 gr yaprak dokusu 0.1 gr PVPP ilave edilerek TCA/Aseton yönteminde anlatıldığı şekilde iyice toz haline gelene kadar parçalandı. Toz haline getirilmiş olan yaprak dokularının üzerine 10 ml lizis tamponu ilave edildi ve 10-20 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 3000 rpm de $+4^{\circ}\text{C}$ de 15 dakika santirfüj edilerek protein olmayan hücre artıklarının çökmesi sağlandı ve üst faz yeni tüpe alındı. Üzerine son konsantrasyonu % 15 olacak şekilde % 50 lik PEG4000 den ilave edildi ve 30 dakika buzda bekletildi. Bu süreçde 10 dakika aralıklarla kısa kısa vortekslendi. Süre sonunda 12.000 rpm de $+4^{\circ}\text{C}$ de 15 dakika santirfüj edilerek RuBisCo proteinlerinin çökmesi sağlandı. Üst kısım yeni tüpe alındı ve üzerine proteinlerin çökmesi için 4 hacim soğuk aseton ilave edilerek -20°C de gece boyu bırakıldı. Ertesi gün 14.000 rpm de $+4^{\circ}\text{C}$ de

10 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Protein çökeltisi pigmentlerden temizlenmek üzere 5-6 kez soğuk aseton ile yıkandı. Bunun için pellet üzerine 10 ml soğuk aseton ilave edilip vortekslendi ve en az 1 saat -20°C de bırakıldı. Ardından 6000 rpm de $+4^{\circ}\text{C}$ de 10 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atıldı. Bu işlem üst sıvı renksizleşene kadar devam ettirildi. Son yıkamadan sonra üst sıvı atıldı ve protein çökeltisi aseton kokusu gidene kadar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Pellet kurduktan sonra 2 ml çözündürme solüsyonu ve 50 μl proteaz inhibitör karışımı ilave edilerek çözündürüldü. Çözünmeyi arttırmak üzere 7 W da 5 kez 5 saniye sonikasyon uygulandı. Daha sonra 30.000 xg de 30 dakika ardından da 100.000 xg de 1 saat santrifüj edilerek protein olmayan moleküller uzaklaştırıldı. İzole edilen proteinlerin 100 μl si Bradford yöntemiyle miktar tayini ve tek boyutlu SDS-PAGE analizi için ayrıldı. Kalan kısmı LoBind tüplere alınarak II boyutlu ayırım yapıncaya kadar -80°C de muhafaza edildi.

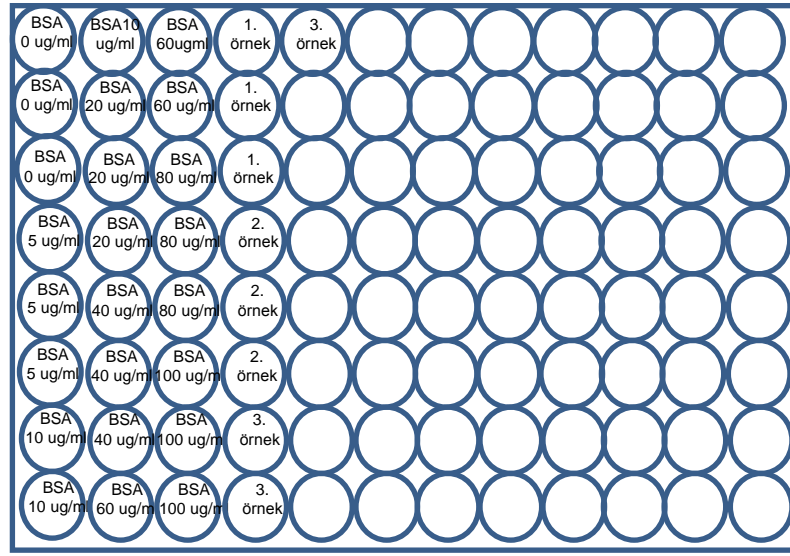
3.1.3. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

Bu yöntem organik boya ların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Yöntemde öncelikle 0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralığında BSA standartları hazırlandı. İzole edilen proteinleri çözmek için kullanılan solüsyonda bulunan bazı kimyasallar Bradford reaktifi ile etkileşime girebilmekte ve protein ölçümünde yanıltıcı sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle izole edilen proteinleri çözündürmek amacıyla kullanılan çözündürme solüsyonu, 1/10 oranında sulandırılarak BSA standartlarının hazırlığında da kullanıldı. BSA standartları 1 mg/ml stok standartın Tablo 3.1 verildiği biçimde sulandırılması ile hazırlandı. Aynı şekilde protein örnekleride 1/10 oranında sulandırılarak ölçüm yapıldı.

Tablo 3.1: BSA standartlarının hazırlanması

BSA Standartları ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Stok BSA Standardı (1 mg/ml)	Çözündürme Solüsyonu (1/10 Sulandırılmış)
0	-	1000 μl
5	5 μl	995 μl
10	10 μl	990 μl
20	20 μl	980 μl
40	40 μl	960 μl
80	80 μl	920 μl
100	100 μl	900 μl
140	140 μl	860 μl

Hem BSA standartları hem de protein örnekleri 3 tekrarlı 10 µl olacak şekilde 96 kuyulu mikropalakalara konuldu ve üzerlerine 200 µl 1X Bradford çalışma solüsyonu eklendi (Şekil 3.1). Hazırlanan karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklarda Bradford solüsyonunun proteinlerle etkileşerek oluşturduğu renkli bileşiğin 595 nm deki absorbans değerleri fluorometre ile (Bio-rad 3550) ölçüldü. Absorbansa karşılık BSA standart grafiği elde edildi. Örneklere ait absorbans değerleri bu grafikte karşılaştırılarak protein miktarı hesaplandı.



Şekil 3.1: Bradford yöntemiyle protein miktar tayininde mikropalakada BSA standart ve örneklerin yerleşimi

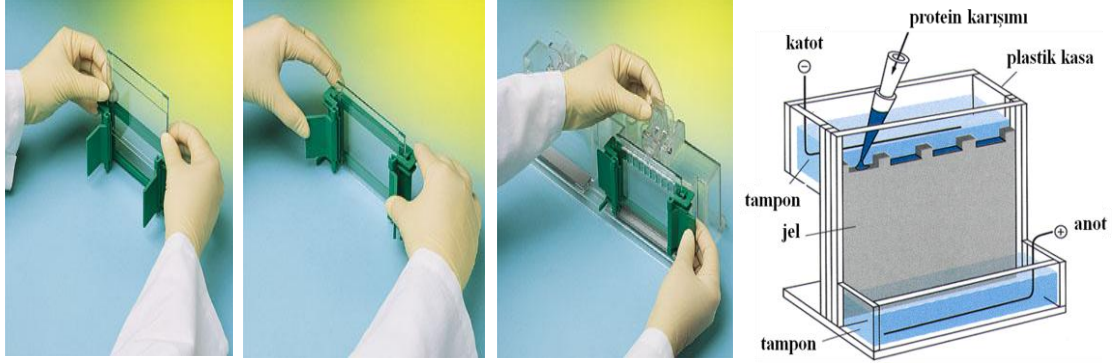
3.1.4. Proteinlerin Tek Boyutlu SDS-PAGE'de Analizi

İzole edilen proteinlerin kalitesi, tek boyutlu SDS-PAGE jelde elektroforez yapılarak analiz edildi.

3.1.4.1. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması

Jel solüsyonları hazırlanmadan önce kullanılacak olan cam malzemeler iyice temizlendi. Bunun için önce sabunlu su ile yıkandı. Daha sonra distile su ile iyice durulandı ve son olarak etanol ile silinip kimwipes adı verilen özel bir kağıt mendil ile kurulandı. Kurulanan cam plakalar, jel kasedi içine uygun bir şekilde yerleştirildi, kenarlardan sabitlendi ve jel kaseti standına oturtuldu (Şekil 3.2). Hazırlanan düzeneğe pastör pipeti

ile bir miktar su koyularak sızıntı olup olmadığı kontrol edildi ve jel solüsyonları hazırlanmaya başlandı



Şekil 3.2: Tek boyutlu SDS-PAGE için düzeneğin hazırlanması

Kullanılan SDS-PAGE jeli farklı poliakrilamid konsantrasyonuna sahip 2 kısımdan oluşmaktadır. % 4 poliakrilamid içeren üst jel yığılma, % 12.5 luk poliakrilamid içeren alt jel ise ayırma jeli olarak adlandırılmaktadır.

Alt Jel Hazırlanması (%12.5) ; 2.5 ml 1.5 M TrisHCl (pH:8,8), 3.26 ml dH₂O, 10 µl SDS (% 10), 4.17 ml Akrilamid/Bisakrilamid (19:1) , 50 µl Amonyumpersülfat (APS) (Sigma A9164), 10 µl TEMED (Sigma,T7024)

TrisHCl, dH₂O, SDS ve Aciylamide/Bisaciylamide iyice karıştırıldıktan sonra vakumla 15 dakika degaze edildi. Karşıma APS ve TEMED ilave edilip hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek iyice karıştırıldı. Alt jel, kasetin 1/5 ini boş bırakacak şekilde döküldü. Polimerleşme sırasında jelin üst yüzeyinin düzgün olması için jelin üst yüzeyini kaplayacak kadar % 0.1 SDS ya da su ile doyurulmuş bütanol ilave edildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat sürmüştür. Bu süre içinde üst jel hazırlandı.

Üst Jel Hazırlanması (%4.5) ; 625 µl 1 M TrisHCl pH 6.8, 3.59 ml dH₂O, 5 µl SDS (% 10), 750 µl Akrilamid/Bisakrilamid (19:1) , 25 µl APS, 10 µl TEMED

TrisHCl, dH₂O, SDS, Aciylamide/Bisaciylamide iyice karıştırılıp vakumla 15 dakika degaze edildi. Daha sonra karışıma APS ve TEMED ilave edilip hava kabarcığı

kalmayacak şekilde iyice karıştırıldı. Polimerize olan alt jelin üzerindeki bütanol boşaltılıp su ile iyice yıkandıktan sonra hazırlanan üst jel karışımı düzgün bir biçimde ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel kasetinin tamamı dolana kadar dökülüp tarak yerleştirildi.

3.1.4.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi

Jel Yükleme Boyaması; % 1 SDS, % 0.1 bromofenol blue olacak şekilde distile suda çözüldü.

10X running buffer; 30 gr Tris base, 144 gr Glycine, 1 gr SDS distile suda çözüldürülmüş ve hacmi 1lt ye tamamlanmıştır.

Örnekleri yüklemeye önce jel içeren kaset tanka yerleştirildi ve jelin üstünü kapayacak şekilde 1X yükleme tamponu ile dolduruldu. İzole edilen total protein örneklerinden 10 µl alınarak üzerine 2 µl yükleme boyası ilave edilip karıştırıldı. Hazırlanan örnekler ve 5 µl protein markerı 95°C de 2 dakika inkübe edilerek denatüre edildi ve jelin kuyucuklarına yüklendi. Örnekler alt jele gelene kadar 80 V, alt jele geldiğinde ise 120 V elektrik akımı uygulandı. Elektroforez tamamlandıktan sonra coomassie boyama yöntemi kullanılarak protein bantları görüntülendi.

3.1.4.3. Coomassie Boyama

Coomassie Boyası; % 0.1 (w/v) olacak şekilde Coomassie Brilliant Blue (R-250-Sigma B0149) boyası, % 50 (v/v) etanol ve % 10 (v/v) asetik asit karışımında çözdürüldü. Hazırlanan boya karışımı, 0.45 µM selüloz asetat membran filtreden (whatman OE 67) filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

Destain Solüsyonu; % 10 metanol ve % 7 asetik asit

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel kasetten çıkarıldı ve 1 dakika H₂O ile yıkandı. Jel daha sonra, coomassie boyama çözeltisine kondu ve en az 1 saat 75 rpm de çalkalayarak bekletildi. Boyanan jelin arkafonu renksizleşene kadar yıkama çözeltisi ile muamele edildi.

3.1.5. Proteinlerin İki Boyutlu Ayrımı

İzole edilen proteinlerin ayrımı, son yıllarda sunduğu önemli avantajlar nedeniyle kullanımı yaygınlaşmakta olan 2 boyutlu sıvı kromatografi sisteminde gerçekleştirildi. Sunulan tez çalışmasında kullanılan kromatografi sistemi, Beckman Coulter firması tarafından geliştirilmiş olan PF-2D sistemidir. Sistemin düzgün biçimde çalışabilmesi için gerekli olan hazırlık aşamaları örnekler yüklenmeden önce gerçekleştirildi

3.1.5.1. Cam Malzemelerin Hazırlanması

PF-2D de kullanılacak olan tüm cam malzemeler herhangi bir yağ ve protein kirliliği taşımaması için özel bir yıkama işleminden geçirildi. Buna göre önce tüm cam malzemeler HPLC sınıfı sudan (Sigma 3877) geçirildi. Daha sonra %99.5 saflıktaki 2-Propanol (Riedel-de Haen, 24137) ile çalkalandı. Hemen ardından tüm malzemeler sırasıyla diklorometan (Sigma, 34856) ve hekzan (Sigma, 34859) ile yıkandı. Daha sonra tekrar diklorometan ve 2-propanolden geçirilip son olarak HPLC sınıfı su ile durulanarak kurutuldu.

3.1.5.2. Solüsyonların Hazırlanması

2D-LC sisteminde yer alan iki modülde proteinlerin farklı özellikleri esas alınarak ayırım yapıldığı için farklı solüsyonlar kullanılmaktadır. I.boyut ayırımında start tampon, eluent tampon, hiss adı verilen yüksek iyonik kuvvetli solvent ve HPLC sınıfı su kullanılmaktadır. Start ve eluent tamponları I. boyutta pH gradiyenti oluşturmak üzere kullanılmakta ve böylece proteinlerin ayrımı pI noktalarına göre yapılmaktadır. Bu nedenle bu solüsyonlar özel bir öneme sahiptir ve I. ve II. boyut ayırımında kullanılacak olan kolonlar ile birlikte ticari olarak satılmaktadır. Ancak maliyeti son derece yüksek olan bu tamponların ithalatı da uzun sürebilmektedir. Bu süreçte soğuk zincirin kırılması gibi bir durum olduğunda tamponlarda bozulma gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında start ve eluent tamponlar Barre ve Solioz (2006) makalesinden yararlanarak laboratuarda kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

Start Tampon: 6 M urea, 25 mM Bis-Tris (Sigma 14879) ve %0.2 OG, 500 ml ultra saf suda çözüldü. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra 1 M amanyum hidroksid ile pH ı 8.5 e ayarlandı ve ultra saf su ile hacmi 1 lt ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon daha

sonra 0.2 µm selüloz asetat membran filtreden (Whatman OE 67) geçirildi ve ışık almaması için koyu renkli şişelerde +4°C de saklandı.

Eluent Tamponu; 6 M Urea, % 10-12.5 v/v Polybuffer ve % 0.2 OG 500 ml ultra saf suda çözüldürüldü. Solüsyonun pH sı iminodiasetik asit ile 4 e ayarlandıktan sonra hacmi 1 lt ye tamamlandı. Daha sonra start buffer da olduğu gibi 0.2 µm selüloz asetat membran filtreden geçirildi. Işık almaması için koyu renkli şişelere konulmuş ve kullanıma hazır halde +4°C ye kaldırıldı.

Hiss Tampoinu; 1 M NaCl ultra saf suda çözüldürülüp, hacmi 1lt ye tamamlandı. Membran filtreden geçirildikten sonra kullanıma hazır halde +4°C de muhafaza edildi.

HPLC Sınıfı Su; Ticari olarak temin edildi.

Sistemin 2. modülünde proteinler hidrofobisitelere göre ayrılmaktadır. Bu nedenle oluşturulacak hidrofobisite gradiyenti için su ve asetonitril kullanıldı. Ayrıca bu solüsyonlara iyon baskılayıcı ajan olarak TFA (trifluoroacetic acid) ilave edildi.

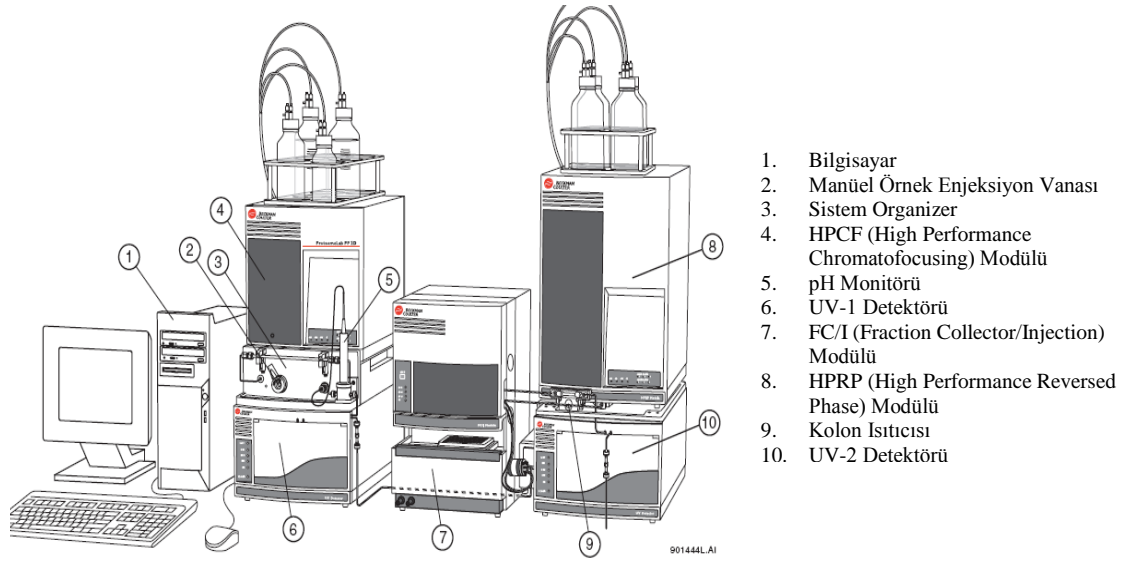
% 0.1 TFA içeren su; TFA son derece uçucu ve toksik olduğundan çeker ocak altında hazırlık yapıldı. 1 ml TFA (J.T Baker 9470) 1 lt HPLC sınıfı su içine konarak iyice karıştırıldı.

% 0.08 TFA içeren asetonitril; 800 µl TFA 1lt asetonitril(Sigma 34967) içine ilave edilerek iyice karıştırıldı.

3.1.5.3. PF-2D Cihazının Hazırlanması

ProteomeLab PF-2D sistemi ve sistemi oluşturan kısımlar Şekil 3.3 de sunulmuştur.

Sistemin birinci boyut modülü; Manual enjektör, HPCF modül, pH monitor, UV detektör ve fraksiyon toplayıcı (FC/I); ikinci boyut modülü; FC/I, HPRP modül, Kolon ısıtıcı ve UV detektör kısımlarını içermektedir.



Şekil 3.3: PF-2D sistemi

Örnek yüklenmeden önce cihazın hazırlığı için bir takım işlemler gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle start ve eluent tamponun oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Bu arada cihazın tüm modüllerinin düğmeleri açıldı ve sistemi yöneten 32 Karat S/W programı çalıştırıldı. Start ve eluent tamponların pH'larının ölçümünde ve I. boyut ayırım sırasında kolonda oluşturulan gradient sırasındaki pH ölçümlerinde, pH probu farklılığından kaynaklanan bir sorunla karşılaşmamak için aynı probun kullanımı zorunludur. Bu amaçla pH probu gerektiğinde PF-2D cihazına monte edilmekte, gerektiğinde ise cihazdan bağımsız olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla probun, öncelikle değerlerine sahip pH standartları (4, 7 ve 10.01) ile doğru ölçüm yapıp yapmadığı kontrol edildi ve gerektiğinde kalibrasyon yapıldı. Tamponlar oda sıcaklığına geldiğinde pH değerleri kontrol edildi. Start tampon için pH değerinin 8.5, eluent tampon içinse 4.0 olması gerekmektedir. Bu nedenle tampon pH larında değişim olmuşsa NaOH ve IAA ile pH ayarları yapıldı ve 5 dakika degaz işlemi uygulandı. Ardından I. modül için gerekli olan Hiss ve su solüsyonlar ile birlikte cihazda uygun yerlerine yerleştirildi ve sisteme akış sağlayacak hatlar solüsyonlar içine kondu. Tüm hatların açık olduğu ve sıvı akışının rahat biçimde sağlandığı, atık kanalının açık ve işler olduğu kontrol edildi. Daha sonra A4 (su) hattından 0.2 ml / 0.5 dakika olacak şekilde sıvı geçişi başlatıldı. Bu akış sırasında pompa basınçları ve I.boyut kolonun yerinde bulunan plastik tubinglerde sıvı geçişinin olup olmadığı kontrol edildi. Sonra akış durduruldu ve I. boyut kolonu (HPCF) sisteme monte edildi. Bunun için kolon

yerinde bulunan plastik tubingler çıkarılarak kolon yerleştirildi. Kolonun, sıvı akış yönündeki çıkış kısmı açık bırakılarak 0.2 ml / 0.5 dakika akış hızında su geçişi başlatıldı. Kolondan su çıkışı görüldükten sonra çıkış ucuda kapatılarak 45 dakikalık su geçişine başlandı. Bu arada II. boyut modülü için gerekli olan % 0.1 TFA-su ve % 0.08 TFA-asetonitril solüsyonları yerlerine kondu ve hatları yerleştirildi. I. boyut modülünde olduğu gibi hatlardan sıvı akışının sorunsuz biçimde sağlandığı ve atık kanalının açık olduğu kontrol edildi. II. boyuttan 0.75 ml / 0.5 dakika akış hızı ile TFA-su solüsyonu geçirilerek pompa basınçları ve tubinglerdeki sıvı geçişleri kontrol edildi. Her şeyin yolunda gittiği belirlendikten sonra akış durdurularak II. boyut kolonu (HPRP) sisteme monte edildi. Kolonun çıkış ucu açık bırakılarak sıvı akışı tekrar başlatıldı ve kolondan sıvı çıkışı gözlemlendikten sonra bu uca kapatılıp kolon 50°C ye ayarlanmış olan ısıtıcı blok içine yerleştirildi. Kolonda 0.75 ml / 0.5 dakika akış hızında TFA-su geçişi başlatıldı. Sistemin hem I. boyut hem de II. boyut modülünden 1 saat su geçişi sağlandıktan sonra, her iki modülün UV dedektörlerinde bulunan lambaların kalibrasyonu yapıldı. UV kalibrasyonu ayda 1 kez olacak şekilde yapıldı. Tüm bu hazırlıklar tamamlandıktan sonra HPCF kolonunun dengelenmesi ve kolon içi pH değerinin 8.5 a çıkarılması için I. boyut modülden 0.2 ml / 0.5 dakika akış hızında start tampon geçişi başlatıldı ve minimum 210 dakika devam ettirildi. Bu süreç içinde ayrımı yapılacak olan protein örnekleri sisteme yüklenmek üzere hazırlandı. Örnekler cihaza yüklenmeden önce cihazın I. modülünde bulunan fraksiyon toplayıcı (FC/I) modülüne (Şekil 3.3) 1 adet 2 ml lik 96 kuyulu özel mikroplak Grainer (780270) yerleştirildi ve 32 Karat programında yer alan “Needle Wash” ve “FC/I cooling on” işlemleri gerçekleştirilerek fraksiyon iğnesi temizlendi ve fraksiyon toplayıcının tablası soğutuldu. Bu sayede plağın doğru yerleştirildiği ve fraksiyon toplayıcının doğru biçimde çalıştığı kontrol edildi. Needle wash işlemi FC/I ünitesi içindeki şişede yer alan % 20 metanol ile gerçekleştirildi. Aynı şekilde II. boyut modülünde bulunan fraksiyon toplayıcıyada 8 adet 2 ml lik 96 kuyulu mikroplakla (Greiner Bio-one 780270) yerleştirildi.

3.1.5.4 Protein Örneklerinin Hazırlanması

İzole edilen protein örneklerinin PF-2D sistemine yüklenmeden önce sistemle uyumlu olan start tamponu içine alınması ve tuzlardan temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla -80°C de muhafaza edilen örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra PD-10(GE Healthcare, W396289) kolondan geçirildi. PD-10 kolon bir tutacağa tutturuldu ve altına 100 ml'lik bir beher yerleştirildi. Alt ucu kesilerek açıldı ve kolondan 25 ml start tampon geçirilerek dengelendi. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen örneklerin hacmi aynı buffer ile 2.5 ml'ye tamamlanıp kolona yüklendi. Örnek tamamen kolondan geçtikten sonra 3.5 ml start tampon kolona ilave edildi ve temiz bir tüple kolonun alt ucundan örnek toplanmaya başlandı (Şekil 3.4). Toplam 3.5 ml start tamponu içinde geri kazanılan örneklerdeki protein miktarı BCA analizi ile belirlendi.



Şekil 3.4: Örneklerin PD-10 kolondan geçirilmesi

3.1.5.5. BCA Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

BCA (bikinkonik asit) protein tayin yönteminde bakır sülfat, çalışma solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk verir. Bu solüsyona protein karışımı ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşerek Cu^{++} iyonları Cu^+ iyonlarına dönüşür ve kompleksin rengini mora çevirir. Örneklerin PD-10 kolondan geçirilmesinin ardından tekrar miktar tayini yapılarak PF-2D sistemine yüklenecek protein miktarını belirlemek gerekmektedir. Proteinin geri kazanıldığı start tamponu Bradford reaktifi ile güçlü biçimde etkileştiği için bu aşamada protein miktar tayini BCA yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde de öncelikle 0-100 μg / ml aralığında BSA standartları hazırlandı. BSA standartlarının hazırlanmasında, Bradford yönteminde olduğu gibi protein örneklerinin içinde bulunduğu start tamponu 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı. BSA/standartları 1 mg/ml stok standarttan Tablo 3.2 gösterildiği biçimde sulandırılarak hazırlandı. Aynı şekilde miktar tayini yapılacak örneklerde 1/10 oranında sulandırıldı. BSA standartları ve örneklerden 110 μl 3 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu mikropalakalara yerleştirildi. Üzerlerine 110 μl BCA çalışma solüsyonundan 25 hacim QA, 25 hacim QB ve bir hacim QC ilave edildi. Dikkatli biçimde karıştırıldı.

Tablo 3.2: BCA yöntemi

Standart Aralığı ($\mu\text{g/ml}$)	Stok BSA Standardı (1 mg/ml)	Start Buffer (1/10 Sulandırılmış)
0	-	1000 μl
5	5 μl	995 μl
10	10 μl	990 μl
20	20 μl	980 μl
40	40 μl	960 μl
80	80 μl	920 μl
100	100 μl	900 μl
140	140 μl	860 μl

Hazırlanan karışım 60°C de 1saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında meydana gelen renk değişiminin 540 nm deki absorbans değeri fluorometrede ölçülerek önce BSA standart grafiği elde edildi. Daha sonrada örneklere ait absorbans değerleri bu grafikte karşılaştırılarak protein örneklerinin miktarı belirlendi.

3.1.5.6. Proteinin Örneğinin Yüklenmesi

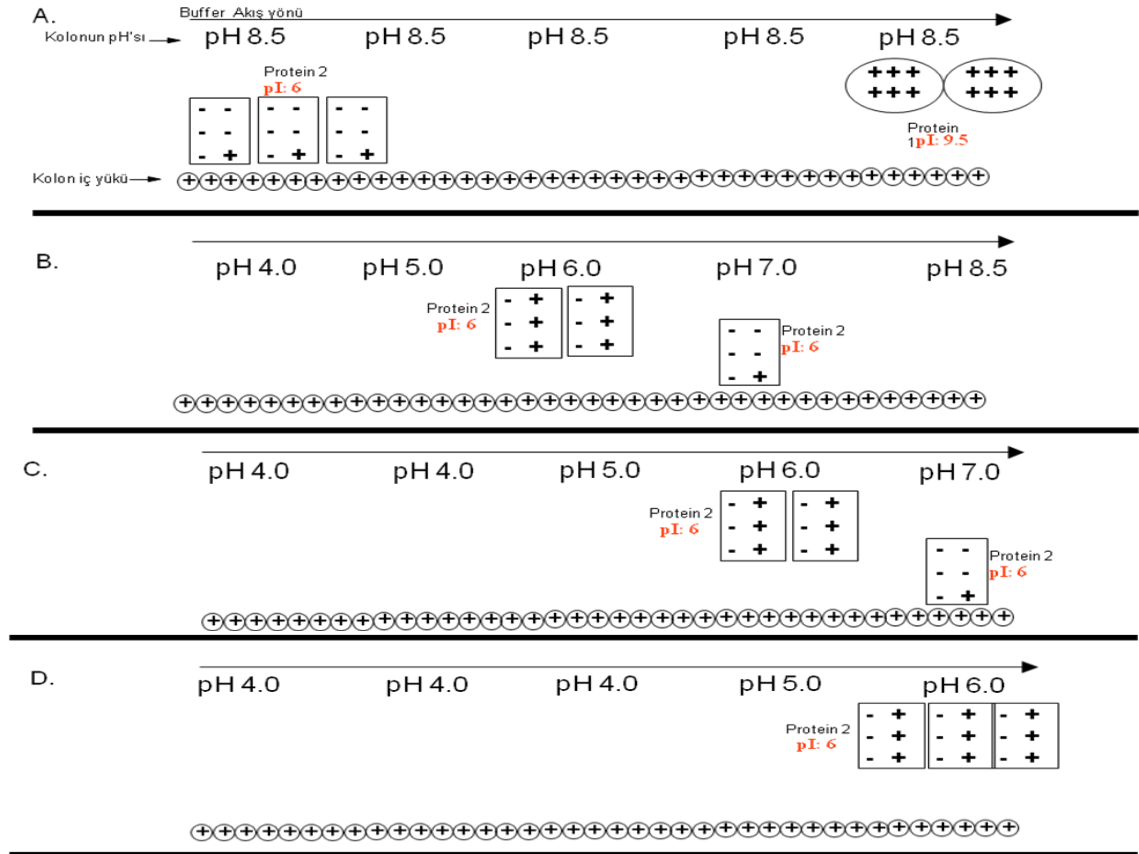
İki boyutlu ayırım için PD-10 kolondan geçirilerek tuzlarından arındırılan, start tampon içine alınan ve BCA analizi ile miktarı belirlenen protein örneklerinden yaklaşık olarak 0.75-2 mg PF-2D sistemine yüklendi. Öncelikle cihazın örnek yükleme kısmı olan sistem organizör bölgesindeki enjeksiyon girişi temizliği HPLC sınıfı su ile yapıldı. Daha sonra örnek yüklemede kullanılacak olan hamilton enjektörü önce 1 kez etanol sonra 3 kez ultra saf su ile iyice temizlendi. Ardından yazılım programı kullanılarak örneğin iki boyutlu ayırımı için sistemin nasıl bir çalışma yolu izleyeceği konusunda ayrıntıların belirtildiği bir metod oluşturuldu. Gerekli tüm hazırlıklar tamamlandı ve I. ve II. boyut kolonları dengelendikten ve örnek hazırlığı tamamlandıktan sonra bu metod seçildi ve örnek yükleme işlemi başlatıldı. Sistem örnek yüklemeye izin verdiği zaman protein örneğini içeren hamilton enjektörünün ucu örnek yükleme yerine yerleştirildi ve sistem organizör kısmı yükleme pozisyonuna getirilerek örnek enjeksiyonuna başlandı. Karşılaştırma yapılacak örnekler için eşit miktarda protein yüklenmesine özen gösterildi. Örnek yükleme aşamasında sisteme hava kabarcığının verilmemesine dikkat

edildi. Yükleme işlemi bittikten sonra cihaz, I. boyut analizine başladı ve örnek yükleme portu ile hamilton enjektörü yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar temizlendi.

3.1.5.7. I.Boyut Ayrımı

PF-2D sisteminde protein örnekleri, birinci boyutta “chromatofocusing“ (CF) kolonunda izoelektrik noktalarına (pI) göre ayrıştırılmakta ve ayrılan proteinler 96 kuyulu mikrolakalara fraksiyonlanmaktadır. I. boyutta izoelektrik noktasına göre ayırımın sağlanabilmesi için kolon içinde 8.5 pH dan başlayarak 4.0 e doğru giden bir pH gradiyenti oluşturulmaktadır. Bu süreçte kolondan geçen proteinler kendi izoelektrik noktaları ve kolon içindeki pH değerine göre kolondan itilmekte veya alıkonmaktadır. Başka bir deyişle kolondan geçen proteinlerin ayırımı pI değerlerinin kolon içi pH'sına göre yüksek, düşük veya aynı değerde oluşuna göre gerçekleşmektedir. Protein örneği, sisteme yüklendikten sonra ilk 20-40 dakika kolondan sadece start tampon (pH 8.5) geçişi gerçekleşmekte, bu süreçte pI sı 8.5 dan büyük olan proteinler kolondan itilerek zamana bağlı olarak fraksiyonlanmaktadır. Süre sonunda sistem yavaş yavaş pH değeri 4.0 olan eluent tampon akışı başlatılmaktadır. Böylece metot da belirtilen süreye bağlı olarak I. boyut kolonunun iç pH sı, 8.5 dan 4.0 e kadar yavaş yavaş 0.3 aralıkla düşürülmektedir. Gradient sırasında proteinin pI değeri kolon içi pH sından yüksek ise kolondan atılmakta, aynı değere sahip ise kolonda asılı kalmakta ve eğer düşükse kolon iç yüzeyinde tutuklanmaktadır (Şekil 3.5). Kolondan çıkan proteinler, 96 kuyulu mikrolakalarda toplanmadan önce UV-1 dedektörün önünden geçmektedir. Bu dedektör 280 nm de proteinlerin absorbans değerini ölçerek I. boyut kromatogramını oluşturulmaktadır. Start tampon geçişi durup tamamen eluent tamponun geçişi gerçekleştiğinde ise kolon içi pH sı 4.0 e indirilmiş olur. Sadece eluent tampon geçişinin olduğu son 20 dakika boyunca da zamana bağlı olarak asidik proteinlerin ayırımı gerçekleştirilmektedir.

pH gradiyenti tamamlandıktan sonra Hiss solüsyonu ile yıkanmaktadır. Bu solüsyon sayesinde pH 4.0 de kolondan ayrılmamış olan proteinler kolondan ayrıştırılmaktadır.

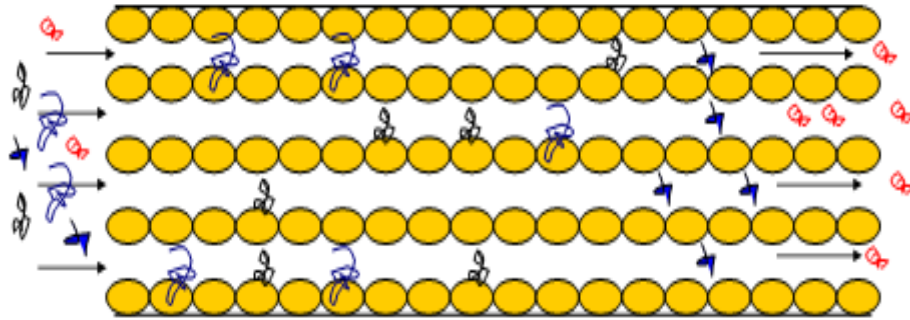


Şekil 3.5: I. boyut kolonunda proteinlerin pI noktalarına göre ayrımı

- A. İlk 20 dakika kolon içi pH değeri, Start tampondan dolayı 8.5 dur. Bu süreçte pI değeri >8.5 proteinler (protein1) itilerek kolondan çıkarılır, pI değeri düşük olan proteinler ise kolon yüzeyinde tutuklanır (Protein2).
- B. 20 dakika sonunda eluent tampon akışının başlatılmasıyla kolon içi pH değeri düşmeye başlar. Böylece oluşturulan ve azalarak devam eden pH gradienti sırasında önce kolon iç yüzeyinde tutuklanan düşük pI değerine sahip proteinler (Protein2), kolon içi pH sınırın azalmasıyla aynı değere ulaşır ve kolonda asılı kalır.
- C. -D pH gradienti boyunca kolon içi pH'nın sürekli azalmasıyla önce düşük pI değerine sahip olduğu için tutuklanan daha sonra aynı değere ulaşır serbest kalan proteinler (Protein2) zamanla kolon içi pH sınırdan daha yüksek değere ulaşır ve itilerek kolondan atılır.

3.1.5.8. II. Boyut Ayrım

Birinci boyutta fraksiyonların her biri istenirse otomatik olarak II. boyut ayırım için cihaza yüklenmektedir. Her fraksiyondan 200 µl protein karışımı II. boyut modülüne transferleri edilmekte ve protein ayırım hidrofobisite özelliklerine göre gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla sistemin II. modülünde kullanılan yüksek performans ters faz kromatografi kolonunda (HPRP) H₂O ve asetonitril ile hidrofobisite gradienti oluşturulmaktadır (Şekil 3.6). Bunun için, başlangıçta kolondan % 100 H₂O geçişi ile hidrofilik proteinlerin ayrımı gerçekleştirilirken hemen ardından yavaş yavaş asetonitril geçişi başlatılmakta ve % 100 asetonitrille doğru bir gradient akışı sağlanmaktadır. Böylece kolon içinde polardan apolara doğru bir ortam sağlanmakta ve hidrofobisite özelliği en düşük olan proteinlerden başlanarak gradient boyunca hidrofobisitesi artan proteinlerin ayrımı gerçekleştirilmektedir. Ayrılan proteinler zamana bağlı olarak (0.75 ml / dakika) 96 kuyulu mikrolakalara fraksiyonlanmaktadır. Son olarak da % 100 asetonitril geçişiyle hidrofobisitesi en yüksek olanların ayrımı yapılmakta ve II. boyut ayırım tamamlanmaktadır.



Şekil 3.6: Proteinler mobil fazda kolona girer. Hidrofobik proteinler, kolonun hidrofobik yüzeyi tarafından tutuklanır. Mobil fazdaki solventlerin oluşturduğu hidrofobisite gradienti boyunca kritik noktaya ulaşan proteinler serbest hale geçerek kolondan çıkarılır.

Bu modülde bulunan UV dedektör, kolondan geçen proteinlerin peptid bağları tarafından 214 nm dalga boyundaki ışığı absorblama miktarını ölçerek daha hassas biçimde protein tayini yapmaktadır. Böylece elde edilen UV piklerinin her biri bir proteini temsil etmekte ve her fraksiyon için bu piklerden oluşan kromatogramlar oluşturulmaktadır. Bu süreç I. Boyutta ayrılan ve II. Boyuta transfer edilen her fraksiyon için tekrarlanmaktadır.

3.1.5.9. Kromotogram Verilerinin Analizi

Bitki materyalinden izole edilen proteinlerin PF-2D sisteminde iki boyutlu ayrımı tamamlandıktan sonra elde edilen veriler bu sisteme özgün olarak geliştirilen ProteoVue programı tarafından işlenerek sanal jel haritalarına dönüştürüldü. Bunun için bir örneğin I. boyut ayrımında toplanan fraksiyonların pH aralık değerleri ve bu fraksiyonlardan her birinin II. boyut ayrımı sırasında elde edilen UV kromatogramları birebir eşleştirildi. Bu şekilde bir örneğe ait II. boyut ayrımı yapılan tüm fraksiyonların protein içeriği sanal jel haritalarında düzenlenerek gerçek iki boyutlu jel görüntüsü biçiminde elde edildi.

Farklı yürütmelere ait protein profillerinin karşılaştırılmasında ise DeltaVue programı kullanıldı. Bunun için programda protovue ile hazırlanmış olan 2 örneğe ait sanal jel haritaları eş zamanlı açılarak biri sağda diğeri solda olacak şekilde yerleştirildi. Her örneğe ait olan haritalarda hem kromatogramlar hem de sanal jel görüntüleri birlikte izlendi ve ortada da iki profil üst üste çakıştırılmış halde incelendi. Daha detaylı karşılaştırma yapabilmek için her iki haritada da aynı pH aralığına sahip fraksiyonlarda bulunan protein profilleri birebir karşılaştırıldı ve kromatogramlarında yer alan her bir protein piki birebir eşleştirilip numaralandırıldı. Numaralanan her pik için temel çizgi (baseline) pikin başlangıç ve bitiş noktasına göre düzenlendi. Böylece o pikin temsil ettiği proteinin miktarı, pik alanı hesaplanarak program tarafından belirlendi. Seçilerek numaralanan her pik için pH aralığı, miktarı, eşleştirildiği proteine oranı gibi detaylı bilgiler elde edildi. Sonuç olarak karşılaştırılan iki ayrı örneğe ait tek tek tüm fraksiyonlar ve her fraksiyondaki tek tek tüm proteinler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Böylelikle anlatım düzeyi farklı olan protein pikleri kolayca gözlenebildi. Daha sonra da anlatım farklarının oranı göz önünde bulundurularak hangi proteinlerin MS analiz edileceği belirlendi.

3.1.5.10. PF-2D de Ayrılan I. ve II. Boyut Fraksiyonların Jelde Yürütülmesi

Jel yükleme boyası; 0.5 M TrisHCl (pH 6.8), % 0.4 SDS, % 20 gliserol, % 0.03 bromofenol mavisi çift distile suda çözüldü. Kullanmadan önce 4:1 oranında β - mercaptoethanol eklendi.

50mM NH_4HCO_3 ; 40 mg NH_4HCO_3 (Sigma, 09830), 10 ml HPLC sınıfı saf su içerisinde çözüldürüldü.

PF-2D sisteminin, standart ayırım yaptığını belirlemek üzere aynı biçimde hazırlanmış 3. biyolojik tekrara ait örneklerin I. ve II. boyut fraksiyonlarından aynı pH aralığına denk gelen fraksiyonlar ESİ-MS/MS analizlerinin yanı sıra tek boyutlu SDS-PAGE ile de analiz edildi. Seçilen I. biyolojik tekerrüre ait I. ve II. boyut fraksiyonların sıvı kısmı, öncelikle speed-vac (JOUAN RC 10.10.) ile tamamen uçuruldu. Kurutulan I. boyut fraksiyonları 100 µl, II. boyut fraksiyonları ise 15 µl 50 mM NH₄HCO₃ da çözündürüldü. Tek boyutlu SDS-PAGE jel hazırlığının 3.1.4.1. de anlatıldığı biçimde gerçekleştirildi. Daha sonra 10 µl alınıp üzerine jel yükleme boyası ilave edilerek 95°C de 2 dakika denatüre edildi. Örneklerin jele yüklenmeleri ve elektroforez aşamaları 3.1.4.2. başlığında açıklandığı biçimde yapıldı.

3.1.5.11. Gümüş Boyama

I. ve II. boyutta ayrılan fraksiyonlarda bulunan protein miktarı nanogram düzeyindedir. Bu kadar az miktarda olan örneklerin jelde görüntülenmesi için daha hassas bir boyama tekniği olan gümüş boyama yöntemi kullanıldı. Bu yöntem ile miktarı birkaç nanogram olan protein bantlarının görüntülenmesi sağlandı. Yöntemde kullanılan çözeltiler;

DTT Solüsyonu: 1 M Stok DTT den 80 µl 250 ml çift distile su ile karıştırıldı.

AgNO₃ Solüsyonu; % 0.2 AgNO₃ (Merck, K703) çift distile suda çözündürüldü.

Görüntü Oluşturma Solüsyonu; 29,68 gr NA₂CO₃ (Riedel_de Haen, 13418) ve 500 µl formaldehit (Sigma, F1635) 1lt çift distile su içerisinde çözündürüldü.

Durdurma Solüsyonu ; % 5 Asetik Asit

Boya Çıkarma Solüsyonu; 0.19 gr K-Ferrisiyanid (K₃Fe(CN)₆ (Sigma, P8131), 2.4 gr Na-tiyosülfat (Na₂S₂O₃.5H₂O) (Merck, 109147) çift distile su içerisinde çözündürüldü.

Elektroforezi tamamlanan jeller 30 dakika boyunca % 40 metanol ve % 10 asetik asit karışımında tutularak sabitlendi. Daha sonra 3 kere 10 dakika çift distile su ile ardından 30 dakika DTT solüsyonu ile çalkalandı. Çift distile suda 1 kez daha birkaç dakika tutulduktan sonra AgNO₃ solüsyonu ile 30 dakika çalkalandı. Sonra tekrar çift distile suda birkaç dakika bekletilip görüntü oluşturma solüsyonu ile görüntü elde edilinceye kadar çalkalandı. Meydana gelen görüntüyü netleştirmek için boya çıkarma solüsyonunda muamele edildi ve çift distile su içerisinde çalkalanarak boya çıkarma işlemi durduruldu.

3.1.6. Proteinlerin Tanımlanması

3.1.6.1. Kütle Spektrometre Analizleri

Optimizasyon kapsamında gerçekleştirilen kütle spektrometri analizlerinde amaç, PF-2D sisteminde ayrılan örneklerin LC-ESI-MS/MS analizleri için yapılacak deneysel çalışmalarda karşılaşılabilecek sorunları tespit ederek çözmektedir. Bu nedenle PF-2D sistemi ile ayrımı gerçekleştirilen örneklerden rastgele seçilen II. boyut fraksiyonlarda kütle spektrometre analizleri gerçekleştirildi. Protein tanımlaması yapılacak fraksiyonlar aşağıda açıklandığı biçimde hazırlandıktan sonra TÜBİTAK MAM GMBE de bulunan "Proteomik Ünitesi" tarafından LC-ESI-MS/MS analizleri gerçekleştirildi.

Örneklerin hazırlığında kullanılan kimyasal ve solüsyonlar;

Tripsin (Sigma T6567) ; 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 da çözülmüştür. 50 μl lik hacimlere bölünerek -20C^0 de saklanmıştır.

NH_4HCO_3 (50 mM) ; 40 mg NH_4HCO_3 , 10 ml HPLC sınıfı su içerisinde çözüldürüldü.

DTT (10 mM) ; 15.5 mg DTT 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 içerisinde çözüldürüldü.

IAA (200 mM) ; 56 mg IAA 1.5 ml 50 mM NH_4HCO_3 içerisinde çözüldürüldü.

PF-2D sisteminde iki boyutlu ayrımı yapıldıktan sonra ESI-MS/MS analizi için seçilen fraksiyonlar 1.5 ml lik LoBind tüplere alındı ve speed-vac da iyice kurutuldu. Kurutulan protein örneklerin üzerine 10 μl 50 mM NH_4HCO_3 ilave edildi ve kısa kısa vortekslendi ve daha sonra $25-26\text{C}^0$ de birkaç saat bırakılarak çözüldürüldü. Protein miktarı nanodrop spektrometrede 280 nm de ölçüm yapılarak belirlendi. Örneklerin üzerine 1 μl 10 mM DTT ve 2 μl 200 mM IAA ilave edildi ve 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Son olarak her tüpe 50 ng proteine karşılık 1 ng olacak şekilde tripsin ilave edildi ve bir gece 37C^0 de inkübasyona bırakıldı. Elde edilen triptik peptidlerin 5 μl si ESI-MS/MS için özel tüplere konuldu. İçerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi ve kapakları iyice kapatılarak kütle analizi için Proteom Ünitesi Laboratuvarına verildi.

3.1.6.2. Verilerin Analizi (Biyoinformatik)

LC-ESI-MS/MS den elde edilen triptik peptitlere ait kütle verileri ve aa dizi bilgisi bitki protein veri bankalarındaki veriler taranarak eşleştirildi. Bunun için Mascot programı kullanıldı. Eşleşmeler sonucunda analiz edilen proteinlerin hangi proteinler olduğu belirlendi

3.2. BUĞDAYDA DAYANIKLILIK CEVABINDA ROL ALAN PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ

3.2.1. Bitki Materyali Hazırlığı

Kışlık ekmeçlik buğday çeşidi olan izgi2001 sarı pas hastalığı etmeni olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ye karşı dayanıklı bir genotiptir. Bu nedenle tez çalışmasında sarı pas dayanıklılığında rol alan proteinlerin belirlenmesi kapsamında yapılacak proteomik çalışmalar için İzgi2001 çeşidinin (Tablo 3.3) bitki materyali olarak kullanımı uygun bulunmuştur.

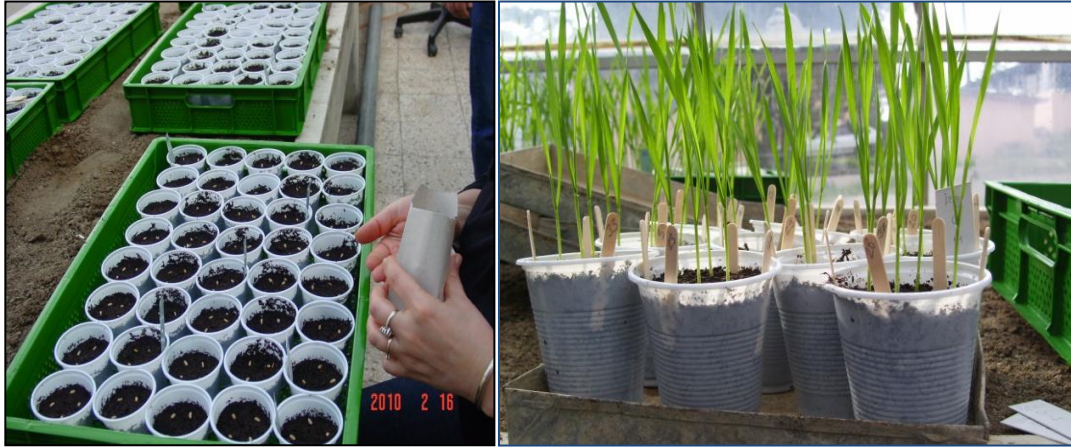
Tablo 3.3: İzgi2001 çeşidinin özellikleri

(<http://www.ataem.gov.tr>, 7 Mayıs 2011)



Kılçık	Kılçıklı
Başak Rengi	Beyaz
Dane Rengi	Beyaz
Boy	95-105cm
Kısa Dayanıklılığı	İyi
Kardeşlenme Derecesi	Orta-Yüksek
Yatma	Dayanıklı
Erkencilik	Erkenci
Ekmeçlik Kalitesi	Orta
Bintane Ağırlığı	34-35g
Hektolitre Ağırlığı	79-81kg
Sedimentasyon Değeri	30-40ml
Protein Oranı	Orta
Hastalık ve Zararlı	Sarı pas, sürme ve راستیغا dayanıklı

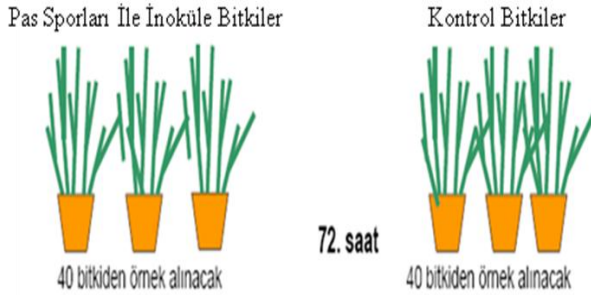
Bitki materyalinin ekimi ve inokulasyonu için yapılan tüm çalışmalar Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Genel Müdürlüğü (TAGEM), Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TARM) seralarında gerçekleştirildi. Bitki materyalinin hazırlığı için İzgi2001 çeşidine ait tohumlar 7 cm çapında, içinde steril torf bulunan 150 ml'lik plastik bardaklara ekildi. Her bardakta 4 adet tohum olacak şekilde ekim yapıldı (Şekil 3.7). Ayrıca inokulasyonun başarısını gözlemlemek için hassas çeşit Little Club tohumlarında eş zamanlı olarak ekildi.



Şekil 3.7: Bitkilerin ekimi ve etiketlenmesi

Bitki materyali ; Tohumların her bardakta 4 bitki olacak şekilde ekimi; ekim sonrasında bitkilerin homojen gelişimi; bitkilerin tek tek etiketlenmesi

Bitki materyalinde inokulasyon çalışmaları, biyolojik tekrar oluşturmak üzere 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi. Bu nedenle her tekerrür için gereken bitki materyalinin tohumları 1 gün arayla ekildi ve inokulasyon işlemleri de 1 gün arayla başlatıldı. Tek bir tekerrür için patojenle inokule edilmiş ve kontrol olmak üzere 40'ar



Şekil 3.8: Kullanılacak bitki materyalinin sematik gösterimi

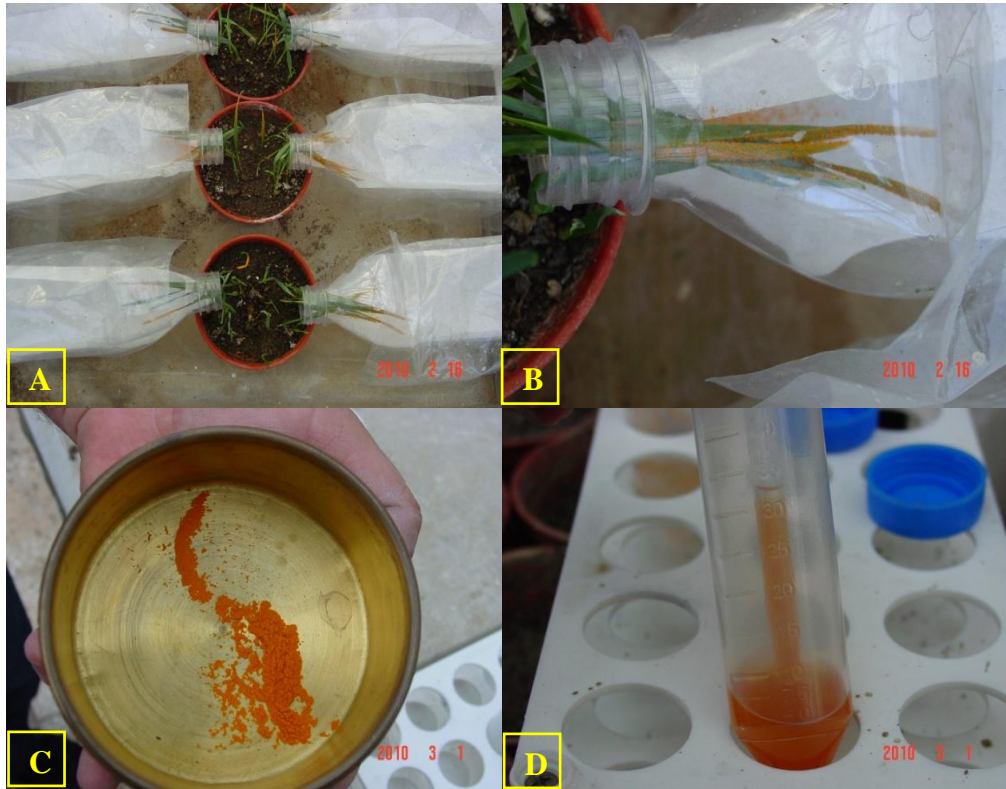
adet bitkiden (Şekil 3.8) örnek alınacak şekilde tohum ekimi yapıldı. Ekim sonrasında tohumlarda düzenli bir çimlenmenin gerçekleştiği gözlemlendi ve gerektiğinde sulama yapıldı. İnokulasyon öncesi tüm bitkiler, tek tek etiketlenerek inokulasyon ve örnek alımı için hazır hale getirildi.

3.2.1.1. Patojen Kaynağı

TARM Ankara, Haymana İkizce Araştırma ve Uygulama iftliği Hastalıklara Dayanıklılık Islahı Bölümü tarlasından 2009 Mayıs-Haziran aylarında toplanmış olan sarı pas etmenine (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) ait urediosporlar, patojen kaynağı olarak kullanıldı.

3.2.1.2. Bitkinin Enfekte Edilmesi

Tez çalışmasında kullanılmak üzere ekimi yapılan bitki materyali, 2 yapraklı döneme geldiğinde sarı pas populasyonunu oluşturan urediosporlar ile inokulasyon yapıldı. -80°C derin dondurucuda muhafaza edilen urediosporlar öncelikle hassas çeşitlere (Michigan Amber, Gerek 79, Seri 82, Little Club) bulaştırılarak bu bitkiler üzerinde çoğaltıldı. Çoğaltılan sporlar tez çalışmasında kullanılacak bitki materyalinin inokulasyonundan hemen önce toplanarak taze olarak kullanıldı (şekil 3.9).



şekil 3.9: Patojen sporlarının enfeksiyon için hazırlanması

A, B, C; Tez materyalinin inokulasyonunda kullanılmak üzere hassas çeşit (Little Club) zerinde çoğaltılarak taze spor retimi, D; çoğaltılan uredinosporların mineral yağ (soltrol 170) ile karıştırılarak inokulasyona hazırlanması

Tez kapsamında dayanıklılık reaksiyonunda rol alan proteinleri belirlemek üzere, patojen bulaştırılmış örneklerle karşılaştırma yapılacak kontrol örnekler arasında, patojen dışında başka bir uyarının bulunmaması son derece önemlidir. Bu nedenle kontrol bitki materyali, hastalık bulaştırılan bitki materyali ile aynı zamanda ve aynı biçimde ekilerek aynı fiziksel koşullar altında yetiştirildi. İnokulasyon aşamasında ise sarı pas sporları ile inoküle edilen bitkilerle aynı zamanda ve aynı koşullar altında patojen sporları içermeyen ancak tüm inokulasyon işlemlerini içeren uygulamalarla boş (mock) inokulasyona tabii tutuldu. Başka bir deyişle, etiketlenen İzgi2001 çeşidine ait 80 bitkiden 40 ı *Puccinia striiformis f. sp. tritici* ürediosporları mineral yağ ile karıştırılarak bitkilere püskürtülmesi şeklinde diğer 40 bitki ise kontrol amaçlı olarak patojen sporlarını içermeyen sadece mineral yağın bitkilere püskürtülmesi şeklinde inoküle edildi. İnokulasyonu takiben patojen bulaştırılmış bitki materyali ile kontrol bitki materyalleri birbirinden ayrı ancak aynı koşullara sahip (9-12°C de %90±10 bağıl nem ve karanlık) büyüme odalarında, 24 saat süreyle tutuldu (Şekil 3.10). Yirmi dört saatin ardından bitkiler 18±4°C sıcaklığa sahip seralarda muhafaza edildi.



Şekil 3.10: Bitkilerin inokülasyonu

3.2.1.3. Örnek Alınması

Bitki materyalinde yapılan enfeksiyonun başarısı tez çalışması için kritik noktayı oluşturmaktadır. Ancak enfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği inokulasyondan sonraki 15-20. günde belli olmaktadır. Bu yüzden her bir bitki ayrı ayrı etiketlenip örnek alımı aynı biçimde etiketlenen, 2 ml lik tüpler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sayede dayanıklılık gelişim düzeyi aynı olan bitkilere ait örnekler seçilerek proteom analizlerinde kullanılması sağlandı. Bitkiler 2 yapraklı dönemde iken inokulasyon

yapıldı. Buğdayda, sarı pasa dayanıklılıkta rol alan genleri belirlemek üzere yapılan transkriptom çalışmalarında, 72. saatteki ekspresyon farkının anlamlı biçimde değiştiğine dair bulgulara rastlandı. Bu nedenle tez çalışmasında örnek alımı inokülasyondan sonraki 72. saatte gerçekleştirildi. İki yapraklı dönemde olan bitkilerin 2. yaprakları proteom analizleri için örnek olarak alındı. 1. yaprakları ise enfeksiyon cevabının gözlenmesi amacıyla bırakıldı. Alınan örnekler derhal sıvı azot içerisinde şok donmaya maruz bırakılmış ve daha sonra protein ekstraksiyonu yapılincaya kadar -86°C lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Diğer yaprak ise enfeksiyon cevabının gözlenebilmesi için $18\pm 4^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarına sahip sera bölmelerinde 15 gün boyunca izlemeye alındı. Ayrıca enfeksiyonun başarılı biçimde gerçekleşip gerçekleşmediği mikroskopik olarak da test edildi.

3.2.1.4. Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik Olarak Belirlenmesi

Örnek alınan her bitkinin 1. yaprağı, yapılan inokülasyonun ardından bitki ile patojen arasındaki etkileşimin beklendiği biçimde gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla bırakıldı. Enfeksiyonun 5. gününde bu yapraklardan alınan örneklerde yapılan mikroskopik çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar kapsamında, hassas çeşit Little Club da patojenin yaprak hücrelerine girişi ve hif yapılarının gelişimi trypan blue yöntemiyle boyanarak gösterildi. Tez çalışmasında kullanılan İzgi2001 de ise dayanıklılık cevabı floresan mikroskop ile gösterildi. Bu tip dayanıklı buğday çeşitlerinde patojen, yaprak hücrelerine nüfuz edip enfeksiyon oluşturmaya çalıştığında, bu bölgedeki hücrelerde programlı bir ölüm meydana gelmektedir. Dayanıklı çeşitlerde yapılan inokülasyonun başarısı “aşırı duyarlılık cevabı (Hypersensitive Response, HR)” olarak ifade edilen floresan mikroskop altında ışına yapan bu ölü hücre bölgelerinin gözlenmesi ile değerlendirilmektedir. Bu amaçla inokülasyonun 5. gününde İzgi2001 in yaprak örnekleri % 60 lık gliserol kullanılarak lam/lamel arasına yerleştirilerek floresan mikroskop altında incelenmiştir.

Trypan mavisi boyama yönteminde kullanılan solüsyonlar;

Yıkama solüsyonu A; 1 hacim asetik asit, 3 hacim etanol karıştırıldı.

Yıkama solüsyonu B; 1 hacim asetik asit, 5 hacim etanol ve 1 hacim gliserol karıştırıldı.

Boyama Solüsyonu; suda çözündürülmüş %1 lik tripan mavisinden (Sigma B-8026) 0.3 ml, 10 ml laktik asit, 10 ml fenol, 10 ml distile su ile karıştırıldı.

Temizleme Solüsyonu; % 60 gliserol

İnokülasyonun 5. gününde, hassas ve kontrol çeşit Little Club bitkilerinden yaprak örnekleri alındı. Üzerlerine A yıkama çözeltisinden 2.5 ml ilave edilerek bütün gün düşük hızdaki çalkalayıcıda bırakıldı. Ertesi gün A solüsyonu dökülerek yerine 2 ml B solüsyonu kondu ve 3 saat düşük hızda çalkalandı. Daha sonra B solüsyonu atılıp yerine 2 ml boyama solüsyonu eklendi ve gün boyu düşük hızdaki çalkalayıcıda boya ile muamele edildi. Ertesi gün boyanan yapraklar 2 ml temizleme solüsyonuna alındı ve 2 saat çalkalayıcıda bırakıldı. Boyama işlemi tamamlanan örnekler bir miktar temizleme solüsyonu ile birlikte lam ile lamel arasına konarak ışık mikroskobunda izlendi. Bu işlemlerden optimizasyon çalışmalarında 3.1 başlığı altında detaylı biçimde anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3. PROTEİN İZOLASYONU

Tez çalışmasının bu aşamasında protein izolasyonu Mg/NP40 yöntemi ile yapılmıştır. Yöntemin detayları 3.1.2.2. başlığı altında verilmiştir.

3.4. PROTEİNLERİN II BOYUTLU AYRIMI

İzole edilen proteinlerin II boyutlu ayrımı PF-2D ile gerçekleştirildi. Bu çalışmalar 3.1.5. başlığı altında ayrıntılı biçimde açıklandığı gibi gerçekleştirildi.

3.5. PROTEİNLERİN TANIMLANMASI

Protein tanımlaması gerçekleştirilecek olan fraksiyonların kütle spektrometre analizleri LC-ESI-MS/MS ile gerçekleştirildi. Bu aşamada yapılan çalışmalar 3.1.6. başlığı altında anlatıldığı biçimde gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

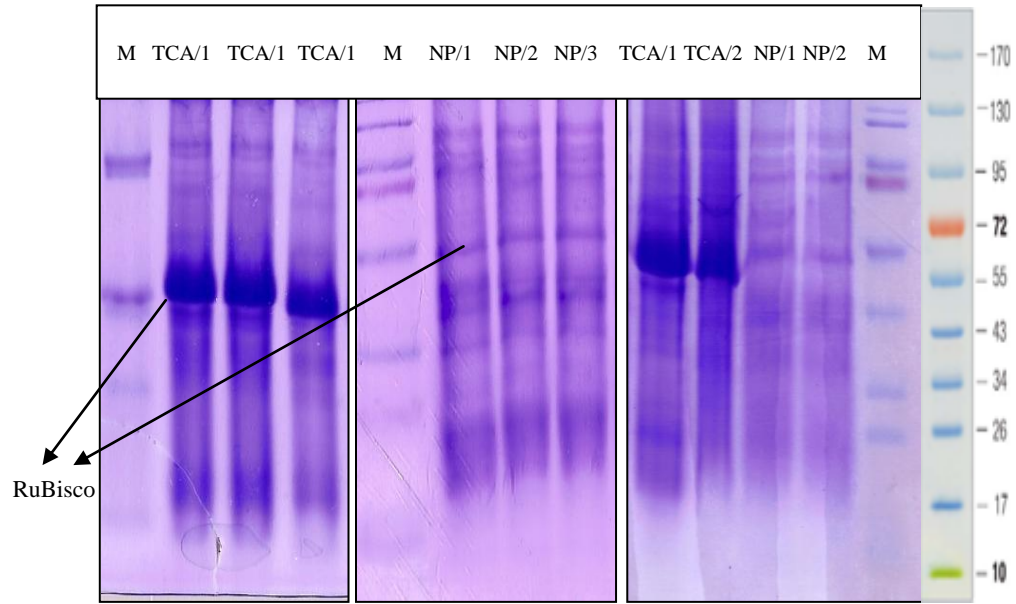
4.1. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Optimizasyon çalışmaları kapsamında, 15 günlük İzgi2001 çeşidine ait yaprak örnekleri kullanılarak 2 farklı protein izolasyon yöntemi denendi. Uygun izolasyon yöntemi belirlendikten sonra PF-2D sisteminde II boyutlu ayırım gerçekleştirildi. Böylece sistemin optimum çalışması, yüksek tekrarlanabilirlik ve maksimum ayırım yapabilmesi için gereken parametreler belirlendi.

4.1.1. Protein İzolasyonu

Başarılı bir proteomik çalışmada ilk ve en önemli aşama dokulardan total protein izolasyonudur. Buğdayda gerçekleştirilen proteomik çalışmalarına bakıldığında en yaygın kullanılan protein izolasyon yönteminin TCA/Aseton yöntemi olduğu görülmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında protein izolasyonu için ilk olarak bu yöntem kullanılmıştır. TCA/Aseton yönteminde diğer yöntemlere nazaran daha fazla protein elde edilmesi (1 gr dokudan yaklaşık 1.5 mg protein) yöntemi daha avantajlı kılarken izole edilen total protein içeriğinde bol miktarda RuBisCo proteinlerinin bulunması, hiçbir eliminasyona uğramamış olması yöntemin en önemli dezavantajını oluşturmuştur. Bilindiği gibi bitki yaprak dokularından izole edilen total protein içeriğinin yaklaşık % 50 sini RuBisCo proteininin oluşturması, proteomik çalışmalarda önemli sıkıntılara neden olmaktadır. Bu sıkıntılardan ilki gerek 2D-PAGE yönteminde gerekse 2D-LC sistemlerinde, ayırım için yüklenen protein miktarının sınırlanmasıdır. Bir proteomik çalışmasının başarısı, az bulunan ve düşük ekspresyonlu proteinlerin ne kadar analiz edilebildiği ile ölçülürken RuBisCo nun başlangıçtaki protein karışımının yarısını oluşturması, yüklenen protein karışımı içindeki proteinlerin daha az olmasına neden olmaktadır. Ayrıca gerek 2D-PAGE gerekse 2D-LC sistemlerde RuBisCo proteininin yoğun biçimde bulunması bu proteinlerin maskelenmesine ve çok azının belirlenmesine olanak vermektedir. Dolayısıyla daha başarılı bir proteom analizi için RuBisCo proteinlerinin başlangıçta uzaklaştırılması son derece önemlidir. Bunun için Kim ve diğerleri (2003) tarafından geliştirilen Mg/NP-40 yöntemi de kullanılmıştır. Bu metotta PEG in farklı konsantrasyonlarda farklı proteinleri ayırma özelliğinden yararlanılmıştır. Yöntemde, % 15 lik PEG konsantrasyonu kullanılarak yapılan

fraksiyonlamada, RuBisCo proteinleri PEG e bağlanmak sureti ile çöktürülerek diğer proteinlerden uzaklaştırılmaktadır. Bununla birlikte diğer proteinlerin miktarında bir azalma olmadığı aksine düşük ekspresyonlu proteinlerin rahatlıkla analiz edilebildiği aynı çalışmada diğer yöntemlerle karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur. Bu nedenle tez çalışması kapsamında bu iki yöntemle izole edilen total protein örnekleri %12.5 lik tek boyutlu SDS-PAGE jelde yürütülüp karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Protein izolasyonunda kullanılan 2 yöntemin karşılaştırılması

M: protein marker (kDa), **TCA/1:**TCA/aseton yöntemi/1. örn, **TCA/2:**TCA/aseton yöntemi/2. örn, **TCA/3:**TCA/aseton yöntemi/3. örn, **NP/1:** Mg/NP-40 yöntemi/1. örn, **NP/2:** Mg/NP-40 yöntemi/2. örn, **NP/3:** Mg/NP-40 yöntemi/3. örn

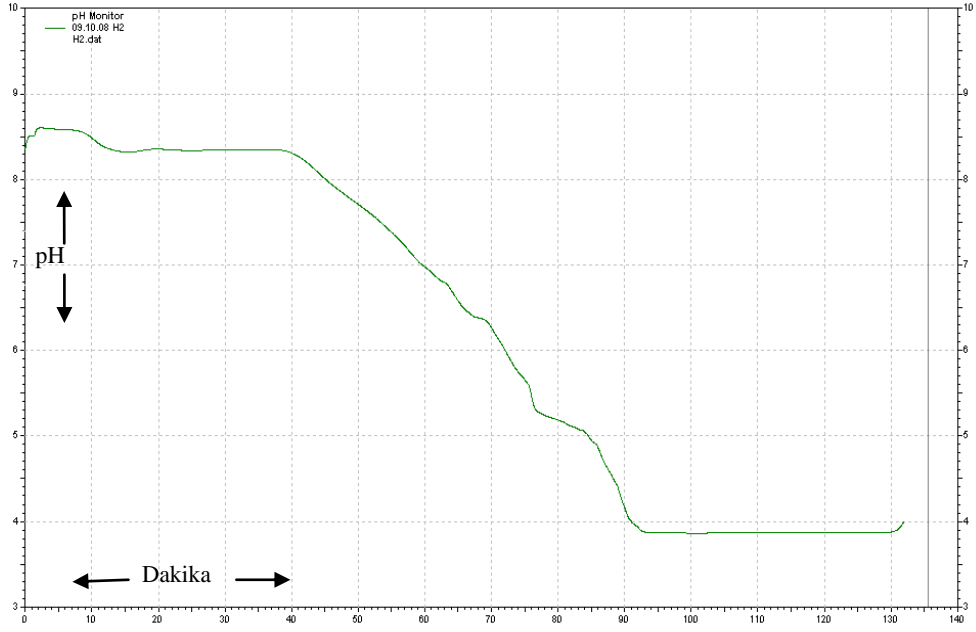
Yapılan değerlendirme sonucunda tez kapsamında protein izolasyon yöntemi olarak Mg/NP40 yönteminin kullanımının daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu aşamadan sonra II boyutlu ayırma için kullanılan tüm proteinler bu yöntemle izole edilmiştir.

4.1.2. Proteinlerin PF-2D Sisteminde İki Boyutlu Ayrımı

Proteinlerin geleneksel II boyutlu ayırım yöntemleri ile “PF-2D” karşılaştırıldığı zaman; “PF-2D” sisteminin yüksek miktarda örnek yükleme kapasitesine sahip olması, düşük anlatımlı proteinlerin belirlenebilmesine olanak tanınması, yüksek çözünürlük özelliğinin olması, daha güçlü bir tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olması, daha hassas kantitatif değerlendirme sağlayabilmesi, kontaminasyon içermeyen sıvı akış yolunun olması, sıvı fraksiyonlama yapması, membran ve hidrofobik proteinleri ayrabilmesi gibi üstün özelliklere sahip olduğu görüldü. Sistemin bu avantajlarından en iyi şekilde yararlanabilmek için PF-2D sisteminde proteinlerin iki boyutlu ayırımına yönelik deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, daha doğru ve çözünürlüğü daha yüksek bir ayırım sağlamak üzere birçok ara kademedede temel parametreler optimize edilmiştir.

4.1.2.1. Tampon Optimizasyonu

PF-2D sisteminde proteinlerin I. boyut ayırımı, I. modülde pH gradiyenti oluşturularak pI noktalarına göre sağlanmaktadır. Bu sistemde pH gradiyentini sağlamak üzere start ve eluent adı verilen tamponlar kullanıldı. Bu tamponlar sistemin kolonlar ile birlikte ticari olarak temin edildi Ancak hem maliyeti yüksek hemde uzun süren ithalat sürecinde soğuk zincirin kırılması gibi durumlarda tamponlarda meydana gelen bozunmalar ciddi sıkıntılara yol açmakta, bu sistemle yapılan ve yapılacak olan çalışmalarda maliyeti oldukça artırmaktadır. Oysa tamponların laboratuarda taze olarak hazırlanıp kullanılması hem çalışmaların daha sağlıklı yürütülmesini sağlamakta hem de sistemin kullanım maliyetini %50-70 oranında azaltmaktadır. Bu amaçla tez kapsamında Barre ve Solioz (2006) tarafından yapılan çalışma baz alınarak bu tamponlar hazırlandı. Daha sonra tamponlarla oluşturulan pH gradiyentinin etkinliği, fraksiyon hacimleri ve I. boyut kromatogramları ticari olarak temin edilen tamponlarla yapılan çalışmalarla karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İlk olarak Şekil 4.2 de Eprogen firması tarafından PF-2D sisteminde pH gradiyenti oluşturmak üzere üretilen ve ticari olarak temin edilen start ve eluent tamponlar kullanılarak gerçekleştirilen bir pH gradiyenti ve Tablo 4.1 de toplanan fraksiyonlara ait bir takım veriler sunulmaktadır.



Şekil 4.2: Ticari tampon ile PF-2D’de yapılan ayırım sonucu meydana gelen I. boyut pH gradienti

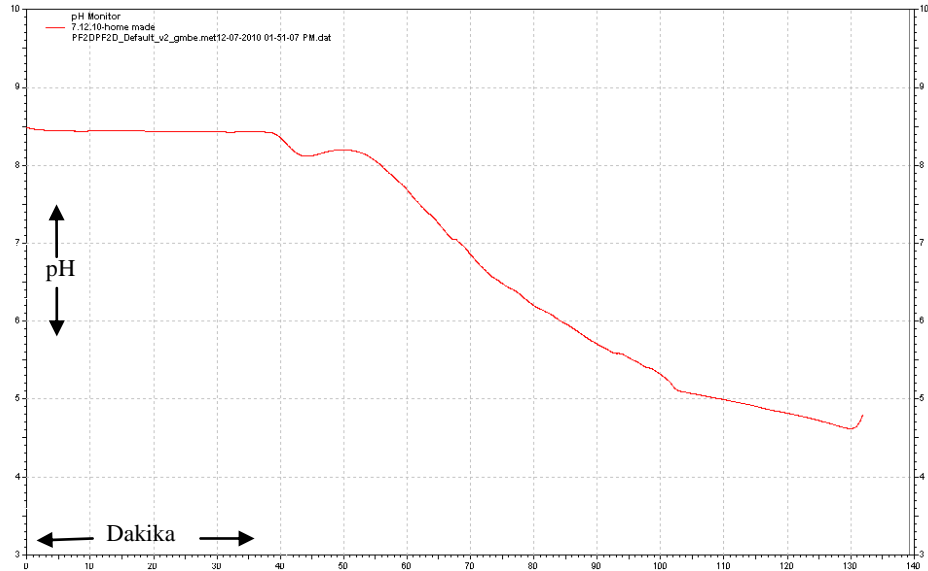
Tablo 4.1: Ticari tamponla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırımına ait rapor

Fraksiyon No	Kuyucuk No	Başlangıç pH	Bitiş pH	Başlangıç Zamanı	Bitiş Zamanı	Fraksiyon Hacmi
1	A1	8.46	8.71	0.00	7.50	1.50
2	A2	8.71	8.50	7.50	15.00	1.50
3	A3	8.50	8.47	15.00	22.50	1.50
4	A4	8.47	8.46	22.50	30.00	1.50
5	A5	8.46	8.46	30.00	37.50	1.50
6	A6	8.46	8.34	37.50	45.00	1.50
7	A7	8.34	8.04	45.00	49.43	0.89
8	A8	8.04	7.74	49.43	54.62	1.04
9	A9	7.74	7.44	54.62	58.90	0.86
10	A10	7.44	7.14	58.90	62.42	0.70
11	A11	7.14	6.83	62.42	66.95	0.91
12	A12	6.83	6.53	66.95	70.10	0.63
13	B12	6.53	6.23	70.10	74.30	0.84
14	B11	6.23	5.93	74.30	76.53	0.45
15	B10	5.93	5.63	76.53	78.98	0.49
16	B9	5.63	5.33	78.98	82.12	0.63
17	B8	5.33	5.03	82.12	88.70	1.32
18	B7	5.03	4.73	88.70	90.62	0.38
19	B6	4.73	4.42	90.62	92.42	0.36
20	B5	4.42	4.12	92.42	94.00	0.32
21	B4	4.12	3.98	94.00	101.50	1.50
22	B3	3.98	3.98	101.5	109.00	1.50
23	B2	3.98	3.99	109.0	116.50	1.50
24	B1	3.99	3.99	116.5	124.00	1.50
25	C1	3.99	3.99	124.0	131.50	1.50

Renkli olarak işaretli kısımda pH gradiyentinin başlangıç ve bitişi ile gradiyent boyunca 0.3 pH aralıkla ayrılan fraksiyonların hacimleri ve toplanma süreleri gösterilmiştir.

Şekil 4.2 de görüldüğü üzere pH 8.5-4.0 arasındaki gradient yaklaşık 55 dakikada tamamlanmıştır. 0.3 pH aralıklarla ayrılan fraksiyonların hacimleri ise yaklaşık 0.3 ile 0.9 ml arasındadır. I. boyutta ayrılan fraksiyonların hacimleri son derece önemlidir. Bu fraksiyonların 200 µl si II. boyut kolonuna transfer edilerek protein içeriği hidrofobisite gradientine göre ayrılmaktadır. I. boyut fraksiyonlarının hacminin yüksek oluşu II. boyuta transfer edilen protein miktarının düşmesine neden olmakta bu da II boyutlu ayırım sonunda elde edilen proteinlerin miktarının, kütle spektrometri analizleri için yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla II. boyut ayırımı çok iyi yapılsa dahi tanımlama yapmaya yetecek kadar protein elde edilememektedir.

Ticari olarak temin edilen bu tamponların içeriği verilmemektedir. Ancak yapılan literatür çalışmalarında Barre ve Solioz (2006) tarafından sunulan makalede bu tamponların içeriği verilmiş ve yazarın hazırlamış olduğu tamponların kullanılabilirlikleri konusundaki görüşleri sunulmuştur. Öncelikle bu makalede verilen kimyasallar ve oranlar bire bir uygulanarak start ve eluent tamponlar hazırlanmıştır. Bu tamponlarla gerçekleştirilen pH gradiyenti Şekil 4.3 de, toplanan fraksiyonlara ait veriler ise tablo 4.2 de sunulmuştur.



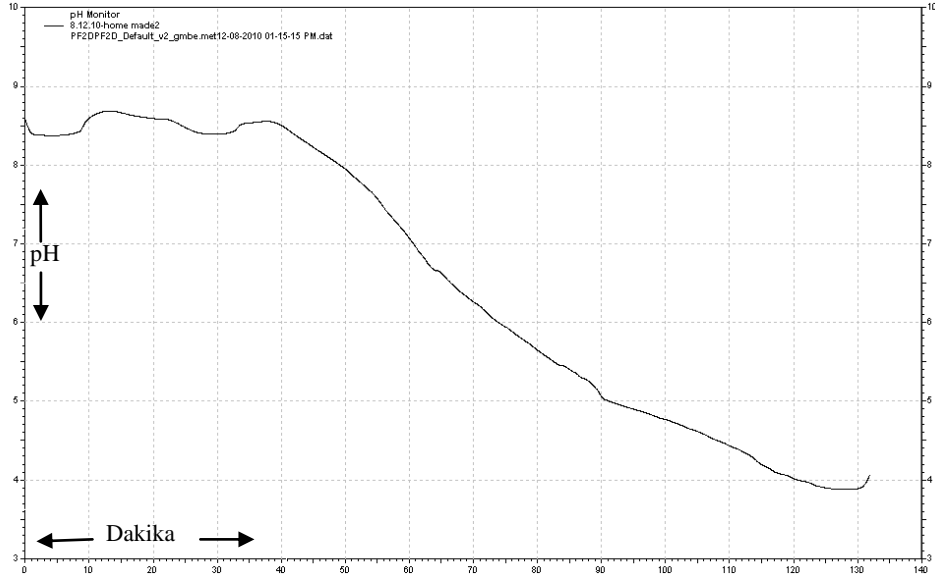
Şekil 4.3: Barre ve Solioz (2006) makalesinde belirtildiği şekilde hazırlanan %10 polybuffer içeren eluent tamponu kullanılarak PF-2D'de yapılan ayırım sonucu elde edilen pH gradienti

Tablo 4.2: %10 polybuffer içeren eluent tamponuyla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırma ait rapor örneği

Fraksiyon No	Tüp No	Başlangıç pH	Bitiş pH	Başlangıç Zamanı	Bitiş Zamanı	Fraksiyon Hacmi
1	A1	8.04	8.38	0.00	0.23	0.05
2	A2	8.38	8.56	0.23	7.73	1.50
3	A3	8.56	8.56	7.73	15.23	1.50
4	A4	8.56	8.56	15.23	22.73	1.50
5	A5	8.56	8.55	22.73	30.23	1.50
6	A6	8.55	8.55	30.23	37.73	1.50
7	A7	8.55	8.30	37.73	45.23	1.50
8	A8	8.30	8.32	45.23	52.73	1.50
9	A9	8.32	8.02	52.73	60.23	1.50
10	A10	8.02	7.72	60.23	63.92	0.74
11	A11	7.72	7.42	63.92	67.57	0.73
12	A12	7.42	7.12	67.57	71.37	0.76
13	B12	7.12	6.82	71.37	74.77	0.68
14	B11	6.82	6.52	74.77	79.88	1.02
15	B10	6.52	6.22	79.88	85.43	1.11
16	B9	6.22	5.92	85.43	91.15	1.14
17	B8	5.92	5.62	91.15	98.65	1.50
18	B7	5.62	5.32	98.65	104.72	1.21
19	B6	5.32	5.13	104.7	112.22	1.50
20	B5	5.13	4.99	112.2	119.72	1.50
21	B4	4.99	4.86	119.7	127.22	1.50
22	B3	4.86	4.87	127.2	134.72	1.50
23	B2	4.87	N/A	134.7	142.22	1.50
24	B1	N/A	N/A	142.2	149.72	1.50
25	C1	N/A	N/A	149.7	157.22	1.50

Renkli olarak işaretli kısımda pH gradiyentinin başlangıç ve bitişi ile gradiyent boyunca 0.3 pH aralıkla ayrılan fraksiyonların hacimleri ve toplanma süreleri gösterilmiştir.

Şekil 4.3 de görüleceği gibi pH gradienti beklendiği gibi pH 8.5 de başlamış ancak I. boyut ayırmasının tamamlandığı 135. dakikada bile pH 4.0 inişi gerçekleşmemiş 4.87 de kalmıştır. Ayrıca Tablo 4.2 de görüleceği üzere pH 8.5-4.87 arasında ayrılan fraksiyonların hacimleri genel olarak 1 ml nin üzerindedir. Oysa beklenen bu hacimlerin yaklaşık 0.5-0.7 civarında olmasıdır. pH gradiyentinin hızı eluent tampon içinde bulunan pollybuffer™ 74 (4-7) e bağlıdır. Bu nedenle 2. denemede eluent tampon içindeki polybuffer miktarı %11'e çıkarılarak kullanılmıştır. Bu tamponun kullanıldığı I. boyut ayırımındaki pH gradienti Şekil 4.4 de ve fraksiyon verileri Tablo 4.3 de verilmiştir.



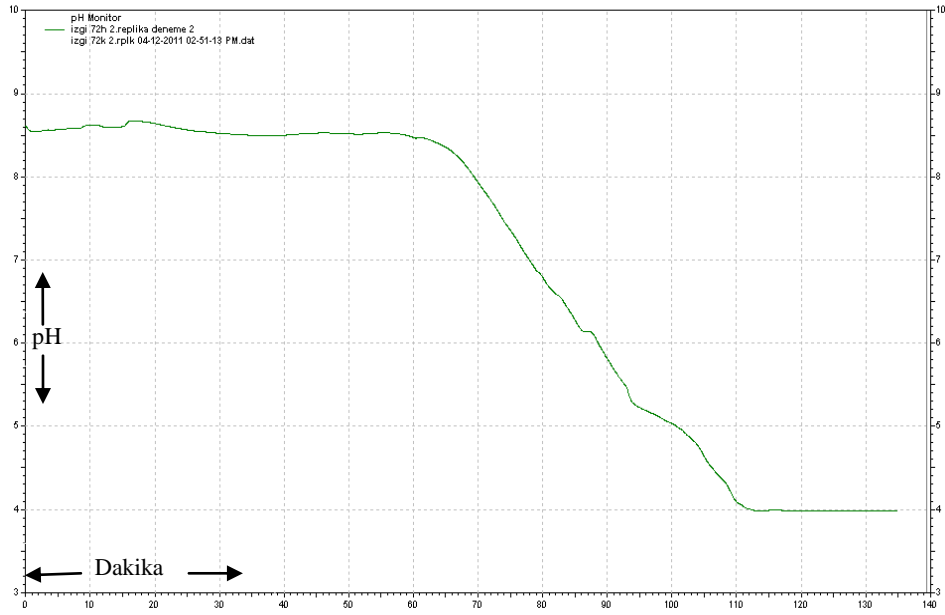
Şekil 4.4: %11 polybuffer içeren eluent tamponu kullanılarak PF-2D’de yapılan ayırım sonucu elde edilen pH gradienti

Tablo 4.3: %11 polybuffer içeren eluent tamponuyla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırma ait rapor örneği

Fraksiyon No	Tüp No	Başlangıç pH	Bitiş pH	Başlangıç Zamanı	Bitiş Zamanı	Fraksiyon Hacmi
1	A1	8.69	8.50	0.00	7.50	1.50
2	A2	8.50	8.79	7.50	15.00	1.50
3	A3	8.79	8.72	15.00	22.50	1.50
4	A4	8.72	8.53	22.50	30.00	1.50
5	A5	8.53	8.65	30.00	37.50	1.50
6	A6	8.65	8.52	37.50	45.00	1.50
7	A7	8.52	8.21	45.00	50.52	1.10
8	A8	8.21	7.91	50.52	55.23	0.94
9	A9	7.91	7.61	55.23	58.80	0.71
10	A10	7.61	7.31	58.80	61.90	0.62
11	A11	7.31	7.01	61.90	64.65	0.55
12	A12	7.01	6.71	64.65	68.48	0.77
13	B12	6.71	6.41	68.48	72.60	0.82
14	B11	6.41	6.11	72.60	77.13	0.91
15	B10	6.11	5.81	77.13	82.42	1.06
16	B9	5.81	5.51	82.42	88.33	1.18
17	B8	5.51	5.21	88.33	92.83	0.90
18	B7	5.21	4.96	92.83	100.33	1.50
19	B6	4.96	4.74	100.3	107.83	1.50
20	B5	4.74	4.47	107.8	115.33	1.50
21	B4	4.47	4.17	115.3	122.20	1.37
22	B3	4.17	4.00	122.2	129.70	1.50
23	B2	4.00	N/A	129.7	137.20	1.50
24	B1	N/A	N/A	137.2	144.70	1.50
25	C1	N/A	N/A	144.7	152.20	1.50

Renkli olarak işaretli kısımda pH gradiyentinin başlangıç ve bitişi ile gradiyent boyunca 0.3 pH aralıklarla ayrılan fraksiyonların hacimleri ve toplanma süreleri gösterilmiştir.

%11 polybuffer kullanılarak hazırlanan eluent tampon kullanılarak gerçekleştirilen pH gradiyenti yaklaşık 85 dakikada tamamlanmış, pH 8.5-4.0 arasında ayrılan fraksiyonların hacmi ise yaklaşık 0.7-0.9 ml civarındadır. Bu nedenle 3 denemede eluent tamponun hazırlığında %12.5 polybuffer kullanılmıştır. 3. denemeye ait pH gradiyenti Şekil 4.5 de fraksiyon hacimleri ise Tablo 4.4 de verilmiştir.



Şekil 4.5: %12.5 polybuffer içeren eluent tampon kullanılarak PF-2D’de yapılan ayırım sonucu meydana gelen I. boyut kromatogramı

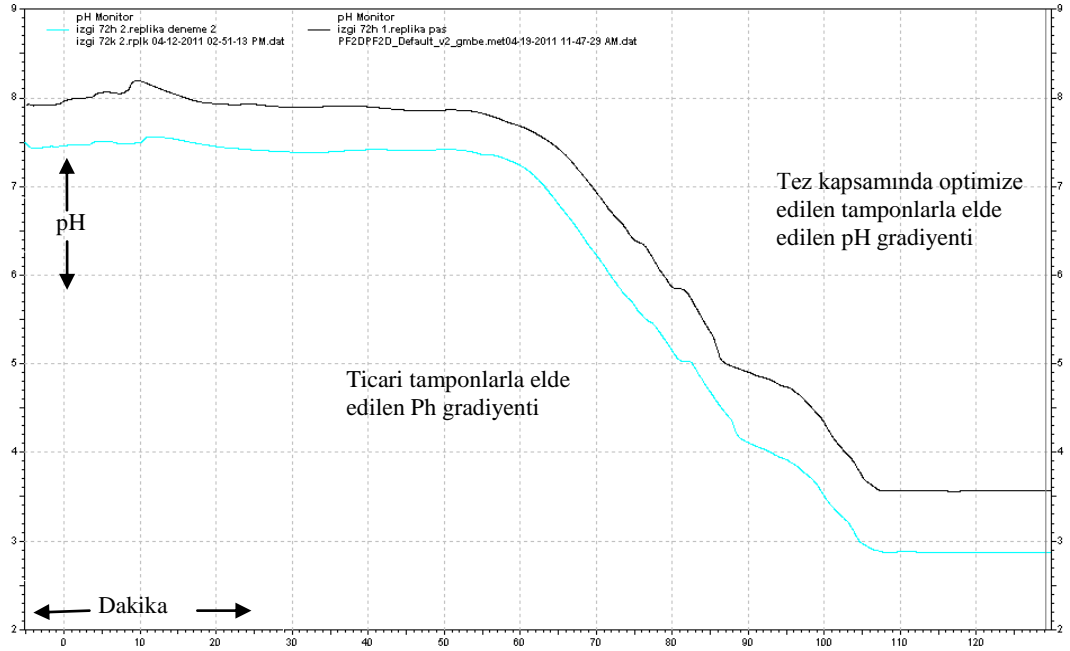
Şekil 4.5 de görüldüğü gibi %12.5 polybuffer içeren eluent tamponunun kullanıldığı denemede pH 8.5-4.0 gradienti beklendiği biçimde 53 dakikada tamamlanmıştır. Tablo 4.4 e bakıldığında ise pH 8.5-4.0 arasında 0.3 pH aralıklarla ayrılan fraksiyonların hacmi yaklaşık 0.5 ml dir. Bu değerler ticari olarak temin edilen tamponlarla oluşturulan pH gradientin ile benzer niteliktedir. Ayrıca Şekil 4.6 da tez kapsamında optimize edilen %12.5 polybuffer içeren eluent ve start tamponlar kullanılarak elde edilen pH gradientinin ticari tamponlarla birebir karşılaştırılması sunulmuştur.

Tablo 4.4: % 12.5 polybuffer içeren eluent tamponuyla yapılan optimizasyon çalışması sonucunda I. boyut ayırma ait rapor örneği

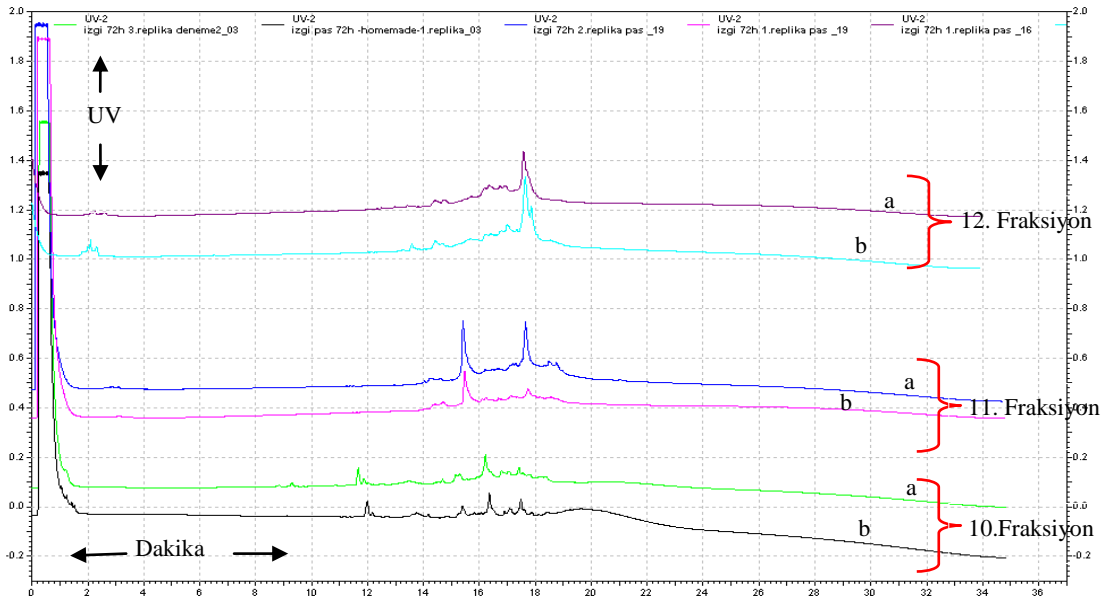
Fraksiyon No	Tüp No	Başlangıç pH	Bitiş pH	Başlangıç Zamanı	Bitiş Zamanı	Fraksiyon Hacmi
1	A1	8.61	8.58	0.00	7.50	1.50
2	A2	8.58	8.60	7.50	15.00	1.50
3	A3	8.60	8.60	15.00	22.50	1.50
4	A4	8.60	8.52	22.50	30.00	1.50
5	A5	8.52	8.49	30.00	37.50	1.50
6	A6	8.49	8.52	37.50	45.00	1.50
7	A7	8.52	8.52	45.00	52.50	1.50
8	A8	8.52	8.47	52.50	60.00	1.50
9	A9	8.47	8.19	60.00	67.50	1.50
10	A10	8.19	7.89	67.50	70.37	0.57
11	A11	7.89	7.59	70.37	73.05	0.54
12	A12	7.59	7.29	73.05	75.60	0.51
13	B12	7.29	6.99	75.60	78.02	0.48
14	B11	6.99	6.69	78.02	80.87	0.57
15	B10	6.69	6.38	80.87	84.17	0.66
16	B9	6.38	6.08	84.17	88.02	0.77
17	B8	6.08	5.78	88.02	90.23	0.44
18	B7	5.78	5.48	90.23	92.87	0.53
19	B6	5.48	5.18	92.87	96.07	0.64
20	B5	5.18	4.88	96.07	102.50	1.29
21	B4	4.88	4.58	102.5	105.42	0.58
22	B3	4.58	4.28	105.4	108.63	0.64
23	B2	4.28	3.98	108.6	113.17	0.91
24	B1	3.98	3.98	113.1	120.67	1.50
25	C1	3.98	3.98	120.6	128.17	1.50

Renkli olarak işaretli kısımda pH gradiyentinin başlangıç ve bitişi ile gradiyent boyunca 0.3 pH aralıkla ayrılan fraksiyonların hacimleri ve toplanma süreleri gösterilmiştir.

Ek olarak hem bu tamponlar ve hem de ticari olarak temin edilen tamponların, proteinlerin ayırımındaki etkinliği de karşılaştırılmıştır. Bu yüzden aynı örnek için her iki grup tamponlar kullanılarak 2 boyutlu ayırım gerçekleştirildi ve her bir fraksiyon için II. boyut kromatogramları bire bir eşleştirilerek karşılaştırıldı. Bu karşılaştırılmalardan bir kaç Şekil 4.7 de verilmiştir.



Şekil 4.6: Ticari kit ve optimize edilen tamponlarla (start tampon, eluent tampon (%12,5 polybuffer)) oluşturulan pH gradientlerinin karşılaştırılması



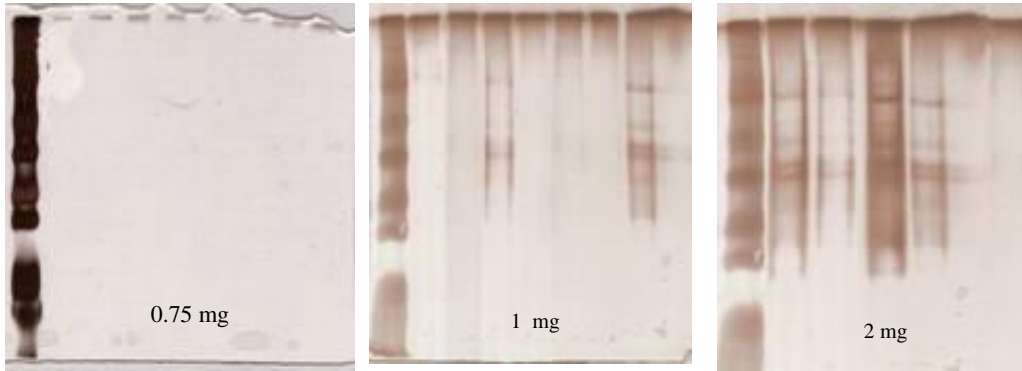
Şekil 4.7 : Ticari kit ve optimize edilen tamponlarla yapılan ayırım sonucunda elde edilen farklı fraksiyonlara ait kromatogramların karşılaştırılması

a: Ticari kit ile b: optimize edilen tampon ile oluşan II. boyut kromatogramları

Şekil 4.7 de görüldüğü gibi tez kapsamında optimize edilen tamponlar ile ticari tamponların II boyutlu ayırmadaki etkinlikleri hemen hemen eşdeğerdir. Bu nedenle tez çalışmasının devamında PF-2D sisteminde gerçekleştirilen tüm ayrımlar için kendi hazırladığımız start tampon ile eluent tampon (% 12.5 polybuffer içeren) kullanılmıştır.

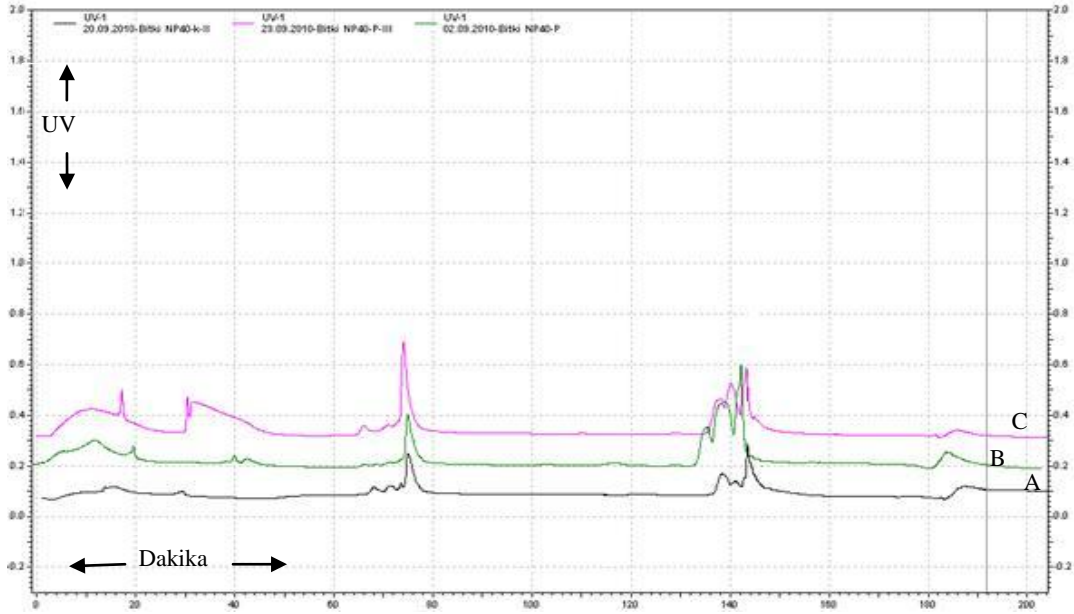
4.1.2.2. Sisteme Yüklenecek Protein Miktarının Optimizasyonu

İki boyutlu ayırım için başlangıçta sisteme yüklenen protein miktarı son derece önemlidir. Üretici firma tarafından önerilen protein miktarı 0,5 mg-2 mg arasındadır. Ancak yapılan ön denemelerde belirtilen alt değere yakın miktardaki (0,65 mg) proteinin yeterli olmadığı ve bu konuda da optimizasyon yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu nedenle PF-2D sistemine farklı miktarda protein örnekleri (0.75, 1 ve 2 mg) yüklenerek en uygun miktar belirlenmiştir. Bu denemelerde 1.0 mg protein içeren örneğin II boyutlu ayırımı sonucunda elde edilen fraksiyonlarda gerçekleştirilen mikro BCA analizinde protein miktarlarının ortalama 10 ng dan az olduğu gözlenmiş, gümüş boyama ile elde edilen SDS-PAGE jelinde ise bazı fraksiyonlarda protein bantlarının varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Farkli miktardaki proteinlerin PF-2D’de iki boyutlu ayırımı sonucunda oluşan fraksiyonların SDS-PAGE ile görüntülenmesi

2 mg protein örneği ile PF-2D de gerçekleştirilen ayırmada II. boyut fraksiyonlarındaki ölçülen protein miktarları 20-150 ng arasında değişmektedir. Bu fraksiyonların tek boyutlu SDS-PAGE analizi sonucunda ise protein bantlarının rahatlıkla değerlendirilebildiği gözlenmiştir. Ayrıca 0.75, 1 ve 2 mg protein içeren örneklere ait I. boyut kromatogramlarında Şekil 4.9 da verilmiştir.



Şekil 4.9: PF-2D sisteminde farklı miktarlardaki proteinlerin I. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması

A; 0.75 mg B; 1.0 mg C; 2.0 mg

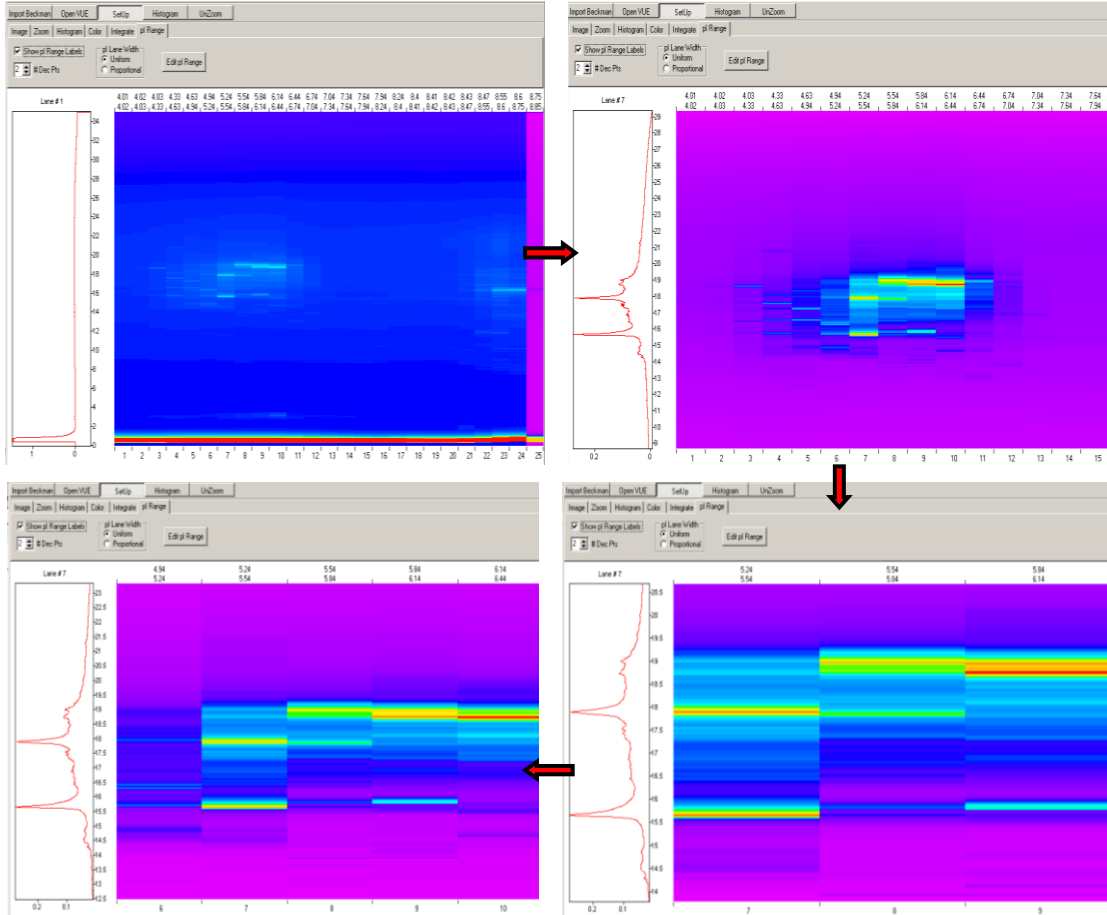
4.1.3. Verilerin Analizi

Protein örneklerinin PF-2D sisteminde iki boyutlu ayırımı sonucunda elde edilen pH ve kromatogram verileri sistemin yazılım programları olan, ProtoVue ve DeltaVue da işlenerek sanal jel haritaları oluşturulmuş ve farklı verilerin birebir karşılaştırılması yapılmıştır. Bu kısımda optimizasyon amaçlı farklı deneysel çalışmalar yapılmamıştır.

4.1.3.1. Sanal Jel Haritalarının Oluşturulması

I. boyutta proteinlerin pH gradiyentinde pI noktalarına göre ayrılması tamamlandıktan ayrılan her bir fraksiyon için bir takım verilerin yer aldığı I. boyut raporu sistem tarafından oluşturulmaktadır. ProtoVue programında bu sonuçlardan yararlanarak her bir pH aralığı ile ayrılan fraksiyonların II. boyut kromatogramları eşlenerek sanal jel

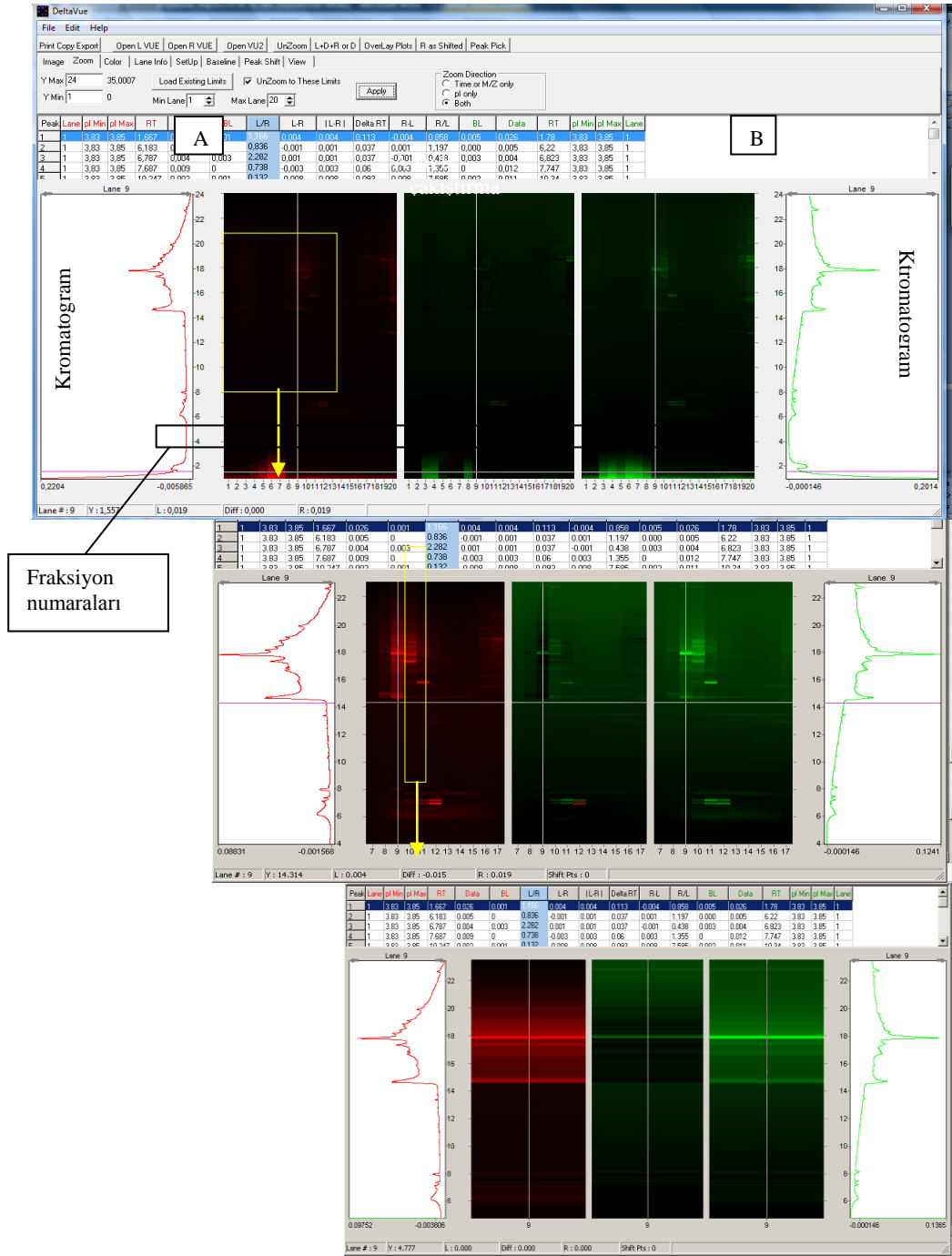
haritaları elde edilmiştir. Bu haritada tüm fraksiyonların protein içeriği toplu olarak veya tek tek hem bant profili şeklinde hem de kromatogram pikleri şeklinde incelenebilmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: PF-2D’de iki boyutlu ayrımı yapılan örneklerin ProteoVue programında oluşturulan sanal jel haritaları

4.1.3.2. Protein Profillerinin Karşılaştırılması

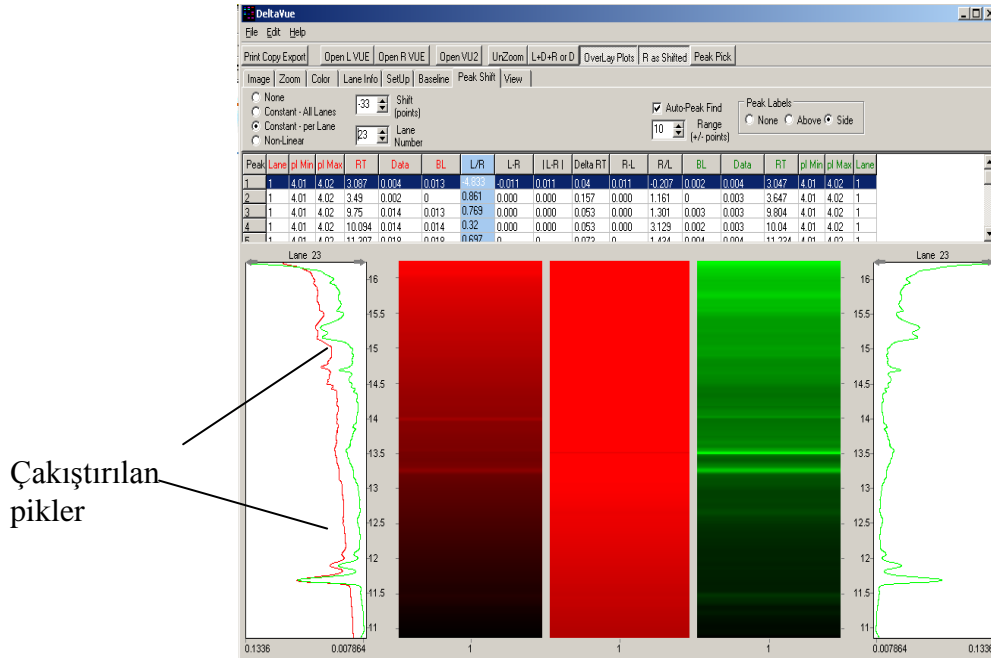
DeltaVue programı PF-2D sisteminde iki boyutlu ayrımı yapılan örneklerin protein profillerinin, tek tek proteinler bazında karşılaştırılması amacıyla geliştirilmiş bir yazılım programıdır. Bu program aracılığıyla ProteoVue ile oluşturulan örneklere ait jel haritaları ikişerli gruplar halinde karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11).



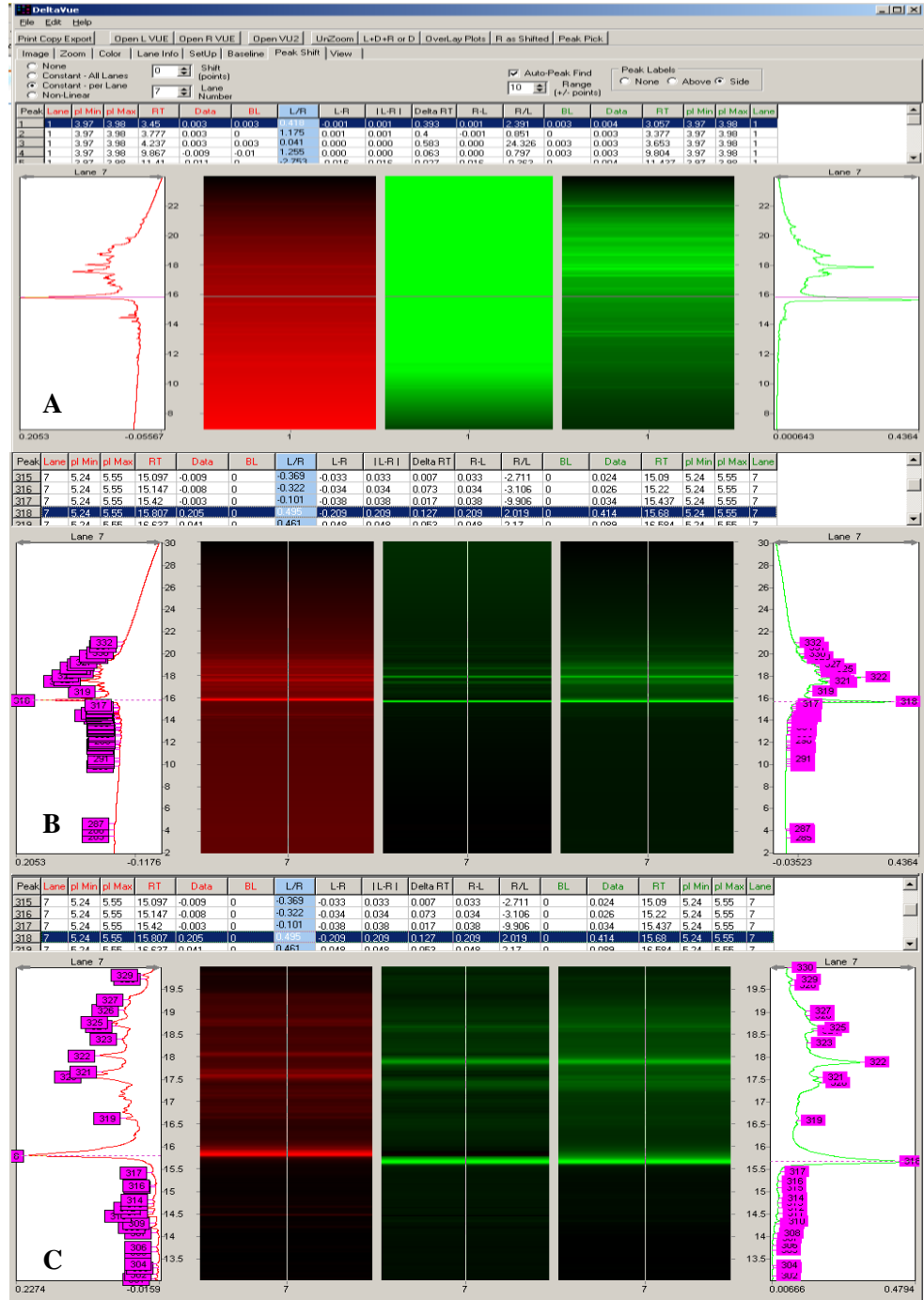
Şekil 4.11: DeltaVue programında iki örneğe ait protein profillerinin karşılaştırılması

A: 1. protein B: 2. protein

Karşılaştırma tüm fraksiyonların toplu olarak eşleştirilmesi şeklinde olabildiği gibi tek tek, aynı pH aralığında olan fraksiyonların karşılaştırılması şeklinde de gerçekleştirilebilmektedir. Proteinleri karşılaştırmak için her bir fraksiyonda bulunan protein piklerinin eşleştirilmesi yapılmakta ve pik alanı hesaplanarak o protein için ekspresyon düzeyleri hesaplanarak karşılaştırılması da yapılabilmektedir. 2D-PAGE yönteminde her spot bir proteini temsil etmektedir. Bu nedenle iki örneğe ait jellerde görülen spotlar bire bir karşılaştırılarak değerlendirme işlemi gerçekleştirilmektedir. PF-2D sisteminde ise spotların yerini kromatogram pikleri almaktadır. Her pik bir proteini temsil etmekte ve 2 örneğin karşılaştırılmasında bu pikler kullanılmaktadır (Şekil 4.12). DeltaVue yazılım programında karşılıklı olarak seçilen her pik numaralanarak belirlenmekte ve bu pikin temsil ettiği protein hakkında detaylı bilgiler tablo halinde ortaya konmaktadır (Şekil 4.13). Buda herhangi bir koşulda meydana gelebilecek protein ekspresyon farklarının kolayca izlenmesine ve farklı proteinlerin kolayca belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Böylece tez kapsamında yapılan ayrımlarda ve karşılaştırmalarda gen anlatım düzeyi farklı olan ve anlamlı olabileceği düşünülen proteinler seçilerek tanımlanmaları için MS analizine hazırlanmıştır.



Şekil 4.12: DeltaVue programı ile iki örneğe ait 4.01-4.02 pH aralığındaki protein profillerinin üst üste çakıştırılarak karşılaştırılması

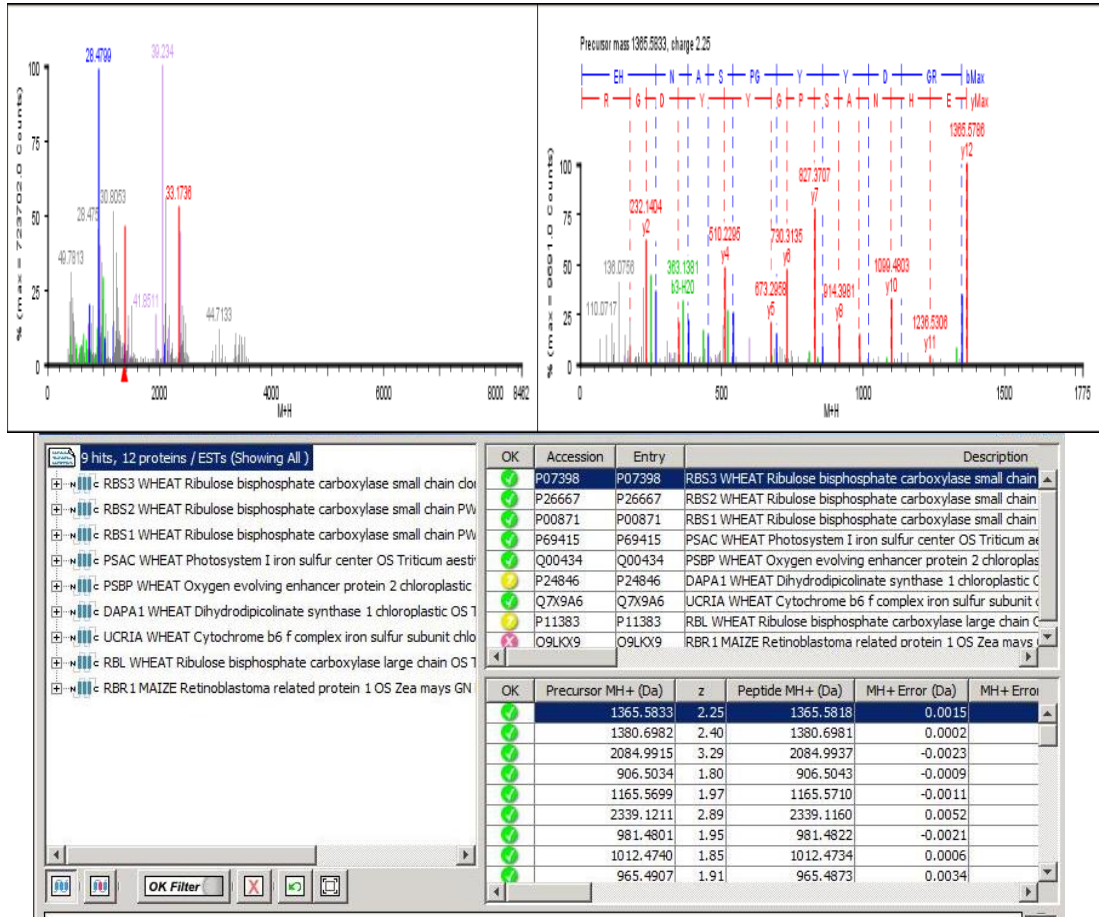


Şekil 4.13: PF-2D'de ayrımı yapılan iki örneğe ait 5.24-5.55 pH aralığındaki protein piklerinin tek tek karşılaştırılması

A; .7 fraksiyonda yer alan proteinlerin piklerinin eşleştirilmeye başlanması B-C; Protein piklerinin tek tek eşleştirilerek numaralandırılması

4.1.4. Kütle Spektrometre Analizleri

Optimizasyon kapsamında yapılan LC-ESI-MS/MS analizlerinde protein miktarının azlığı önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Başlangıçta sisteme yüklenen protein miktarının 1 mg dan az olduğu örneklerde II. boyuttaki fraksiyonlardan LC-ESI-MS/MS analizi için yeterli protein olmadığı gözlenmiştir. Bu örneklerde 20 adet fraksiyonda ESI-MS/MS analizleri gerçekleştirilmiş ancak sadece 4 tanesinde protein tayini yapılabilmektedir (Şekil 4.14). Diğerlerinde protein miktarının yetersiz oluşu nedeniyle tanımlama gerçekleştirilememiştir. Başlangıç protein miktarı 2 mg olan örneklerden ise PF-2D de ayırım sonucunda 10 adet II. boyut fraksiyonu LC-ESI-MS/MS analizine verilmiştir. Hepsinde yeterli miktarda protein varlığı bu fraksiyonların tamamında protein tanımlamasının yapılması ile de kanıtlanmıştır (Tablo 4.5)



Şekil 4.14:LC-ESI-MS/MS analizinde elde edilen sonuçlar

Tablo 4.5: 10 adet II. boyut fraksiyonundan LC-ESI-MS/MS ile tanımlanan proteinler

Q9ZP21	TRXM WHEAT Thioredoxin M type chloroplastic OS Triticum aestivum PE 2 SV 1
Q43206	CATA1 WHEAT Catalase 1 OS Triticum aestivum GN CAT1 PE 2 SV 1
P27665	PSBO WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBO PE 2 SV 1
Q00434	PSBP WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBP PE 2 SV 1
Q0UN58	PSF1 PHANO DNA replication complex GINS protein PSF1 OS Phaeosphaeria nodorum GN PSF1 PE 3 SV 1
Q6TCF2	ACT GAEGA Actin OS Gaemannomyces graminis var avenae GN ACT PE 2 SV 1
P04866	COAT BSMV Coat protein OS Barley stripe mosaic virus PE 4 SV 1
P11383	RBL WHEAT Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS Triticum aestivum GN rbcL PE 1 SV 2
P69415	PSAC WHEAT Photosystem I iron sulfur center OS Triticum aestivum GN psaC PE 3 SV 2
Q0U913	EFG1P PHANO rRNA processing protein EFG1 OS Phaeosphaeria nodorum GN EFG1 PE 3 SV 1
P00228	FER WHEAT Ferredoxin chloroplastic OS Triticum aestivum GN PETF PE 1 SV 2
Q9ZP21	TRXM WHEAT Thioredoxin M type chloroplastic OS Triticum aestivum PE 2 SV 1
P27665	PSBO WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBO PE 2 SV 1
Q0U2G5	CLP1 PHANO Protein CLP1 OS Phaeosphaeria nodorum GN CLP1 PE 3 SV 1
Q8LK61	GAPN WHEAT NADP dependent glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase OS Triticum aestivum GN GAPN PE 1
P38076	CYSK WHEAT Cysteine synthase OS Triticum aestivum GN CYS1 PE 2 SV 1
Q4I785	SMP3 GIBZE GPI mannosyltransferase 4 OS Gibberella zeae GN SMP3 PE 3 SV 1
Q0UUE1	LMBD1 PHANO Probable lysosomal cobalamin transporter OS Phaeosphaeria nodorum GN SNOG_04623 PE 3 SV

4.2. BUĞDAYDA DAYANIKLILIKTA ROL ALAN PROTEİNLERİN BELİRLENMESİ

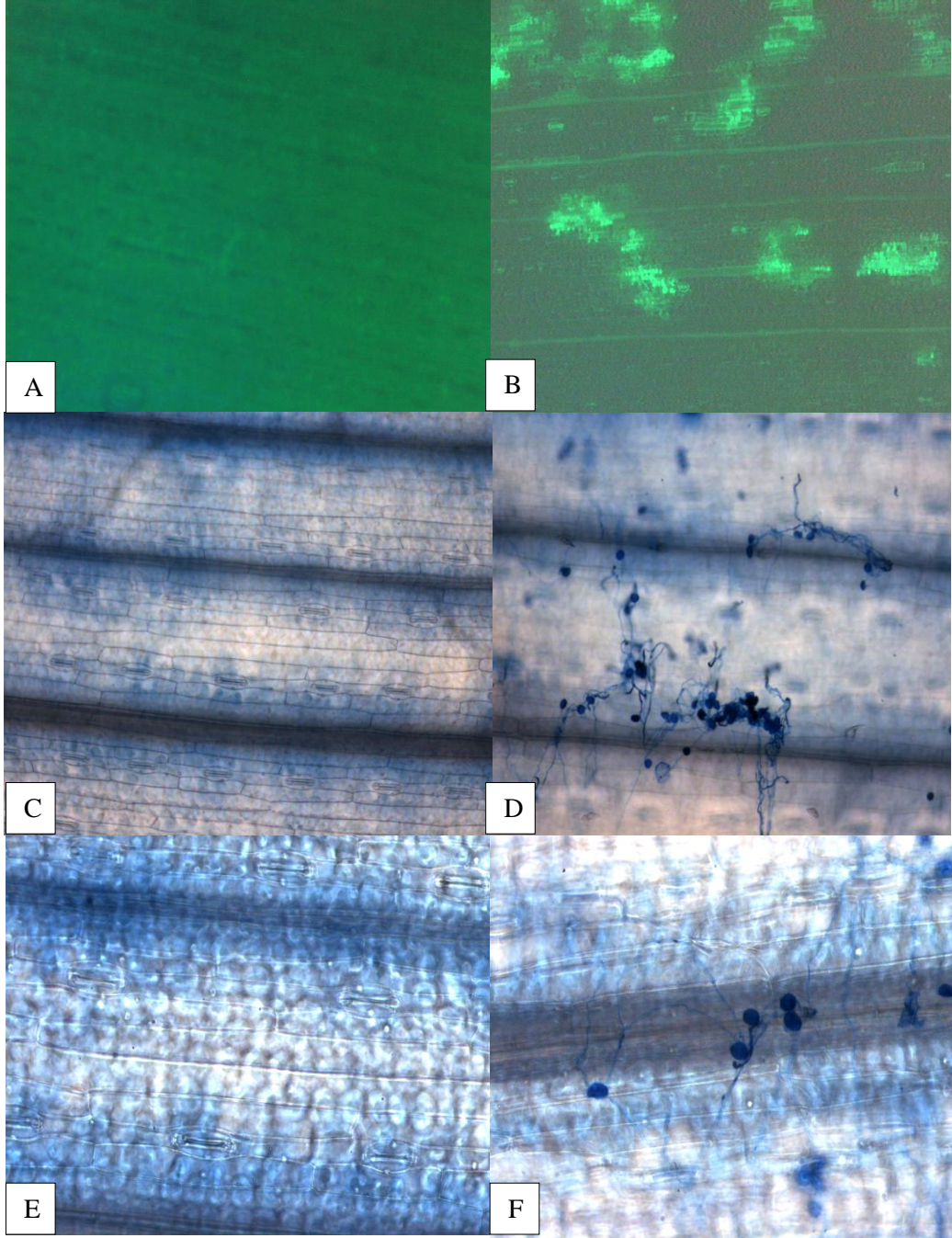
Tez çalışmasında öncelikle PF-2D sisteminin koşulları optimize edilmiş daha sonrada sistemin bitki proteomiği kapsamında kullanılabilirliğini göstermek üzere bir model çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan model çalışmada tez bitki materyalini oluşturan İzgi2001 çeşidinde sarı pas etmeni *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'e karşı verilen dayanıklılık cevabında rol alan proteinler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla bitki materyali bir yandan patojen sporları ile enfekte edilmiş ve diğer yandan kontrol amacıyla boş inokülasyona tabii tutulmuştur. Enfeksiyonun 72. Saatinde örnek alınarak

proteinleri PF-2D sisteminde 2 boyutlu ayrılmış ve karşılaştırılmıştır. Tüm çalışma 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Yüksek ekspresyon farkı olan 25 tane protein piki seçildi ve ESI-MS/MS ile tanımlanmıştır.

4.2.1. Bitkinin Enfeksiyon Cevabının Mikroskopik Ve Makroskopik Olarak Belirlenmesi

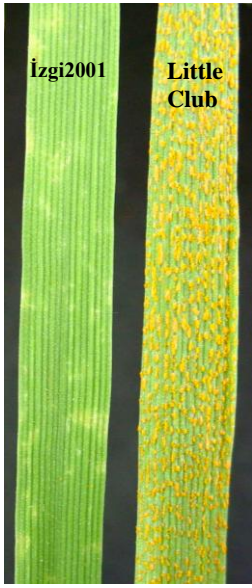
İzgi2001 de inokülasyonla oluşturulan enfeksiyonun başarılı biçimde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek üzere mikroskopik inceleme yapılmıştır. Bu amaçla enfeksiyonun 5. gününde olan İzgi2001 ve pozitif kontrol olarak kullanılan Little Club bitkilerine ait yaprak örnekleri kullanılmıştır.

İzgi2001 de dayanıklılık cevabı, HR bölgelerinin otofloresan özelliğinden yararlanılarak kanıtlanmıştır. Little Club da ise patojenin yaprak hücrelerinin içine doğru çimlenmesi ve hif yapılarının gelişimi tripan mavi boyama yöntemi ile boyanarak gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Yapılan inokulasyon çalışmalarında enfeksiyon cevabının mikroskobik olarak görüntülenmesi

A. Kontrol amaçlı boş inokulasyon yapılan İzgi2001 bitki yaprağının floresan mikroskop altındaki görüntüsü, B. Patojenle inokule edilmiş dayanıklı çeşit İzgi2001’de enfeksiyon cevabı olan HR bölgelerinde floresan ışımaya, C/E. Kontrol amaçlı boş inokulasyon yapılan LC bitkilerinde trypan blue boyama yöntemi sonucu yaprak görünümü, D/E. Hassas çeşit LC’de trypan blue boyama yöntemi ile patojen sporlarında hif gelişiminin görünümü.

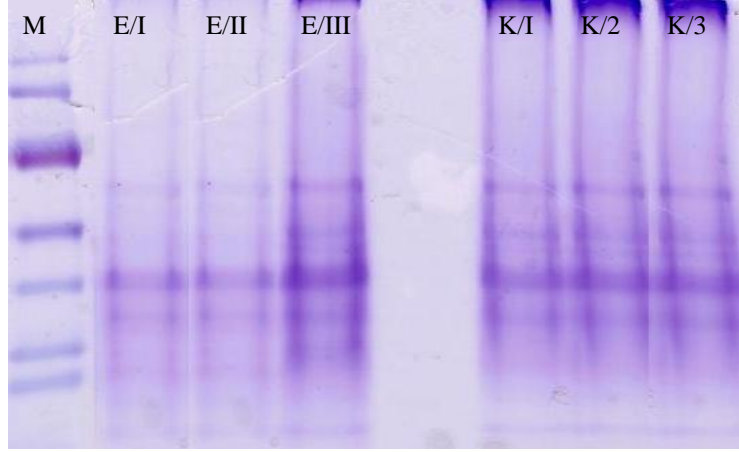


Enfeksiyonun gözlenmesi için kullanılan mikroskopik yöntemlerin yanı sıra makrosobik gözlemede gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla inokulasyonun 16. gününde tüm bitkilerde yaprak yüzeyinde gözlenen belirtiler (Şekil 4.16) Mc Neal (McNeal, ve ark. 1971) skalasına göre değerlendirilmiştir. Bundan 2-3 gün sonra da ikinci değerlendirme yapılarak her bitki için enfeksiyon cevabı skorlanmıştır. Bu skalada 0-6 arasındaki bitkiler dayanıklı, 7-9 arası değer alan bitkiler ise hassas olarak kabul edilmektedir. Tez bitki materyalini oluşturan İzgi2001 çeşidinde tüm bitkiler beklendiği biçimde 0-1 skala değerini almış olup hastalık belirtisi gözlenmemiştir.

Şekil 4.16: Dayanıklı ve hassas çeşitlerin makrosobik görüntüsü

4.2.2. Protein İzolasyonu ve PF-2D Sisteminde İki Boyutlu Ayrım

Bitkide enfeksiyonunun cevabının beklendiği biçimde gerçekleşmesinin ardından hem patojen uygulanmış hem de kontrol bitkilere ait yaprak dokularından Mg/NP40 yöntemiyle protein izolasyonu yapıldı. Enfekte ve kontrol gruba ait biyolojik tekerrürlerin protein izolasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü. İzolasyona başlarken tekerrür için 4 g yaprak dokusu kullanılmış. İzolasyon sonucunda her tekerrür için yaklaşık 4 mg total protein örneği elde edildi (şekil 4.17). Tek boyutlu SDS-PAGE sonucunda örneklerin yeterli ve uygun kalitede olduğu ve biyolojik tekrarların uyumlu olduğu görüldü.



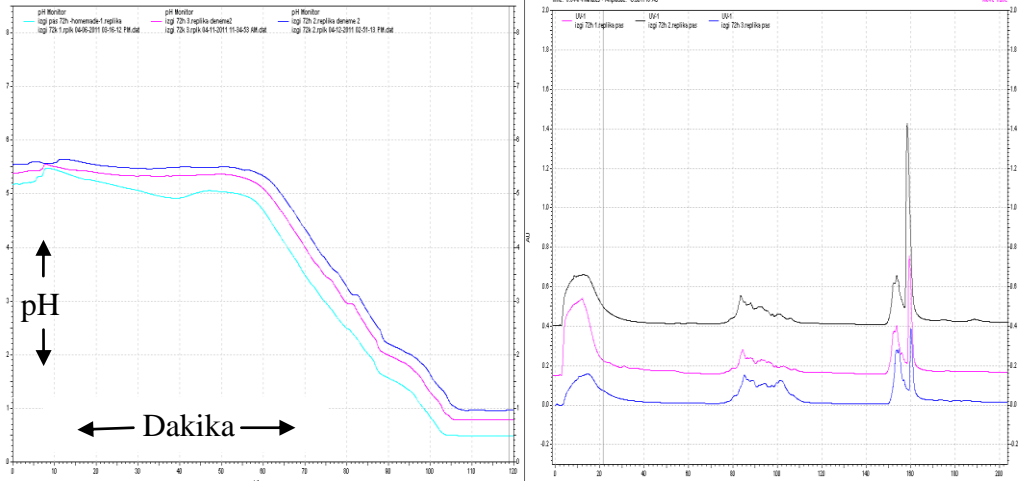
Şekil 4.17: İzgi2001 de enfeksiyonun 72. saatinde alınan yaprak örneklerinden (enfekte ve kontrol) izole edilen proteinler

M: Protein marker, E/I: enfekte grup/ I. biyolojik tekrar, K/I: kontrol grubu/ I. biyolojik tekrar

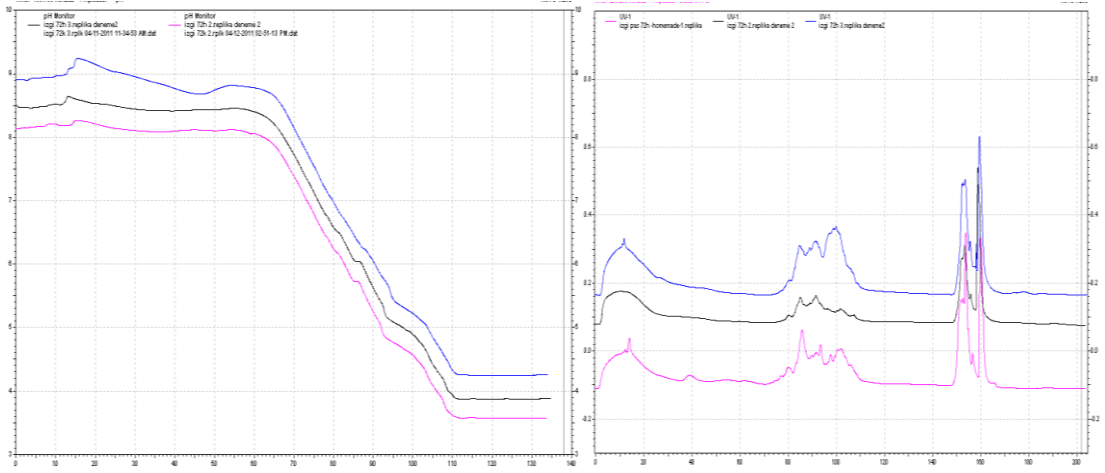
Hem patojen uygulanmış hemde kontrol materyaline ait 3 biyolojik tekerrürün total protein örnekleri arka arkaya 2.5 mg olacak şekilde PF-2D sistemine yüklendi ve II boyutlu ayırım gerçekleştirildi.

4.2.3. Biyolojik Tekrarların Karşılaştırılması

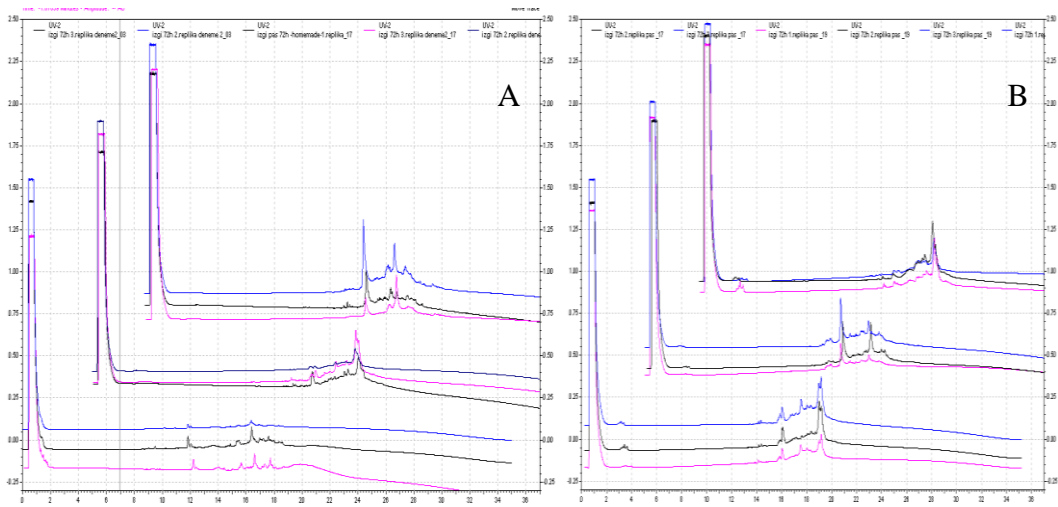
PF-2D ile iki boyutlu ayırımı gerçekleştirilen enfekte ve kontrol grubuna ait biyolojik tekrarların I. ve II. boyut verileri kendi içinde karşılaştırılarak sistemin tekrarlanabilirlik özelliği ortaya kondu. Bu amaçla Şekil 4.18, 4.19 ve 4.20 de görüldüğü gibi enfekte ve kontrol grubunu oluşturan 3 biyolojik tekrarın pH gradientleri, I. boyut kromatogramların kendi içinde son derece uyumludur. Ayrıca şekil 4.20 de sadece rasgele seçilen 3 fraksiyonda görüldüğü gibi, biyolojik tekrarlara ait II. boyut ayırım yapılan tüm fraksiyonlar karşılaştırılmış ve II. boyut kromatogramlarının büyük oranda eşleştiği gözlenmiştir. Son olarakta bu kromatogramlar DeltaVue programında eşleştirilerek (Şekil 4.21) tekerrürlerin karşılaştırılması tek tek protein düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Bu eşleşmelerden rasgele seçilen 5 fraksiyon LC-ESI-MS/MS analizi ile tanımlanmıştır. Şekil 4.21 de görüldüğü gibi iki biyolojik tekrara ait tanımlanan proteinlerin aynı proteinler olması örnek hazırlığı ve ayırımı aşamalarının standart biçimde gerçekleştirildiğini açık biçimde ortaya koymaktadır.



Şekil 4.18: Kontrol grubuna ait pH gradientleri ve I. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması

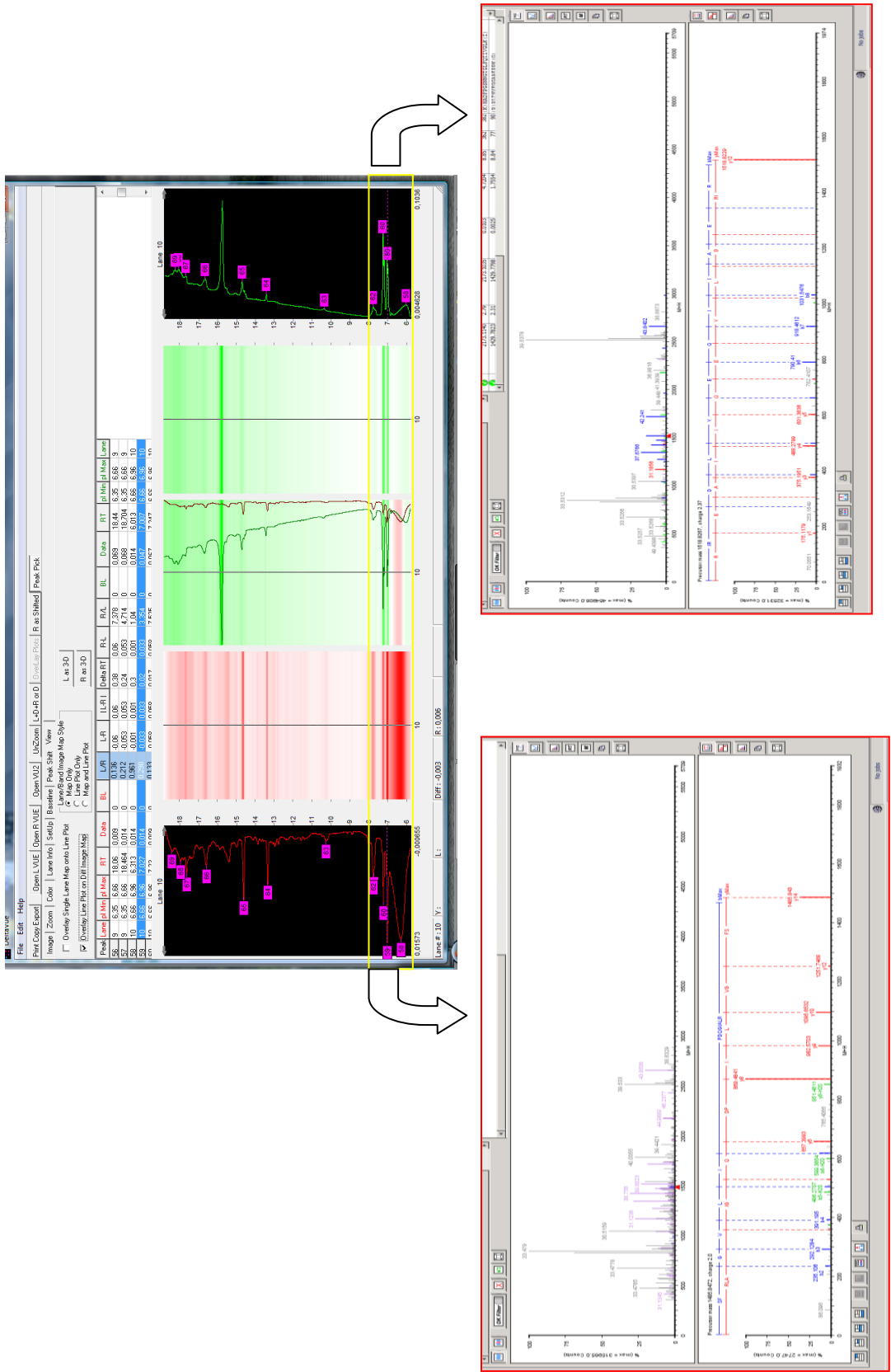


Şekil 4.19: Enfeksiyon grubuna ait pH gradientleri ve I. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması



Şekil 4.20: 3 biyolojik tekrara ait II. boyut kromatogramlarının karşılaştırılması

A; Kontrol grubu B; Enfekte grubu örnekleri göstermektedir



Şekil 4.21: İki biyolojik tekrara ait 10. fraksiyondan seçilen 58,59,60 nolu proteinlerin ESI-MS/MS analiz sonuçları

4.3. KÜTLE SPEKTROMETRE ANALİZLERİ

DeltaVue programında kontrol ve enfekte protein profillerinin tek tek karşılaştırılması sonucunda toplamda 637 tane pik belirlenmiştir. Bunlardan 25 tanesinde anlatım düzeyinin en az 3 kat farklı olduğunun gözlenmesi bazı proteinlerin dayanıklılık cevabında rol almış olabileceklerini düşündürmüştür. Bu nedenle bu 25 protein pikinin LC-ESI-MS/MS analizi yapılmıştır. Tanımlanan proteinler Tablo 4.6 verilmiştir.

Tablo 4.6: Enfekte ve kontrol örneklerinin karşılaştırılması sonucu LC-ESI-MS/MS analizi ile tanımlanan proteinler

P27665	PSBO WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBO PE 2 SV 1
P00871	RBS1 WHEAT Ribulose biphosphate carboxylase small chain PWS4 3 chloroplastic OS Triticum aestivum
P69415	PSAC WHEAT Photosystem I iron sulfur center OS Triticum aestivum GN psac PE 3 SV 2
P24846	DAPA1 WHEAT Dihydrodipicolinate synthase 1 chloroplastic OS Triticum aestivum PE 1 SV 1
Q7X9A6	UCRIA WHEAT Cytochrome b6 f complex iron sulfur subunit chloroplastic OS Triticum aestivum GN petC
P11383	RBL WHEAT Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS Triticum aestivum GN rbcL PE 1 SV 2
Q9LKC9	RBR1 MAIZE Retinoblastoma related protein 1 OS Zea mays GN RBR1 PE 1 SV 2
Q0U397	MRH4 PHANO ATP dependent RNA helicase MRH4 mitochondrial OS Phaeosphaeria nodorum GN MRH4 PE 3 SV 2
P27665	PSBO WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBO PE 2 SV 1
Q9ZP21	TRXM WHEAT Thioredoxin M type chloroplastic OS Triticum aestivum PE 2 SV 1
P00228	FER WHEAT Ferredoxin chloroplastic OS Triticum aestivum GN PETF PE 1 SV 2
Q00434	PSBP WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBP PE 2 SV 1
O40987	REPA MSVSE Replication associated protein A OS Maize streak virus genotype C isolate Set GN C1 PE
Q9ZP21	TRXM WHEAT Thioredoxin M type chloroplastic OS Triticum aestivum PE 2 SV 1
Q43206	CATA1 WHEAT Catalase 1 OS Triticum aestivum GN CAT1 PE 2 SV 1
P27665	PSBO WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBO PE 2 SV 1
Q00434	PSBP WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 2 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBP PE 2 SV 1
Q0UN58	PSF1 PHANO DNA replication complex GINS protein PSF1 OS Phaeosphaeria nodorum GN PSF1 PE 3 SV 1
Q6TCF2	ACT GAEGA Actin OS Gaemannomyces graminis var avenae GN ACT PE 2 SV 1
P04866	COAT BSMV Coat protein OS Barley stripe mosaic virus PE 4 SV 1
P11383	RBL WHEAT Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS Triticum aestivum GN rbcL PE 1 SV 2
P69415	PSAC WHEAT Photosystem I iron sulfur center OS Triticum aestivum GN psac PE 3 SV 2
Q0U913	EFG1P PHANO rRNA processing protein EFG1 OS Phaeosphaeria nodorum GN EFG1 PE 3 SV 1
P00228	FER WHEAT Ferredoxin chloroplastic OS Triticum aestivum GN PETF PE 1 SV 2
Q9ZP21	TRXM WHEAT Thioredoxin M type chloroplastic OS Triticum aestivum PE 2 SV 1
P27665	PSBO WHEAT Oxygen evolving enhancer protein 1 chloroplastic OS Triticum aestivum GN PSBO PE 2 SV 1
Q0U2G5	CLP1 PHANO Protein CLP1 OS Phaeosphaeria nodorum GN CLP1 PE 3 SV 1
Q8LK61	GAPN WHEAT NADP dependent glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase OS Triticum aestivum GN GAPN PE 1
P38076	CYSK WHEAT Cysteine synthase OS Triticum aestivum GN CYS1 PE 2 SV 1
Q4I785	SMP3 GIBZE GPI mannosyltransferase 4 OS Gibberella zeae GN SMP3 PE 3 SV 1
Q0UUE1	LMBD1 PHANO Probable lysosomal cobalamin transporter OS Phaeosphaeria nodorum GN SNOG 04623 PE 3 SV

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli organizmalarda tüm genom çalışmalarının tamamlanması ile ortaya konan veriler ve ardından devam eden gen anlatım çalışmaları sonucu elde edilen bilgiler daha somut verilere ulaşmak için proteom çalışmalarının gerekliliğini ortaya koymuştur (Salekdeh ve diğ., 2002; Chinnusamy ve diğ., 2004). Bu nedenle son yıllarda tüm dünyada moleküler biyolojideki araştırmaların önemli bir kısmı proteomik alanına kaymıştır. Proteomik alanındaki gelişmeler, önemli teknik gelişmelere ve protein veri bankalarının yaygınlaşarak zenginleşmesine paralel olarak devam etmektedir. Bugün artık proteomik çalışmalarla, sadece bir canlı sistemde, belirli bir dönemde bulunan tüm proteinlerin tanımlanmalarını değil aynı zamanda yapısal ve işlevsel özellikleri, birbirleri ile olan etkileşimleri ve biyolojik olaylardaki sinyal ağlarının ortaya konması da mümkün olmaktadır. Ancak bitki türlerinde karşılaşılan metodolojik sıkıntılar ile genomik ve proteomik veri tabanlarının diğer organizmalara göre daha sınırlı oluşu nedeniyle proteomiğin sunduğu potansiyel bitki araştırmacıları tarafından tam olarak kullanılamamaktadır (Jorin ve diğ., 2007). Özellikle ülkemizde henüz başlangıç aşamasında olan bitki proteomiği alanında, sadece birkaç grup çalışmaktadır. Bu nedenle sunulan tez çalışması, son yıllarda tüm dünyada önemi artarak devam eden bitki proteomiği alanında ülkemizdeki çalışmaların yaygınlaşmasına ve güçlenmesine katkı sağlamayı temel hedef olarak belirlemiştir. Bu amaç doğrultusunda, proteomik alanındaki yeni teknolojilerden biri olan 2D-LC sisteminin aktif ve etkin biçimde kullanımını sağlayacak parametreler optimize edilmiş ve bitki materyali olarak da büyük genomu nedeniyle proteomik uygulamalardaki sınırlamaların daha fazla yaşandığı buğday bitkisi seçilmiştir.

Daha önce belirtildiği gibi proteomik çalışmalar, ayırma, tanımlama ve verilerin analizi olmak üzere 3 temel aşamayı içermektedir. Bir proteom analizinin başarısında, başlangıçta karışım halinde bulunan proteinlerin, tek tek, kaliteli, doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir biçimde ayırımı son derece önemli bir aşamadır (Agrawal ve diğ., 2005; Lambert, ve diğ., 2005). Bu aşamada yaygın olarak kullanılan 2D-PAGE yönteminin dezavantajlarına alternatif olarak geliştirilen 2D-LC sistemleri, çok sayıda total protein örneğinin daha hızlı, güvenilir ve güçlü biçimde ayırımına imkan sağlamaktadır (Fröhlich ve Arnold, 2006). Bu nedenle gerçekleştirilen tez çalışmasında öncelikle bir

2D-LC sistemi olan PF-2D'nin proteinlerin ayrımında, etkin ve aktif biçimde kullanımını sağlayacak parametreler optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra da sistemin kullanılabilirliğini ortaya koymak üzere buğdayda sarı pas hastalık dayanıklılığında rol alan proteinlerin belirlenmesi yönünde bir model çalışma gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında, ilk olarak sistemin kullanımında pahalı ve önemli bir sarf olan pH gradient tamponları (Start ve Eluent), laboratuarda yapılarak sistemde başarılı biçimde kullanılabilir hale getirilmiştir. Normal süreçte bu tamponlar, sistemin üreticisi firma tarafından üretilip ticari olarak satılmaktadır ve 10 örnek için maliyeti yaklaşık 4.000 TL civarındadır. Buna ek olarak uzun ithalat süresi ve bu süreçte meydana gelebilecek soğuk zincirde kırılmalar nedeniyle tamponların bozunması da söz konusudur. Dolayısıyla bu tamponlar sistemin kullanımını sınırlayan önemli bir faktördür. Ticari olarak temin edilen bu kitlerde tampon içeriği belirtilmemekle birlikte yapılan literatür çalışmasında Barre ve Solioz (2006)'un makalesinde tamponların içerik bilgisi elde edilmiştir. Öncelikle makalede verilen içerik bilgisi birebir uygulanarak tamponlar hazırlanmış ve PF-2D sisteminde I. boyut ayırım için kullanılmıştır. Hazırlanan tamponların kullanılabilirliğindeki en önemli parametreler; pH gradientinin başlangıç ve bitiş noktaları ile süresidir. Ticari tamponlarda gradientin başlangıç noktası pH 8.0, bitiş noktası ise pH 4.0'dür ve gradientin tamamlanma süresi ortalama olarak 55 dakikadır. Gradient tamamlanma süresi önemli bir kriterdir. Çünkü sürenin 50 dakikadan daha kısa olması toplanan fraksiyonlardaki örnek hacminin II. boyut ayırım için yetersiz olmasına, uzun sürmesi ise toplanan fraksiyonlardaki protein konsantrasyonunun düşmesine dolayısıyla da II. boyut ayırma transfer edilecek protein miktarının az oluşuna sonuç olarak da LC-ESI-MS/MS analizleri için yetersiz örnek eldesine sebep olmaktadır. Bu nedenle hazırlanan tamponların, I boyut kolonunda oluşturduğu pH gradientinin başlangıç ve bitiş noktalarının yanı sıra tamamlanma süresi de ticari olarak temin edilen tamponlarla karşılaştırılarak incelenmiştir.

Barre ve Solioz (2006)'un önerdiği kimyasal içerikleri birebir uygulandığında elde edilen pH gradiyentinin beklendiği gibi 8.5'da başladığı ancak sonlanmadığı görülmüş, ayrılan fraksiyonların hacimlerinin de 1 ml'nin üzerinde olduğu görülmüştür. PF-2D

sisteminde gradient oluşumunda etkili kimyasal, Eluent tampon hazırlığında kullanılan “polybuffer 74”dür. Dolayısıyla sonraki tampon hazırlıklarında ticari kitle aynı sürede ve aralıkta pH gradienti sağlayacak polybuffer içeriğini belirlemek üzere denemeler yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda %12,5 polybuffer içeren Eluent tampon kullanıldığında elde edilen pH gradientinin ticari tamponlarla elde edilen pH gradienti ile yüksek oranda bezerlik gösterdiği gözlenmiştir. Ticari tamponlarla oluşturulan pH gradienti 55 dakikada tamamlanmış ve toplanan fraksiyonların hacimleri 0.3-0.9 ml aralığında gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılan Start tampon ve %12,5 polybuffer içeren Eleunt tamponlar ile oluşturulan pH gradientinin tamamlanma süresi 53 dakika ve ayrılan fraksiyonların hacimleri ise yaklaşık olarak 0.3-0.6 ml arasındadır. Ayrıca tez kapsamında optimize edilen bu tamponlarla ticari tamponların izoelektrik odaklamadaki (cromatofocusing) etkinliğinin karşılaştırılması amacıyla da aynı protein örneğinin hem ticari hem de optimize edilen tamponlar kullanılarak PF-2D de ayrımı yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda protein örneğinin hem ticari hem de optimize tamponlarla elde edilen I. boyut kromatogramları üst üste çakıştırılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular her iki tampon grubu ile yapılan denemelerde hemen hemen aynı kromatogramların elde edildiği göstermiştir (Şekil 4.6). Yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda tez kapsamında laboratuvarında yapılan Start tampon ve Eluent tamponun ticari tamponların yerine kullanılabileceği ve bu sayede PF-2D sisteminin kullanım maliyetinin yaklaşık % 30 oranında azaltılabileceği sonucuna varılmıştır. Barre ve Solioz (2006)’un maklesinde de laboratuvarında hazırlanan ve taze olarak kullanılan tamponların daha kontrol edilebilir olduğu, sağlıklı ayırım yaptığı ve ekonomik olduğu vurgulanmaktadır. Elde edilen sonuçlar, sistemin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerden biri olan maliyeti azaltması ve uzun ithalat süresini ortadan kaldırması nedeniyle kullanımının yaygınlaşmasında önemli katkı sağlayacak niteliktedir.

Optimizasyon aşamasında ikinci olarak, başarılı bir proteomik çalışma için başlangıçta PF-2D sistemine yüklenecek protein miktarının belirlenmesi yönündeki denemeler gerçekleştirilmiştir. Üretici firma tarafından önerilen protein miktarı 0,5-2 mg arasındadır. Ancak yapılan ön denemelerde belirtilen alt değere yakın miktardaki (0,65 mg) proteinin yeterli olmadığı, II. boyut ayırım sonucunda rastgele seçilen fraksiyonlardaki protein miktarının ortalama olarak 4 ng’den az olduğu görülmüştür. II.

Boyut ayırında elde edilen bir fraksiyonda ortalama olarak 4-10 farklı protein bulunabilmektedir. Bu durumda bir fraksiyondaki protein miktarının 4 ng'dan az olduğu ve bu fraksiyonun 4-10 arasında protein içerdiği düşünüldüğünde fraksiyondaki her bir proteinin miktarının yaklaşık olarak 1 ng'dan az olacağı ve dolayısıyla LC-MESI-MS/MS analizi için yetersiz kalacağı açık biçimde görülmektedir. Bu nedenle başlangıçta PF-2D sistemine yüklenecek protein miktarının net olarak belirlenmesi son derece önemlidir. Bu amaçla 0.75, 1 ve 2 mg aralığında olan protein örnekleri ile denemeler yapılmış ve II. boyut ayırından elde edilen fraksiyonlarda protein miktarına bakılmıştır. Ayrıca tek boyutlu SDS-PAGE'de analiz edilerek gümüş boyama ile de görüntülenmişlerdir. 1 mg proteinle yapılan ayırmanın II. boyut fraksiyonlarında ortalama 10 ng'dan az protein olduğu, 2 mg protein içeren örneğin II. boyut fraksiyonlarında ise 20-150 ng arasında protein olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 2 mg protein ile yapılan denemelere ait 10 fraksiyon seçilerek LC-ESI-MS/MS analizine gönderilmiş ve 10 fraksiyonda 18 adet protein tanımlanmıştır (Tablo 4.5). Elde edilen sonuçlar, PF-2D sistemi ile yapılacak bir proteomik çalışmada başlangıç protein miktarının 2 mg olması gerektiğini ortaya koymuştur. Böylece tez kapsamında yapılan optimizasyon çalışmaları ile PF-2D sisteminin rutin biçimde kullanımı için gerekli iki önemli parametrede net değerler ortaya konmuş ayrıca ara kademelerde de sistemin daha etkin kullanımını sağlayacak düzenlemeler yapılmıştır.

Tarımsal alanda üretimi artırmak üzere artan talep doğrultusunda biyoteknolojik yöntemler yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu alanda gerçekleştirilen moleküler çalışmaların önemli bir kısmı, çeşitli biyotik ve abiyotik stres etmenlerine karşı bitkinin sahip olduğu doğal dayanıklılık mekanizmalarının moleküler düzeyde aydınlatılması ve bu mekanizmalarda rol alan gen ve gen ürünlerinin belirlenmesi yönündedir. Bu çalışmaların ileriye dönük ortak hedefi; mekanizmaların aydınlatılması ile kısa sürede dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve son derece verimli olan hassas genotiplerin dayanıklı hale getirilmesine olanak sağlayacak moleküler verilerin ortaya konmasıdır. Patojenle enfeksiyon sonrasında ister dayanıklı ister hassas olsun tüm konukçu bitkilerde protein düzeyinde sayısız değişimler meydana gelmektedir. Bu proteinlerin rol aldığı biyokimyasal değişimler ile de bitkinin patojen saldırısına karşı nasıl bir cevap oluşturacağı ortaya konur. Bu kapsamda proteomik çalışmalar, biyolojik mekanizmalarında iş gören hedef enzim ve proteinlerin belirlenmesinde daha somut

verileri ortaya koyması nedeniyle tercih edilmektedir. Protein düzeyinde elde edilen veriler dayanıklı yeni çeşitlerin kısa sürede geliştirilmesi ve verimli olan hassas genotiplerin istenilen özelliklerinin korunarak dayanıklı hale getirilmesinde daha etkin yaklaşımları ortaya koyabilmektedir.

Bu nedenle tez çalışmasında birincil olarak PF-2D sisteminin bitki proteomik çalışmalarında kullanımı optimize edilmiş daha sonrada sistemin kullanılabilirliğini ortaya koymak amacıyla bir model çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada buğday verimini sınırlayan önemli etmenlerden biri olan sarı pas hastalık dayanıklılığında rol alan proteinlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yapılan model çalışmada, öncelikle bitkide (İzgi2001) eş zamanlı olarak bir yandan yapay inokülasyonla enfeksiyon oluşturulmuş bir yandan da karşılaştırma yapılacak kontrol bitkiler hazırlanmıştır. Enfeksiyondan sonraki 72. saatte enfekte ve kontrol bitkilerden yaprak örnekleri alınarak bu örneklerden izole edilen proteinler PF-2D sisteminde 2 boyutlu ayrılmışlardır. Ardından enfekte ve kontrol örneklere ait protein profilleri tek tek protein bazında karşılaştırılmıştır. Tüm çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda enfekte ve kontrol bitki materyalinde 637 protein piki eşleştirilerek karşılaştırılmış ve ekspresyon farkı olan 25 adet protein piki seçilmiştir. Seçilen proteinlerin bulunduğu fraksiyonlarda tanımlama LC-ESI-MS/MS analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Bu analizler sonucunda 31 adet protein tanımlanmıştır, bunlardan 9 tanesinin dayanıklılık mekanizmasında rol aldığı belirlenmiştir (Tablo 4.6). Ayrıca bu proteinlerin, protein veri bankaları taranarak hücre içi lokasyonu stoplazma ve kloroplastta olarak bulunmuştur, detaylı rolleri ise aşağıda bitki dayanıklılık mekanizmasına ilişkin özet literatür bilgileri ile birlikte sunulmuştur. Curto ve diğ. (2006) tarafından bezelyede yapılan benzer çalışmada külleme hastalığına karşı bitkinin dayanıklılık cevabında rol alan proteinler belirlenmeye çalışılmıştır. Tanımlanan proteinler arasında 10 tanesinin fotosentez ve karbonhidrat metabolizmasında, 3 tanesinin krebs döngüsünde, 4 tanesinin protein sentezi ve yıkımında, 15'inin ise bitkinin stres toleransı ve savunma cevabında rol aldığı bulunmuştur. Bazargani ve diğ. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise buğdayda kuraklık tarafından tetiklenen

senesens ve oksidatif stres cevabında rol alan proteinler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada 82 tane protein tanımlanmış bunlardan 13 tanesinin stres ve dayanıklılıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bitkide dayanıklılık cevabına yönelik bir başka çalışma Lee ve diğer. (2006) tarafından pirinçte yapılmıştır. Bu çalışmada da pirinçte fungal patojen *Rhizoctonia solani* karşı bitkinin savunma mekanizmasında rol alan proteinler araştırılmış ve toplam 18 tane protein tanımlanmış ve bunlardan 11 tanesinin dayanıklılıkla ilişkili proteinler olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde, ODTÜ’de Neşe Özgazi (2010) tarafından gerçekleştirilen Yüksek lisans tezinde ise arpada külleme hastalığı dayanıklılığı proteomik olarak incelenmiş ve 38 proteinin tanımlanması yapılmıştır. Bunlardan 17 tanesinin fotosentez metabolizması ile 6 proteinin ise dayanıklılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur.

Buğdayda sarı pas için dayanıklılık cevabı ırka özgü ve ırka özgü olmayan şeklinde oluşmaktadır (Johnson, 1988). Irka özgün dayanıklılık, tek bir majör *R* geni ile kontrol edilir. Irka özgü olmayıp, süreklidir ve daha geç oluşmaktadır. Bugüne kadar 40 adet sarı pas dayanıklılık (*Yr*) geni tanımlanmıştır (Chhuneja ve diğ., 2008). Belirlenen sarı pas dayanıklılık genlerinin çoğu türe özgü koruma sağlar. Dayanıklılık, uygun avirulens geni taşıyan *P. striiformis* f. sp. *tritici* ırklarına karşıdır (Boyd, 2005).

Bitkiler çok sayıda patojen ile karşılaşmakta ve karmaşık savunma sistemleri sayesinde çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Bitkiler bu yolla patojen atağını algılamakta, sınırlandırmakta ve karşı atağa geçebilmektedir (Kitajima ve Sato, 1999; Selitrennikoff, 2001). Bu savunma sistemlerinden biri, gene-karşı-gen (gene for gene) modelidir ve bitkide, herhangi bir patojene karşı oluşan dayanıklılık, biri konakta (*R* geni) diğeri patojende (*Avr* geni) bulunan bir çift dominant genin ürünlerinin etkileşiminin ardından ortaya çıkar. Bu etkileşim sonucunda, bitki patojeni tanımış olur ve dayanıklılık mekanizmalarını başlatır. *Avr* gen ürünü, *R* genini aktif hale getirir ve bu genin ürünü de savunma yanıtını başlatacak olan sinyallerin iletimini sağlar. Böylece *Avr-R* gen etkileşiminin tetiklediği dayanıklılık mekanizmasında, sistemik kazanılmış dayanıklılığı (SAR) (Systemic Acquired Resistance) tetikleyen salisilik asit (SA) birikimi gözlenir (Feys ve Parker, 2000). Patojenin varlığı ile oluşan sinyal *R* genleri

tarafından tanınır ve aktifleşen sinyal yolları sonucu enfeksiyon bölgesinde plazma zarının geçirgenliğinde değişiklik, iyon kanallarının hızlı etkinlik göstermesi, oksidatif patlama, reaktif oksijen türlerinin (ROS) (Reactive Oxygene Species) üretimi, antimikrobiyal bileşenlerin birikimi ve hücre duvarının kalınlaştırılması gibi değişimler gerçekleşir. Ayrıca patojenin bulaştığı kısımlarda bölgesel olarak hızlı ve programlı hücre ölümü (HR) tetiklenir (Şekil 4.15). Meydana gelen hücre ölümü, patojenin besin kaynaklarına ulaşması ve üremesini engelleyerek patojenin büyümesini sınırlar (Hammond-Kossack ve Jones, 1997). Direnç cevabının başlayabilmesi için sinyal moleküllerine ihtiyaç duyulur. “Elisitörler” olarak adlandırılan bu sinyal molekülleri oligosakkaritler, glikoproteinler ve glikopeptidler olarak tanımlanmıştır. Elisitörler belirli bir konak bitki ve patojen sistemine özel olabilmekte veya yayılan patojene özgü çok genel hücre duvarı bileşeni olabilmektedir (Ebel ve Casio,1994; Wojtaszek, 1997).

Geniş spektrumlu patojenlere karşı HR ve diğer nekrotik reaksiyonları takiben gelişen SAR, endojen olarak sentezlenen salisilik asit miktarının artışı ile tanımlanır (Vallad ve Goodman, 2004; Malamy ve diğ., 1990; Métraux ve diğ., 1990). SAR, patogenez ilişkili (PR) proteinleri kodlayan genlerin aktifleşmesi ile ilişkilidir (Van Loon ve Van Strien, 1999). Bu şekilde hücrel savunma cevabı, teşvik edilmemiş bitkiye göre çok hızlı şekilde ve büyük oranda gerçekleşir (Mur ve diğ., 2006). Bitki ve elisitöre bağlı olarak SAR’ın gelişebilmesi için bitkide salisilik asit ile ilişkili transkriptlerin birikimi gereklidir (Cameron, 2000). Bitki salisilik asit biriktirme yeteneğini kaybederse patojenin uyarıcı olarak kullanıldığı durumlarda bile patogenezle ilişkili gen anlatımı gerçekleşmez ve SAR başlatılamaz (Lawton ve diğ., 1995; Vallad ve Goodman, 2004). SAR çeşitli bitki aileleri arasında korunmuşluk gösterir ve geniş ölçekte viral, bakteriyel patojenler ve mantarlara karşı etkilidir (Sticher ve diğ., 1997).

Uyarılmış sistemik dayanıklılığın (ISR) sinyal yolu ise patojen bulaşması ile başlar ve klasik SAR yolundan farklılık gösterir. SAR nekrotik bir patojenin enfeksiyonu sonucu oluşan sistemik olarak teşvik edilen bir hastalık direnç formudur (Ryals ve diğ., 1996). Salisilik asidin yanında, bitki büyüme düzenleyicilerinden jasmonik asit ve etilen de bitki savunma cevabında etkilidir (Boller, 1991; Wasternack ve Parthier, 1997).

Tez çalışmasında tanımlanan proteinler içinde herhangi bir *R* proteinine rastlanmamış, ancak SAR'da rol aldığı tahmin edilen, özellikle de oksidatif stres, HR gelişimi ve hücre zarındaki değişimlere ilişkin proteinler ile elisitör olabilecek yapıdaki proteinler aşağıda sıralanmıştır.

ACTIN; Fungal patojene karşı hücre yüzeyinde etkili engellerin kurulmasına katkıda bulunan yapısal bir proteindir. Arpa epidermal hücrelerinde *Blumeria graminis* f. sp patojenine karşı bazal savunma için ve *mlo* aracılı hücre duvarı direnci için daha fazla aktine gerek duyulduğu gösterilmiştir. Fakat bu ırka özgü immün cevap için değildir (Miklis, 2007).

GAPDH- karbon metabolizmasının merkezi yolları ile ilgili bir enzimdir, farklı subsellüler lokalizasyonlarda bulunur ve çeşitli roller sergiledikleri tespit edilmiştir. Görevlerinden biri de programlı hücre ölümünün başlatılmasıdır (Abdelghani ve diğ., 2002 ; Alexander ve diğ., 1997).

CYKS (sistin sentaz) ve UCRIA Sitokrom b6 ; sitokrom b6 oksidaz ve sistin dioksijen toleransında ve oksidatif strese karşı korumada önemli rol oynarlar. Bu kompleksler elektron taşıma zincirinde ve ATP oluşumunda yer alır ve böylece hücre içinde hayati bir rol oynamaktadırlar (Brouin ve diğ., 2002 ; Rouhier ve diğ., 2005).

DAPA1 (diğer kısa adı DHPC)- Aminoasit sentezinden sorumludur. Ayrıca programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozda da rol almaktadır (Scot ve diğ., 2003)

Katalaz 1 ; Hücre içinde peroksizom organelinde bulunan hücrede zehir etkisi yapan hidrojen peroksiti su ve hidrojene parçalayabilen enzimdir (Zhong ve diğ., 1996 ; Frugoli ve diğ., 1998)

Thioredoxinler : bol bulunan disülfid redüktaz enzimleridir ve hedef proteinlerin redoks durumunu düzenlemekle görevlidirler. Bitki Thioredoxinleri diğer organizmalarda bulunmayan çarpıcı bir çeşitlilik göstermesine rağmen bir çok fizyolojik rolleri bulunmaktadır. Son çıkan yayınlar incelendiğinde, thioredoxinin bitki oksidatif stresi toleransında temel bir rol oynadığı görünmektedir. Bu enzimler detoks lipid

hidroperoksid ve ya okside protein kaynaklarının gücünü azaltarak oksidatif zararın etkisini azaltırlar. Ayrıca diğer bulunan kanıtlar tioredoksinin süper radikallerin temizlemesinde düzenleyici olarak ve bitki antioksidan ağ sinyali yolları bileşenleri olarak görev aldığını göstermektedir (Vieira ve diğ., 2006).

Fd (Ferredoxin) : çeşitli esansiyel oksidoredüktif yolları azaltarak bitki hücre metabolizmasında çok önemli bir rol oynar . Bir çok organizmada Fd düzeyleri olumsuz çevre koşullarında düşer, buna kloroplastlarla aynı atadan gelen siyanobakterler de dahildir. Oksidant ve stres koşullarına maruz kalan bitkilerde kloroplast fd sinde düşüş gözlenmektedir (Tognetti ve diğ., 2006).

DHDPS : Dihydrodipicolinate synthase 1, aspartatdan türev alan amino asitlerin özellikle de lizinin biyosentezinden sorumludur. Bununla birlikte fungal enfeksiyonlarda rol aldığı gözlenmiştir (Kim ve diğ., 2007).

CLP protein ; ATP hidrolizini gerektiren bir süreçte çeşitli proteinleri peptidlerine parçalar. Kimotripsin benzeri bir aktivitesi vardır. Yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunda önemli bir rol oynar. ATP ve magnezyum varlığında proteinleri küçük peptidlere hidroliz eder. ATP yokluğunda yalnızca 5'li oligopeptidleri hidrolize edebilir. Subselluler lokasyonu kloroplastlar ve stromalardır. En çok yapraklarda daha az olarak kök ve gövdede görülür. Yapraklarda yaşlanma sırasında ve soğuk stres koşullarında birikir (Peltier ve diğ., 2004 ; Rudella ve diğ., 2006).

Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular ile bitki proteomik çalışmalarında 2D-LC sisteminin daha etkin kullanılarak metodolojik sıkıntıların azaltılabileceği ve sisteminin sunduğu avantajlar sayesinde ulusal düzeyde bitki proteom analizlerinin yaygınlaşmasına katkıda bulunulacağı düşünülmektedir. Ayrıca yapılan bu tez çalışması, ülkemizin proteom alanında güçlenmesine, bu alanda nitelikli araştırmacı kitlesinin, bilgi birikiminin oluşturulmasına ve uluslar arası araştırma programlarında daha etkin yer almasına da katkı sağlanmış olmaktadır.

KAYNAKLAR

- ABDELGHANI, I., AURELIO, S., ABDELAZIZ, S., 2002, A phosphate-stimulated NAD(P) ϕ -dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Bacillus cereus*, *FEMS*,211:29-35
- ACH, R.A., DURFEE, T., MILLER, A.B., TARANTO, P., HANLEY-BOWDOIN, L., ZAMBRYSKI, P.C., and GRUISSEM, W. (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5077– 5086
- AGHAEI, K., EHSANPOUR, A. A., SHAH, A. H., KOMATSU, S., 2009, Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids*, 36, 91–98.
- AGRAWALA, G. K., YONEKURAB, M., IWAHASHI, Y., IWAHASHI, H., RAKWAL, R., 2005, System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *Journal of Chromatography*, (815):137–145.
- AHARONI, A., VORST, O., 2001 DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol Biol*, 48: 99-118.
- AKIYAMA, K., CHIKAYAMA, E., YUASA, H., SHIMADA, Y., TOHGE, T., SHINOZAKI, K., et al ., 2008, PRIME: a web site that assembles tools for metabolomics and transcriptomics. *In Silico Biol.* 8: 0027
- ALBERTS, B., BRAG, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D., 1994, Molecular Biology of the celi. 3 rd Ed, *Garland Publishing, Inc.*, NevvYork,
- ALBERTS, B., 1998, The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists, *Cell*, 92:291–294.
- ALEXANDORY, N.N., BROVER, V.V., FREIDIN, S., TROUKHAN, M.E., TATARINOVA, T.V., ZHANG, H., SWALLER, T.J., LU, Y.-P., BOUCK, J., FLAVELL, R.B., FELDMANN, K.A., 2009, Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing, *Plant Mol. Biol.* 69:179-194
- ALEXANDER, M., 1977, Introduction to Soil Microbiology, Wiley, New York
- ALLOUIS, S., G. MOORE, A. BELLEE, R. SHARP, P. FAIVRE RAMPANT et al., 2003, Construction and characterisation of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) BAC library from the reference germ-plasm “Chinese Spring.” *Cereal Res. Commun.* 31: 331–338.

- ALTSCHUL S.F, MADDEN T.L, SCHAFFER A.A, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN D.J., 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- ANDON, N.L., HOLLINGWORTH, S., KOLLER, A., GREENLAND, A.J., YATES J.R., HAYNES P.A., 2002, Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry. *Proteomics* (2):1156–1168.
- ANDERSON, L., AND SEILHAMMER, J., 1997, A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18, 533–537.
- BAGINSKY, S., GROSSMANN, J., GRUISSEM, W., 2007, Proteome analysis of chloroplast mRNA processing and degradation, *J Proteome Res*, 6: 809–820.
- BALMER, Y., VENSEL, WH., DUPONT, FM., BUCHANAN, BB., HURKMAN, WJ., 2006, Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability. *J Exp Bot* 57:1591–1602.
- BANERJEE, S., VISHWANATH, P., CUI, J., KELLEHER, D.J., GILMORE, R., ROBBINS, P.W., and SAMUELSON, J., 2007, The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 11676–11681.
- BARRE, O., SOLIOZ, M., 2006, Improved protocol for chromatofocusing on the ProteomLab PF2D, *Proteomics*, 6, 5096-5098.
- BEGÜM AKMAN, TANER TUNCER; 2007, Yaşamın Şifresi: İnsan Genom Projesi; *ODTÜ Yayıncılık*
- BLANCHARD, A. SETLOW, J., 1998, in Genetic Engineering, Principles and Methods, *Plenum Pres*, (Vol. 20):111–124.
- BOLLER, T., 1991, Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In the plant hormone ethylene, A.K. Mattoo and J.C. Suttle, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), 293–314.
- BOYD, L.A., 2005, Can Robigus defeat an old enemy? – Yellow rust of wheat, *Journal of Agricultural Science*, 143, 233-243.
- BREDERODE, F. T., LINTHORST, H. J. M., BOL, J. F., 1991, Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethphon treatment, UV light and wounding, *Plant Mol. Biol.*, 17, 1117–1125.
- BROIN, M., CUINE, S., EYMERY, F., REY, P., 2002, The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage, *Plant Cell*, 14:1417-1432

- BULDUK, S., 2004, *Gıda Teknolojisi*, İkinci Baskı, Detay Yayıncılık, Ankara
- CAMERON, R. K., 2000, Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know?, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 91–93.
- CARROLL, AJ., HEAZLEWOOD, JL., ITO, J., MILLAR, AH., 2007, Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol Cell Proteomics* 7:347–369.
- CHACE, DH., DİPERNA, JC., NAYLOR, EW., 1999, Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium. *Acta Paediatr Suppl* ; 432:45-7.
- CHAPMAN, K., 2002, The protein chip biomarker system from ciphergen biosystems: a novel proteomic platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem SocTrans*; 30: 82-87.
- CHEN, X.M., 2005, Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Can. J. Plant Pathol*, 27: 314–337.
- CHHUNEJA, P., KAUR, S., GARG, T., GHAI, M., KAUR, S., PRASHAR, M., BAINS, N.S., GOEL, R.K., KELLER, B., DHALIWAL, H.S., SINGH, K., 2008, Mapping of adult plant stripe rust resistance genes in diploid A genome wheat species and their transfer to bread wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 116, 313–324.
- CHINNUSAMY, V., SCHUMAKER, K., ZHU, J.K., 2004, Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 55:225-236.
- CLAVERİE, JM., NOTREDAME, C., 2007, Bioinformatics For Dummies. 2nd ed. Wiley Publishing INC. Hoboken, NJ
- CLERC, S., HIRSCH, C., OGGIER, D.M., DEPRez, P., JAKOB, C., SOMMER, T., and AEBİ, M., 2009, Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum, *J. Cell Biol.* 184: 159–172.
- COLLETT, A., TANİANİS-HUGES, J., WARHURST, G., 2004, Rapid induction of P-glycoprotein expression by high permeability compounds in colonic cells in vitro: a possible source of transporter mediated drug interactions, *Biochemical Pharmacology*, 68:783-790
- COMAI, L., MADLUNG, A., 2004, The effect of stress on genome regulation and structure, *Annals of Botany*, 94(4), 481-495.

- COOPER, M., 1997, "The Cell", A Molecular Approach , Press Washington DC
- CORAM T.E., WANG, M., AND CHEN, X., 2008a, Transcriptome analysis of the wheat–Puccinia striiformis f. sp. tritici interaction. *Molecular Plant Pathology* 2: 157-169.
- CORAM T.E., SETTLES M.L., CHEN X., 2008b, Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by Yr39 during the wheat-Puccinia striiformis f. sp. Tritici. Interaction *Molecular Plant Pathology* 4: 479-493.
- CURTIS, B.C., MACPHERSON, H.G., RAJARAM, S., 2002, Bread wheat improvement and production, Food and Agriculture Organization of the United Nations Corporate Document Repository, 9251048096.
- DAUGAS, E., SUSIN SA., ZAMZAMI, N., FERRI, KF., Innopoulou T., Larochette N., Prevost MC., Leber B., Andrews D., Penninger, J., and Kroemer, G., 2000, Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis, *FASEB J.*, 14: 729–739.
- DÜŞÜNCELİ, F., AKAR, T., YAZAR, S., DÖNMEZ, E., AVCI, M., 2007, Current status of wheat breeding in Turkey, *J. Agric. Res.*, 45 (1).
- DEMİRALP, DUYGU ÖZEL., 2008, POWERPOINT SUNU
- DETTMER, K., HAMMOCK, BD., 2004, Metabolomics – a new exciting field within the “omics” sciences. *Environ Health Persp*, 112: 396-7.
- DOVİCHİ, N.J., 1997, DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18 (12–13):2393–2399.
- EBEL, J., CASIO, E. G., 1994, Elicitors of plants defense responses, *International Review of Cytology*, 148, 1-36.
- EDGAR, N., VOLLMER, M., HÖRTH, P., AND VAD, C., 2004, 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Review of Proteomics*. (1):37-46. FİGEYS D. (2005) *Proteomics : The Basic Overview*, John Wiley & Sons, Inc., Ottawa, Canada, 471-45714-0.
- EGGERS, M. et al. 1994, *BioTechniques* 17:516–525.
- ENDLER, A., MEYER, S., SCHELBERT, S., SCHNEİDER, T., WESCHKE, W., PETERS SW., KELLER, F., BAGİNSKY, S., MARTİNOİA, E., SCHMİDT, UG., 2006, Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* 141:196–207.

- EPPLE, P., APEL, K., BOHLMANN, H., 1995, An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins, *Plant Physiol*, 109, 813–820.
- ERIKSSON, J., HENNING, E., 1896, Die Getreideroste, Norstedt & Soner, Stockholm.
- EVANS, WE., RELING, MV., 1999, Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286:487–491.
- FARMER, E.E., JOHNSON, R.R., RYAN, C.A., 1992, Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid, *Plant Physiol*, 98, 995–1002.
- FEYS, B. J., PARKER, J. E., 2000, Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *Trends in Genetics* 16, 449–455.
- FINNIE, C., 2006 Plant proteomics. *Annual Plant Reviews*, Volume 28, ISBN:1-405 1-4429-7. Blackwell Yayinevi
- FLEMING, K., MULLER, A., MACCALLUM, R.M., STERNBERG, M.J.E., 2004, 3D-GENOMICS: a database to compare structural and functional annotations of proteins between genomes. *Nucleic Acids Res.* 32, D245–D250.
- FRÖHLICH, T., AND ARNOLD G, J., 2006, Proteome research based on modern liquid chromatography – tandem mass spectrometry: Separation, identification and quantification. *J Neural Transm.* (113): 973–994.
- FUJIWARA, M., K. UMEMURA, et al., 2006, Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells, *Plant Physiology*, 140(2): 734-745.
- FUTCHER, B., LATTE, G.I., MONARDO, P., MCLAUGHLIN, C.S., AND GARRELS, J.I., 1999, A sampling of the yeast proteome. *Mol. Cell. Biol.* 19(11):7357–7368.
- GARY, E., ROBERT, V., GOODMAN, M., 2004, Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in conventional agriculture, *Crop Sci.*, 44, 1920–1934.
- GRAFI, G., BURNETT, R.J., HELENTJARIS, T., LARKINS, B.A., DECAPRIO, J.A., SELLERS, W.R., and KAELIN, W.G., Jr., 1996, A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoresduction *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8962–8967.
- GYGI, S., AND AEBERSOLD, R., 1999, Absolute quantitation of 2-D protein spots. *Methods Mol. Biol.* 112:417–421.

- GYGI, S., CORTHALS, G., ZHANG, Y., ROCHON, Y., AND AEBERSOLD, R., 2000 Evaluation of twodimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97(17):9390–9395.
- GYÖRGY MAKRO-VARGA., 2004, Proteomics principles and challenges. *Pure Appl Chem*; 76(4): 829-37.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D., 1997, Plant disease resistance genes, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48, 575-607.
- HEAZLEWOOD JOSHUA, L., AND MILLAR A. HARVEY., 2006, Plant Proteomics, Chapter: Plant proteomics: *Challenges and Resources* pp:1-31.
- HIRANO, H., ISLAM, N., KAWASAKI, H., 2004, Technical aspect of functional proteomic in plants. *Phytochemistry* 65:1487-1498.
- HORVATH, G.V., PETTEKO-SZANTNER, A., NIKOVICS, K., BILGIN, M., BOULTON, M.I., DAVIES, J.W., GUTIERREZ, C., DUDITS, D., 1998, Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis, *Plant Mol. Biol.* 38:699-712
- HYLANDER, N., JØRSTAD, I., NANFELDT, J.A., 1953, Enumeratio uredinearum scandinavicarum, *Opera Bot*, 1, 1–102.
- IRAR, S., BRINI, F., GODAY, A., MASMOUDI, K., PAGÈS, M., 2010, Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D) — A wider perspective of the proteome, *Journal Of Proteomics.*, 73, 1707-1721.
- JOHNSON, R., 1988, In SIMMONDS, N.W., RAJARAM, S. (eds), Durable resistance to yellow (stripe) rust in wheat and its implications in plant breeding, Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat, CIMMYT, Mexico, pp., 63-75.
- ISLAM, N., TSUJIMOTO, H., HIRANO, H., 2003a, Wheat proteomics: Relationship between fine chromosome deletion and protein expression. *Proteomics* (3): 307–316.
- ISLAM, N., TSUJIMOTO, H., HIRANO, H., 2003b, Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: Towards understanding genome interaction in protein expression *Proteomics* (3): 549–557.
- JAQUINOD, M., VILLIERS, F., KIEFFER-JAQUINOD, S., HUGOUVIEUX, V., BRULEY C., GARIN, J., BOURGUIGNON, J., 2006, A proteomic dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics* 6:394–412.
- JORRÍN, J.V., MALDONADO, A.M., 2007, Castillejo, M.A. Plant Proteomics, Plant proteome Analysis: A 2006 update. *Proteomics* 16: 2947-2962.

- KIM S.T., CHO K.S., YU S., KIM S.G., HONG J.C., HAN C., BAE D.W., NAM M.H. AND KANG K.Y., 2003, Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured cells. *Proteomics* 3: 2368-2378.
- KIM, HR., YANG, TJ., KUNDA, DA., WING, RA., 2004, Construction and application of genomic DNA libraries. In Handbook of Plant Biotechnology, Christou P, Klee H (eds). Wiley: Chichester;1, 71–80.
- KIM, Y., NANDAKUMAR, M., MARK R., 2007, Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation, *Fungal Genet.* doi:10.1016/j.fgb.2006.12.001
- KIRPEKAR, F., NORDHOFF, E., LARSEN, LK., KRISTIENSEN, K., ROEPSTORFF, P., HILLENKAMP, F., 1998 DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* ; 26: 2554-9.
- KLEFFMANN, T., VON, ZYCHLINSKI A., RUSSENBERGER, D., HIRSCHHOFFMANN M., GEHRIG, P., GRUISSEM, W., BAGINSKY, S., 2007, Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. *Plant Physiol* 143:912–923.
- KODADEK, T., 2002, Development of protein- detecting microarrays and related devices. *Trends Biochem Sci*; 27: 295-300.
- KONG, F., OYANAGI, A., KOMATSU, S., 2009, Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1804, 124–136.
- KITAJIMA, S., SATO, F., 1999, Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function, *J. Biochem*, 125, 1-8.
- LAMBERT, J.P., ETHIER, M., SMITH, J. C., AND FIGEYS, D., 2005, Proteomics: from Gel Based to Gel Free. *Anal. Chem.* (77):3771-3788.
- LANDER, ES., LINTON, LM., BIRREN, B., ET AL., 2001, “Initial sequencing and analysis of the human genome”, *Nature*, 409, 860-921,
- LAWTON, K., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., VERNOOIJ, B., UKNES, S., RYALS, J., 1995, Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but no ethylene, *Mol. Plant-Microb. Interact*, 6, 863–870.
- LICHTENHALER, M.D., 1996, Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants, *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.
- LIU, Y., LAMKEMEYER, T., JAKOB, A., MI, G. H. et al., 2006, Comparative proteome analyses of maize (*Zea mays* L.) primary roots prior to lateral root initiation reveal differential protein expression in the lateral root initiation mutant rum1. *Proteomics*, 4300–4308.

- M, KARATAFL., S, AKGÖL., H, YAVUZ., R, SAY., A, DENİZLİ., 2007, INT. J. *Biol. Macromol.* 40
- MAJOUL, T., CHAHED, K., ZAMİTİ, E., OUELHAZİ, L., AND GHRİR, R., 2000, Analysis by two-dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and salt-sensitive cultivar of wheat. *Electrophoresis* 21:2562-2565.
- MAJOUL, T., BANCEL, E., TRİBOİ, E., HAMİDA, J.B., BRANLARD, G., 2003, Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics* 3:175–183.
- MALAMY, J., CARR, J., KESSIG, D., RASKIN, I., 1990, Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection, *Science*, 250, 1002-1004.
- MARSALIS, M., A. AND GOLDBERG, N.P., 2006, Leaf, stem and stripe rust diseases of wheat, New Mexico State University, Guide A-415
- MENG, CK., FENN, JB., 1990, Analyzing organic molecules with electrospray mass spectrometry, *Am Biotechnol Lab*, 8: 54-60.
- MÉTRAUX, J. P., SIGNER, H., RYALS, J., WARD, E., WYSS-BENZ, M., GAUDIN, J., RASCHDORF, K., SCHMID, E., BLUM, W., INVERARDI, B., 1990, Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance, *Science* 250, 1004–1006.
- MILKIS, M., C. CONSONNI, et al., 2007, Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery, *Plant Physiology*, 144(2): 1132-1143.
- MORA, JF., VAN BERKEL GJ., ENKE, CG., COLE, RB., MARTÍNEZ-SANCHEZ M., FENN JB., 2000, Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*; 35: 939-52.
- MULLINEAUX, P.M., DONSON, J., MORRIS-KTSINICH, B.A.M., BOULTON, M.I., DAVIES J.W., 1984, The nucleotide sequence of maize streak virus DNA , *EMBO J.*, 3:3063-3068
- MUR, L. A. J., NAYLOR, G., WARNER, S. A. J., SUGARS, J. M., WHITE, R. F., LI, G. Q., LI, Z. F., YANG, W. Y., ZHANG, Y., HE, Z. H., XU, S. C., SINGH, R. P., QU, Y. Y., XIA, X. C., 2006, Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26*, *Theor Appl Genet.* DOI 10.1007/s00122-006-0245-y
- MUTCH, DM., WAHLİ, W., WILLIAMSON, G., 2005, Nutrigenomics and nutrigenetics: *the emerging faces of nutrition*, 19: 1602-1616.

- N.L. ANDERSON., M. POLANSKI., R. PIEPER., T. GATLIN., R.S. TIRUMALAI., T.P. CONRADS., T.D.VEENSTRA., J.N. ADKINS., J.G. POUNDS., R. FAGAN., A. LOBLEY., 2004, *Mol. Cell Proteomics* 3:311–326.
- NEDELKOV, D., 2008, ‘‘Population proteomics investigation of protein diversity in human populations’’, *Proteomics*, 8: 779-786.
- NEDELKOV, D., KIERNAN, UA., NIEDERKOFER, EE., TUBBS, KA., NELSON, RW., 2006, ‘‘Population proteomics: the concept, attributes and potential for cancer biomarker research’’, *Mol Cell Proteomics*, 5: 1811-1818.
- NOIR, S., T. COLBY, et al., 2009, A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp hordei) conidiospores, *Molecular Plant Pathology*, 10(2): 223-236.
- OUZOUNIS, CA., VALENCIA, A., 2003, Early bioinformatics: the birth of a discipline-a personal view. *Bioinformatics*; 19: 2176-90.
- ÖZCENGİZ, G., 2007, *Proteomik: Post-genomik dönemin en güçlü teknolojisi. ODTÜ Haber Bülteni*; 15: 13-9.
- ÖZCAN, S., YILDIRIM, V., KAYA, L., BECHER, D., HECKER, M., ÖZCENGİZ, G., 2007, Phanerochaete chrysosporium soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal response. *Proteomics*; 7: 1249-60.
- PANDEY, A., MANN, M., 2000, Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837–846.
- PARK, A.K., 2004, Proteomic studies in plant. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 133-138.
- PATTERSON, S.D., AEBERSOLD R.H. 2003, Proteomics: The first decade and beyond. *Nature Genetics Supplement*, 33: 111-323.
- PATERSON, AH., BOWERS, JE., BUROW, MD., et al., 2000, Comparative genomics of plant chromosomes. *Plant Cell* 12: 1523–1539.
- PELTIER, J.-B., RİPOLL, D.R., FRİSO, G., RUDELLA, A., CAI, Y., YTTTERBERG, J., GIACOMELLI, L., PİLLARDY, J., VAN WIJKY K.J., 2004, Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications, *J. Biol. Chem*, 279:4768-4781
- PERROT, M., SAGLIOTTO, F., MİNİ, T., MONRİBOT, C., SCHNEİDER, U., SHEVCHENKO, A., MANN, M., JENO, P., AND BOUCHERİE, H., 1999, Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* 20:2280–2298.

- PİRONDİNİ, A., VİSİOLÌ, G., MALCEVSCHÌ, A., MARMİROLÌ, N., 2006, A 2-D liquid-phase chromatography for proteomic analysis in plant tissue. *Journal of Chromatography B*, 833:91-100.
- POTTER, S., UKNES, S., LAWTON, K., WINTER, A. M., CHANDLER, D., DIMAIO, J., NOVITZKY, R., WARD, E., RYALS, J., 1993, Regulation of a hevein-like gene in Arabidopsis, *Mol. Plant-Microbe Interac.*, 6, 680–685.
- RAMPİTSCH, C., BYKOVA, N. V., MCCALLUM B., BEİMCİK, E. AND ENS W., 2006, Analysis of the wheat and Puccinia triticina (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics*, 6: 1897–1907.
- RAJAGOPAL, A., SIMON, SM., 2003, Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins, *Molecular Biology of the Cell*, 14:3389-3399
- REİSNER A.H., NEMES P., BUCHOLTZ C., 1975, “The use of Coomassie BBG250 Perchloric Acide Solution for Staining in Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gels”, *Anal. Biochem.*, 64, 509-516.
- RENAUT, J., BOHLER, S., HAUSMAN J F., HOFFMANN, L., SERGEANT, K., AHSAN N., JOLIVET Y., DİZENGREMEL P., 2009, The impact of atmospheric composition on plants: A case study of ozone and poplar. *Mass Spec Rev*, 28: 495–516.
- RENAUT, J., HAUSMAN, J. F., BASSETT, C., ARTLİP, T. Et Al., 2008, Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genet. Genomes*, 4, 589–600.
- REUMANN, S., BABUJEE, L., MA, C., WIENKOOP, S., SIEMSEN, T., ANTONİCELLÌ, GE., RASCHE, N., LUDER, F., WECKWERTHW, JAHN O., 2007, Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* 19:3170–3193.
- ROBERTSON, D., MITCHELL G. P., GİLROY J. S., GERRİSH C., BOLWELL G.P. AND SLABAS A.R., 1997, Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J. Biol. Chem.* 1272:15841–15848.
- ROBERTS, J. M., 2002, Proteomics and a future generation of plant molecular biologists. *Plant Molecular Biology* 48:143-154.
- ROELFS, A.P., HUERTA-ESPINO, J., MARSHALL, D., 1992, *Barley stripe rust in Texas*, *Plant Dis.*, 76, 538.
- ROSE, J., K, C., BASHİR, S., GİOV, ANNONÌ J.J., JAHN, M.M., AND SARAVANAN, R.S., 2004, Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant J.*, 39: 715–733.

- ROUHIER, N., JACQUOT, J.-P., 2005, The plant multigenic family of thiol peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.*, 38:1413-1421
- RUDELLA, A., FRISO, G., ALONSO, JM., ECKER, JR., VAN WIJK, KJ., 2006, Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1704–1721.
- RYALS, J. A., NEUENSCHWANDER, U. H., WILLITS, M. G., MOLINA, A., STEINER, H. Y., HUNT, M. D., 1996, Systemic acquired resistance, *Plant Cell*, 8, 1809–1819.
- SALAMINI, F., OZKAN, H., BRANDOLINI, A., SCHAFER-PREGLI, R. & MARTIN, W. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Rev. Genet.* 3,429–441 (2002)
- SALEKDEH G, H., SIOPONGCO, J., WADE L, J., GHAREYAZIE, B., BENNETT, J., 2002, Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2:1131-1145.
- SASAKI, T., 1997 Rice genome 6,1.
- SCHMIDT, UG., LEHMANN, K., STAHL, U., 2002, A novel mitochondrial DEAD box protein (Mrh4) required for maintenance of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*, 2:267-276
- SCHMIDT, UG., ENDLER, A., SCHELBERT, S., BRUNNER, A., SCHNELL, M., NEUHAUS, HE., MARTY-MAZARS, D., MARTY, F., BAGINSKY, S., MARTINOIA, E., 2007 Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol* 145:216–229.
- SCHWAB, W., 2003, Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites. *Phytochemistry*, 62:837-849.
- SCOTT, H K., and DAVID, L V., 2003, Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance, *Nature*, 22:7414–7430
- SELITRENNIKOFF, C. P., 2001, Antifungal proteins, *Applied And Environmental Microbiology*, 67, 2883–2894.
- SIDDIQUE, MA, GROSSMANN, J., GRUISSEM, W., BAGINSKY, S., 2006, Proteome analysis of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) chromoplasts. *Plant Cell Physiol* 47:1663–1673.

- SKYLAS D. J., MACKINTOSH J. A., CORDWELL S.J., BASSEAL D.J., WALSH B. J., HARRY J., BLUMENTHAL, C., COPELAND, L., WRIGLEY, C.W., AND RATHMELL, W., 2000, Proteome Approach to the Characterisation of Protein Composition in the Developing and Mature Wheat-grain Endosperm. *Journal of Cereal Science* 32: 169–188.
- SOLOMON, P.J., 2009, Some statistics in bioinformatics: the fifth Armitage Lecture. *Stat in Med*; 28:2833-56.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J. P., 1997, Systemic acquired resistance, *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235–270
- ŞAHİN, M., ÇEVİK, D., 2005, Mikroarray teknolojisi ve bitkilerde uygulama alanları. *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*; 9-13.
- TANAKA, K., BUDD, MA., EFRON, ML., ISSELBACHER, KJ., 1966, Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 56:236-42.
- THIELLEMENT, H., ZIVY, M., AND DAMERVAL, C., 2006, *Plant Proteomics: Methods and Protocols* V:355. (Ed. Thiellement). Humana Press, New Jersey, ISBN: 1-58829-635-0.
- THOMAS, T.L., McCLUNG, C.R., 1998, Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms, *Genetics*, 149:355-365
- TOGNETTIA, B., JAVIER, F., MARÍA, F., MICHAEL, M., HAJIREZAEIC, M.R., ESTELA M., CARRILLO N., 2006, Functional Replacement of Ferredoxin by a Cyanobacterial Flavodoxin in Tobacco Confers Broad-Range Stress Tolerance. *The Plant Cell* 18:2035-2050
- TÖR, M., 1998, Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki son gelişmeler. *Tr. Jr. of Biology*, 22:271-285.
- VALLAD, G. E., GOODMAN, R., 2004, Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.*, 44, 1920-1934.
- VIEIRA, S., PASCAL R., 2006, Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* Volume 11, Issue 7, Pages 329-334
- VISIOLÌ, G., MARMÍROLÌ, M., MARMÍROLÌ, N., 2009, Two-Dimensional Liquid Chromatography Technique Coupled with Mass Spectrometry Analysis to Compare the Proteomic Response to Cadmium Stress in Plants, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*
- WANG, Y., YANG, L., XU, H., LÌ, Q., MA, Z., AND CHU C., 2005 Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*. *Proteomics*, 5: 4496–4503.

- WASTERACK, C., PARTHIER, B., 1997, Jasmonate-signaled plant gene expression, *Trends Plant Sci.*, 2, 302–307.
- WATSON, B.S., ASIRVATHAM, V.S., WANG, L., AND SUMNER, L.W., 2003, Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol*, (131): 1104-1123.
- WEBER, K., PRINGLE, J.R., OSBORN, M., 1972, “Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-Acrylamide gel”, *Meth. Enzymologie*, 3-9
- W. GREGORY FEERO, M.D., PH.D., ALAN E. GUTTMACHER, M.D., AND FRANCIS S. COLLINS, M.D., PH.D., 2010, Genomic Medicine — An Updated Primer,; 362:2001.
- WOJTASZEK P., 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem. J.*, 322, 681–692.
- XU, C., HUANG, B., 2008, Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *J. Exp. Bot.*, 59, 4183–4194.
- XUE G., XUELI Z., JUNJIE Z., FUCHU, H., 2010, Proteomics in China: Ready for prime time. *Science China*, 53 1:22-23.
- YARON, S., MICHAL, C., SMADAR, L., BILLY, D., JAMES, G. P., JOEL V., DOV, Z., 2001, Nuclear Relocalization of the Pre-mRNA Splicing Factor PSF during Apoptosis Involves Hyperphosphorylation, Masking of Antigenic Epitopes, and Changes in Protein Interactions, *Molecular Biology Of The Cell*, 12: 2328-2340
- ZHONG, H.H., McCLUNG, C.R., 1996, The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases, *Mol. Gen. Genet.*, 251:196-203
- ZORB, C., BETSCHE T., LANGENKAMPER G., 2009, Search for Diagnostic Proteins To Prove Authenticity of Organic Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.), *J. Agric. Food Chem.* 57, 2932–2937.

www.maths.leeds.ac.uk, [Ziyaret Tarihi: 8 Haziran 2010]

www.microarray.swmed.edu, [Ziyaret Tarihi: 1 Mayıs 2009]

www.weatgenome.com, [Ziyaret Tarihi: 10 Ağustos 2009]

<http://tr.wikipedia.org>, [Ziyaret Tarihi: 6 Ocak 2011].

<http://www.genetiklab.com>, [Ziyaret Tarihi: 3 Şubat 2011]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, [Ziyaret Tarihi: 27 Mayıs 2010]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, [Ziyaret Tarihi: 2 Aralık 2010]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, [Ziyaret Tarihi: 10 Şubat 2011]

<http://www.unimod.org>, [Ziyaret Tarihi: 9 Eylül 2010]

<http://prospector.ucsf.edu>, [Ziyaret Tarihi: 20 Aralık 2010]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, [Ziyaret Tarihi: 25 Haziran 2010]

<http://en.wikipedia.org>, [Ziyaret Tarihi: 5 Nisan 2011]

<http://www.ataem.gov.tr>, [Ziyaret Tarihi: 7 Mayıs 2011]

ÖZGEÇMİŞ

1 Ocak 1986 İstanbul'da doğdum. 2001–2004 yılları arasında Erenköy Kız Lisesinde öğrenim gördükten sonra, 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım ve 2008 yılında mezun oldum. 2009–2011 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Yüksek Lisans Programını tamamlayarak mezuniyet belgesi aldım.