

Üzüm Tanelerinde VvPDR Genlerinin İfade Analizi

Selin ALTINTAŞ¹ , Birsen ÇAKIR AYDEMİR^{2*} 

¹ Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, TÜRKİYE

² Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, İzmir, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author

E-mail: birsen.cakir@ege.edu.tr

Araştırma Makalesi/Research Article

Geliş Tarihi/Received: 01.03.2022

Kabul Tarihi/Accepted: 27.06.2022

ÖZ

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı membran proteinleri, tüm organizmalarda büyük oranda korunmuş en büyük membran protein ailelerindedir. Ökaryotik ABC taşıyıcılarının yapısı, bir transmembran alanı (TMD) ve bir nükleotit bağlama alanı (NBD) olarak adlandırılan iki bölgeden oluşmaktadır. Bu proteinler, ökaryot canlılarda ABCA'dan ABCG'ye kadar devam eden toplam yedi ana aileye ayrılmaktadırlar ve bu ana aileler de kendi içlerinde alt ailelere ayrılmaktadır. Plazma zarında ve tonoplast, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi organların zarlarında lokalizedirler ve çok sayıda işlevi yerine getirmektedirler. Başlangıçta detoksifikasyon işlemlerine katılan taşıyıcılar olarak tanımlanmış olmalarına rağmen daha sonraki yapılan çalışmalarda bu proteinlerin bitki büyümesi ve gelişim dönemlerinde ve çevresel streslere karşı tepkilerde de etkili oldukları gösterilmiştir. ABCG'nin tam molekül üyelerinden PDR alt grubu sadece mantar ve bitkilerde tanımlanmıştır. Plant pleiotropic drug resistance (PDR) alt ailesine ait proteinlerin çeşitli lipidlerin ve hormonların taşınmasında görev aldıkları ve aynı zamanda bu proteinlerin abiyotik ve biyotik streslere karşı tepkiler sırasında da görevlerinin olduğu yapılan farklı çalışmalarla bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise *Vitis vinifera* sp. genomunda tanımlanan ve PDR alt ailesine ait *VvABCG35*, *VvABCG36*, *VvABCG37* genlerinin asmada meyve gelişim dönemleri boyunca gösterdiği ifadeler incelenmiş ve bu genlerin fonksiyonları hakkında fikir sahibi olmak için STRING veritabanı kullanılarak etkileşime girdiği diğer proteinler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., ABC Proteinleri, ABCG, PDR, Real Time PCR

Expression Analysis of VvPDR Genes in Grape Berries

ABSTRACT

The ATP-binding cassette (ABC) carrier membrane proteins are among the largest families of membrane proteins that are highly conserved in all organisms. The structure of eukaryotic ABC transporters consists of two domains called a transmembrane domain (TMD) and a nucleotide binding domain (NBD). In eukaryotes, it is classified into seven main families, ordered from ABCA to ABCG, and the main families are divided into subfamilies within themselves. They are localized in the membranes of a plant cell, such as the plasma membrane, tonoplast, chloroplast, mitochondria, and peroxisomes, and perform numerous functions. Initially identified as carriers involved in detoxification processes, they were later shown to be essential for organ growth, plant nutrition, plant growth, response to abiotic stress, pathogen resistance, and plant interaction with its environment. The plant pleiotropic drug resistance (PDR) subgroup consists of full structure members of ABCG subfamily that have only been identified in fungi and plants. It has been reported in various studies that the PDR subfamily is involved in the transport of various lipids and hormones, as well as playing a role in abiotic and biotic stresses. In this study, expressions of *VvABCG35*, *VvABCG36*, *VvABCG37* genes belonging to the PDR subfamily, which are defined in *Vitis vinifera* sp. genome, during berry development periods were determined and other proteins with which they interact were examined by using the STRING database to have an idea about the functions of these genes.

Keywords: *Vitis vinifera* L., ABC Proteins, ABCG, PDR, Real-time PCR

Cite as;

Altıntaş, S., Aydemir, B.Ç. (2022). Üzüm Tanelerinde VvPDR Genlerinin İfade Analizi, *Recep Tayyip Erdogan University Journal of Science and Engineering*, 3(1), 11-20. Doi: 10.53501/rteufemud.1081147

Orcid ID: S.Altıntaş, 0000-0003-4268-8547; B.Ç.Aydemir, 0000-0003-4268-8547

1. Giriş

Vitis vinifera L. (asma) sistematik olarak “Dicotyledoneae” sınıfı içerisinde, “Rhamnales” takımında, “Vitaceae” ailesinde ve “*Vitis*” cinsi içerisinde yer alan çok yıllık sarılıcı bir bitkidir (Keller, 2010). Dünyada yetiştiriciliği en yaygın düzeyde yapılan ve en yüksek ekonomik değere sahip meyve çeşididir. Üzümde başlıca; taze meyve (sofralık üzüm), kuru meyve ve şarap üretimi amacıyla yararlanılmaktadır. Tüm bu ürünlerin arasında *Vitis vinifera* çeşitlerinden üretilen şarap, en fazla ekonomik öneme sahip olanıdır (Mullins vd., 1992). Asmada meyve; çiçeklenme, tozlaşma ve dölllenme, meyve seti ve meyvenin gelişimi süreçlerinin tamamlanmasıyla oluşmaktadır (Dokoozlian, 2000; Kennedy, 2002).

Meyve gelişimi, Bir durgun fazla ayrılan iki ardışık büyüme dönemini içeren 3 farklı aşamada gerçekleşir. Büyüme aşamaları bir çift sigmoid eğri ile karakterize edilir (Dokoozlian, 2000; Kennedy, 2002). Asmada meyve kalitesi, meyvenin şeker oranı, asitlik derecesi, fenolik içerik ve uçucu kimyasalların varlığıyla belirlenir. Bağda bu gelişim ve değişimler binlerce genin karşılıklı etkileşimi ve iş birliğiyle kontrol edilmektedir (Dokoozlian, 2000; Kennedy, 2002).

Üzüm meyvesinin gelişimi ve olgunlaşması birkaç bitki hormonu ve bu hormonların karşılıklı olarak etkileşimleri ile düzenlenmektedir. Oksin, sitokininler ve gibberellinlerin konsantrasyonu meyve tutumundan sonra artmaya meyillidir ve ben düşme ile birlikte azalmaya başlar (Conde vd., 2007; Böttcher vd., 2011). Ben düşmeden hemen önce, etilende küçük bir geçici pik gözlemlenir ve ben düşmede bütün etilen üretim yolu aktive olmaktadır. Etilen ayrıca alkol dehidrojenazlar tarafından modüle edilen aroma üretiminin bazı aşamalarında yer alabilir ve antosiyanin sentezi ile ilgili genlerin uzun süreli ekspresyonunu teşvik eder. Etilen sinyalleri ayrıca vasküler sistemin kaybolması ve asit içeriğinin düzenlenmesinde rol oynar (Chervin vd., 2004; Sun vd., 2010). Ben düşme dönemiyle birlikte olgunlaşma döneminde absisik asit (ABA) seviyesinde keskin artışlar gözlenir (Scienza vd.,

1978; Castellari vd., 2015). Bu gözlemler ABA ve etilenin olgunlaşma destekleyicileri olarak güçlü adaylar olduğunu göstermektedir. Brassinosteroidler, ABA ve oksin ile etkileşime girerek meyve olgunlaşması sırasında pozitif yönde etkili bir hormon düzenleyicisi olarak görev yapmaktadırlar (Symons vd., 2006; Zhang vd., 2009). Membran taşıyıcı proteinler ise meyve gelişimi süreci içerisinde etkili olan hormonların taşınmasında görev almaktadırlar. Transmembran proteinler, hücre içi ve dışı arasında madde alışverişi, sinyalleme gibi görevlerde yer almaktadırlar (Gennis, 1989; Sadava vd., 2011; Lodish vd., 2013).

ABC Proteinleri/ABC Taşıyıcıları (ATP Binding Cassette Transporters/ABC Proteins/ ABC Transporters) bitkilerde en büyük membran protein sınıflarından birini oluşturmaktadırlar (Higgins, 1995; Higgins ve Linton, 2004). ABC taşıyıcıları bitki gelişimi için elzem moleküllerdir, gametogenez, tohum gelişimi, tohum çimlenmesi, organ oluşumu ve ikincil büyüme gibi süreçlerde rol oynamaktadırlar. ABC taşıyıcılarına ATP tarafından doğrudan enerji verilir ve karmaşık organik malzemeleri konsantrasyon gradyanlarına karşı taşıyabilirler; böylece, özel bitki hücrelerinin gelişimi için gerekli olan karmaşık yapı taşlarının tedarik edilmesine özel olarak uygundur. Ayrıca ABC taşıyıcıları, koruyucu tabaka oluşumu ve fitohormonların taşınmasındaki rolleri dahil üzere bitkilerin büyümesi ve gelişmesinde büyük öneme sahiptirler (Do vd., 2018).

ABC taşıyıcıları en az iki korunmuş bölgeden oluşmaktadır: bir nükleotid bağlanma alanı (NBD) veya ATP binding cassette (ABC) olarak adlandırılan yüksek miktarda korunmuş bölgesi ile daha az korunmuş bir transmembran bölgesi (TMD). Bu bölgeler aynı protein üzerinde veya ayrı ayrı proteinler üzerinde bulunabilirler. Çoğu ABC taşıyıcı, bir dimer gibi fonksiyon göstermektedir ve bu nedenle, iki ABC modülü ve iki TMD'den oluşan dördü bölge oluşturabilirler (Holland vd., 2003).

Alan organizasyonlarına ve birincil sekans homolojisine göre, ökaryotik ABC taşıyıcıları

ABCA'dan ABCG'ye kadar uzanan yedi farklı aileye ayrılmıştır. Yedi ABC taşıyıcı ailesinin üyeleri, ökaryotların genomunda yaygın olarak dağılım göstermektedir (Klein vd., 1999; Klokouzas vd., 2003).

ABC taşıyıcılarının yapıları, farklı alandaki bileşimlerinden dolayı çeşitlidir. NBD-TMD-NBD-TMD veya TMD-NBD-TMD-NBD organizasyonuna sahip bir taşıyıcı protein, tam bir taşıyıcı (veya tam bir yapı) olarak isimlendirilir; Yarım taşıyıcı (veya yarım yapı), NBD-TMD veya TMD-NBD organizasyonuna sahip tek bir TMD ve bir NBD'den oluşur. Sadece tek bir TMD veya NBD ile kodlanan bazı taşıyıcılar, tek alanlı yapı olarak tanımlanır. Taşıyıcı olmayan ABC proteinlerinde, hem N- hem de C-ucunda sadece NBD'ler bulunmaktadır. NBD-NBD organizasyonu olan bu tür vakalar ABC2 yapısı olarak adlandırılmaktadır (Xiong vd., 2015).

ABCG alt ailesi ters yönlü yapı gösteren tek alt aile grubudur. Bu alt aile içerisinde WBC alt grubu yarım molekül grubunu ve PDR alt grubu ise tam molekül grubunu oluşturmaktadır. *Arabidopsis* genomunda; 29 tane WBC, 15 tane PDR, *Oryza* genomunda; 30 tane WBC, 23 tane PDR proteinleri tanımlanmıştır. PDR alt grubu sadece mantar ve bitkilerde, WBC alt grubu ise bütün canlı gruplarında tanımlanmıştır.

ABC taşıyıcı süper ailesinde genlerin büyüklükleri, türler arasında büyük ölçüde değişiklik göstermektedir ve *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* gibi bazı bitkilerde yüz kopyadan daha fazlasına sahip olabilmektedirler (Sánchez-Fernández vd., 2001; Garcia vd., 2004).

ABCG alt ailesinin tanımlanan bazı üyelerinin kutikular lipidlerin taşınmasında rol aldığı gösterilmiştir. Özellikle bitkilerde çiçek gelişimi döneminde sentezlendiği, polen oluşumu sırasında gerekli lipidlerin taşınmasında, petal ve karpellerde çiçeğe özgü kütinlerin taşınmasında görev aldığı ve mutantlarında tohum oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (Pighin vd., 2004; Teagen vd., 2010). ABCG alt ailesi üyelerinin çeşitli hormonların taşınımında da görevli olduğu

bilinmektedir. Bitki gelişimi sırasında önemli rolleri bulunan absisik asit (ABA) hormonunun taşınmasında da görev aldığı, bunun yanı sıra sitokininler, jasmonik asit (JA) ve polar oksin taşınımı gibi görevlerinin de bulunduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Ružicka vd., 2010; Geisler vd., 2017).

Yapılan çeşitli çalışmalarda ABCG alt ailesine ait birçok proteinin ağır metal gibi abiyotik stresler sırasında ve aynı zamanda biyotik stresler sırasında da bitki direnç mekanizmasının geliştirilmesi sırasında etkili oldukları yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Örneğin; AtABCG26 proteininin vakuolar arsenik birikiminde fonksiyonel olduğu çeşitli biyoremediasyon çalışmalarında potansiyel olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (Potdukhe vd., 2018). AtABCG30(PDR2) proteininin ise ağır metaller gibi abiyotik streslere cevap sırasında ve aynı zamanda patojenlere karşı savunma sırasında hormonal düzenlemede etkili oldukları tespit edilmiştir (Crouzet vd., 2006). AtABCG30(PDR2) proteininin bir ağır metal akış pompası olabileceği ve aynı zamanda absisik asit taşınımında rol alabileceği düşünülmektedir (Lefèvre ve Bouty, 2018). Diğer bir ABCG alt ailesine ait bir protein olan AtABCG36 (PDR8) proteininin ise savunma yanıtında hücre ölümünün derecesini kontrol eden kilit bir faktör olduğu, hem kallus birikimi hem de glukosinolat aktivasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kadmiyum (Cd^{2+}) ve kurşuna (Pb^{2+}) karşı direnç sağladığı, muhtemelen patojen direncine aracılık eden kimyasalların akış pompası olabileceği düşünülmektedir (Kim vd., 2007). Tüm bunlarla birlikte oksin türevlerinin taşınmasında görev alabileceği de bildirilmiştir (Lefèvre ve Boutry, 2018). AtABCG34 proteininin ise yaprak yüzeyinde bitkiyi netrofik patojenlere karşı koruyan fitoaleksinin ve kemoaleksinlerin (Khare vd., 2017) ve çeşitli alkaloid türevlerinin (Lefèvre ve Boutry, 2018) salgılanmasında görev aldığı belirlenmiştir. Asmada ise VvABCG44 geni aday resveratrol taşıyıcısı olarak izole edilmiş ve tane kabuğunda ifadesi gösterilmiştir (Suzuki vd., 2014).

Bu çalışmada, farklı gelişim dönemlerinde toplanan üzüm tanelerinde PDR alt ailesine ait *VvABCG35*, *VvABCG36* ve *VvABCG37* genlerinin ifade profilleri Real-time PCR analizi ile belirlenmiş ve diğer bitkilerdeki ortologları ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ayrıca, bu genlerin fonksiyonları hakkında fikir sahibi olmak için STRING veritabanı kullanarak etkileşime girdiği diğer proteinler belirlenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Analizde kullanılan üzüm taneleri *Vitis vinifera* L. cv. Alphonse Laval asma çeşidinden alınmıştır. “Alphonse” çeşidi koyu siyah-mor renkte, iri taneli, gösterişli orta mevsim sofralık bir üzüm çeşididir. Tanenin rengi siyah-mor tonlarındadır ve kabuğu biraz kalındır. Taneler 3-4 adet çekirdek içermektedir ve bu tanelerin şekli yuvarlaktır. Tanelerin ağırlıkları ise 7-9 gram arasındadır. Yetiştiriciliği yaygın olarak ilk başlarda Marmara Bölgesinde olmakla birlikte daha sonra, Ege ve İç Anadolu Bölgesi başta olmak üzere diğer bölgelere de yayılmıştır. Yola dayanıklıdır ve pazar değeri yüksek olan bir çeşittir. Bu çalışma kapsamında taneler 2 haftalık aralıklarla çiçeklenme döneminden (21.04.2016) olgunlaşma dönemine (12.08.2016) kadar olan süre içerisinde Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bağından toplanmıştır. Taneler toplandıktan sonra kuru buz içerisinde taşınmış ve -80 °C’de depolanmıştır.

2.2. Biyoinformatik Analizler

Arabidopsis thaliana’ya ait ABCG alt ailesinde bulunan PDR sekansları kullanılarak *Vitis* genome Browser x 12 üzerinden BLAST yapılarak 33 *VvABCG/PDR* geni tespit edilmiş ve bu genlere ait sekanslar, lokasyon bilgileri, gen ve protein yapılarına ait veriler çıkartılmıştır (Çakır ve Kılıçkaya, 2013). Elde edilen sekanslar ve ortologları ile MEGA10 programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. *VvABCG* ortologlarına ait aksesyon numaraları şöyledir: AtABCG29 (NP_190919.1), AtABCG31

(NP_193258.2), AtABCG32 (NP_180555.2), AtABCG34 (NP_181265.1), AtABCG35 (NP_181179.2), AtABCG36 (NP_172973.1), AtABCG37 (NP_176196.1), AtABCG38 (NP_190916.1), AtABCG39 (NP_683617.1), AtABCG40 (NP_176867.2), AtABCG41 (NP_173005.1), AtABCG42 (NP_680692.1), AtABCG43 (NP_680693.5), OsPDR4 (Os02g0318500), OsPDR6 (Os01g0177900), ZmABCG40 (GRMZM2G109527), ZmABCG34 (GRMZM5G874955), AtPDR5 (AT2G37280).

Vitis genome Browser x 12 üzerinden tespit edilen 3 *VvABCG/PDR* geninin, EnsemblePlant veri tabanında BLAST analizi gerçekleştirilmiş ve hepsinin EnsemblePlantID’si belirlenmiştir (Kılıçkaya, 2014). STRING veri tabanı üzerinden analizler EnsemblePlantID’si ile yapılmış ve 3 adet *VvABCG/PDR* proteininin etkileşime girdiği proteinler tespit edilmiştir. Elde edilen verilerde etkileşime girilen proteinlerin çoğu karakterize edilmiş olmadığından dolayı, EnsemblePlant üzerinden bu proteinlerin sekanslarına ulaşılmış ve *Arabidopsis thaliana* genomu üzerinde BLAST yapılarak *Arabidopsis* bitkisinde bulunan homologları ve UniProt veri bankası üzerinden bu homolog proteinlerin görevleri tespit edilmiştir.

2.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonu Davies ve Robinson (1996) tarafından tanımlanan metot kullanılarak, 2 M LiCl ile 16 saat çöktürme adımı eklenerek gerçekleştirilmiştir. İzole edilen toplam RNA “RNase free DNaseI (Fermentas, USA)” ile muamele edilerek olası DNA kirliliği uzaklaştırılmak amacıyla ve devamında “RNeasy Purification Kit (Qiagen, Germany)” kullanılarak elde edilen toplam RNA’lar saflaştırılmıştır. 2 µg saf RNA’dan “The RevertAid TM H Minus First Strand cDNASynthesis Kit (Fermentas, USA)” kullanılarak cDNA sentezi üretici protokolü takip edilerek yapılmıştır.

2.4. Real Time PCR Analizi

VvABCG ailesine ait 3 adet genin tane gelişim boyunca mRNA değişiminin incelenmesi amacıyla primer çiftleri tasarlanmıştır (Tablo 1).

Primer tasarımı PRIMER3 veri tabanı üzerinden mRNA sekansları kullanılarak yapılmış ve primerlerin iki ekzon arasına yerleşecek şekilde, 18-24 nükleotid uzunluğunda, GC içeriğinin % 40-60 oranında ve erime sıcaklığının (Tm) \approx 60 °C olmasına dikkat edilmiştir. Primerler “Oligo Calc” veritabanı üzerinden kontrol edilerek seçilmiştir. Bunların dışında genlerin ifadesinin karşılaştırılması için içsel kontrol olarak aktin (XM_002282480.4) geni kullanılmıştır.

Real time reaksiyonu toplam hacim 25 μ L olacak şekilde, içerisine 1 μ L cDNA, 12,5 μ L SYBR® Green Master Mix, 2 μ L Forward ve 2 μ L Reverse primer (10 μ M) ve 7,5 μ L dH₂O eklenerek gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR reaksiyonları

Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda Rotor Gene Q Real Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR programı; 95 °C'de 10 saniyelik işlem sonrasında, 95 °C'de 3 saniye, 60 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 10 saniyeden oluşan 45 sikluluk program olarak belirlenmiştir. Real Time PCR cihazına ait analiz programı ile her bir primer için ayrı ayrı standart eğrileri çizilmiştir Real time PCR işlemi sonrasında, her örneğin uygulandığı primere ait pik profilleri belirlenmiş ve bu pik profillerine göre Ct (Cycle Threshold) değerleri hesaplanmıştır. Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre relatif ifade (relative expresyon) değerleri hesaplanmıştır. Genlerin ifadesi aktine göre normalize edilmiştir.

Tablo 1. VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG37 genlerine ait primerler.

Table 1. Primers sequences of VvABCG35, VvABCG36 and VvABCG37 genes

Primer Adı	Primer Dizisi	Tm (°C)	Baz Sayısı
VvABCG35F	TCAAGCTATTAGGGCTGGATGT ileri	54 °C	22 nt
VvABCG35R	GTCGATATCTCGTCCATCAACA geri	59 °C	22 nt
VvABCG36F	ACATGCCCAAGGAAATGAAGAG ileri	56 °C	23 nt
VvABCG36R	TTGGGGAACCCAGATATTCTAA geri	60 °C	22 nt
VvABCG37F	TGTTTCCTTATGGCGAAATCC ileri	57 °C	20 nt
VvABCG37R	GAATTATCCGAAGCCCGTTT geri	55 °C	20 nt

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Gen Yapılarının İncelenmesi

VvABCG alt ailesine ait genlerin sahip olduğu ekzon-intron sayısı, lokasyonları ve transcript uzunluğu gibi özellikleri belirlenmiş ve Tablo 2'de gösterilmektedir. VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG33 genleri, 9. kromozom üzerinde farklı zincirlerde lokalize olmaktadır. VvABCG35, 9. kromozom üzerinde ileri zincirde yer alırken VvABCG36 ve VvABCG37 genleri ise geri zincir

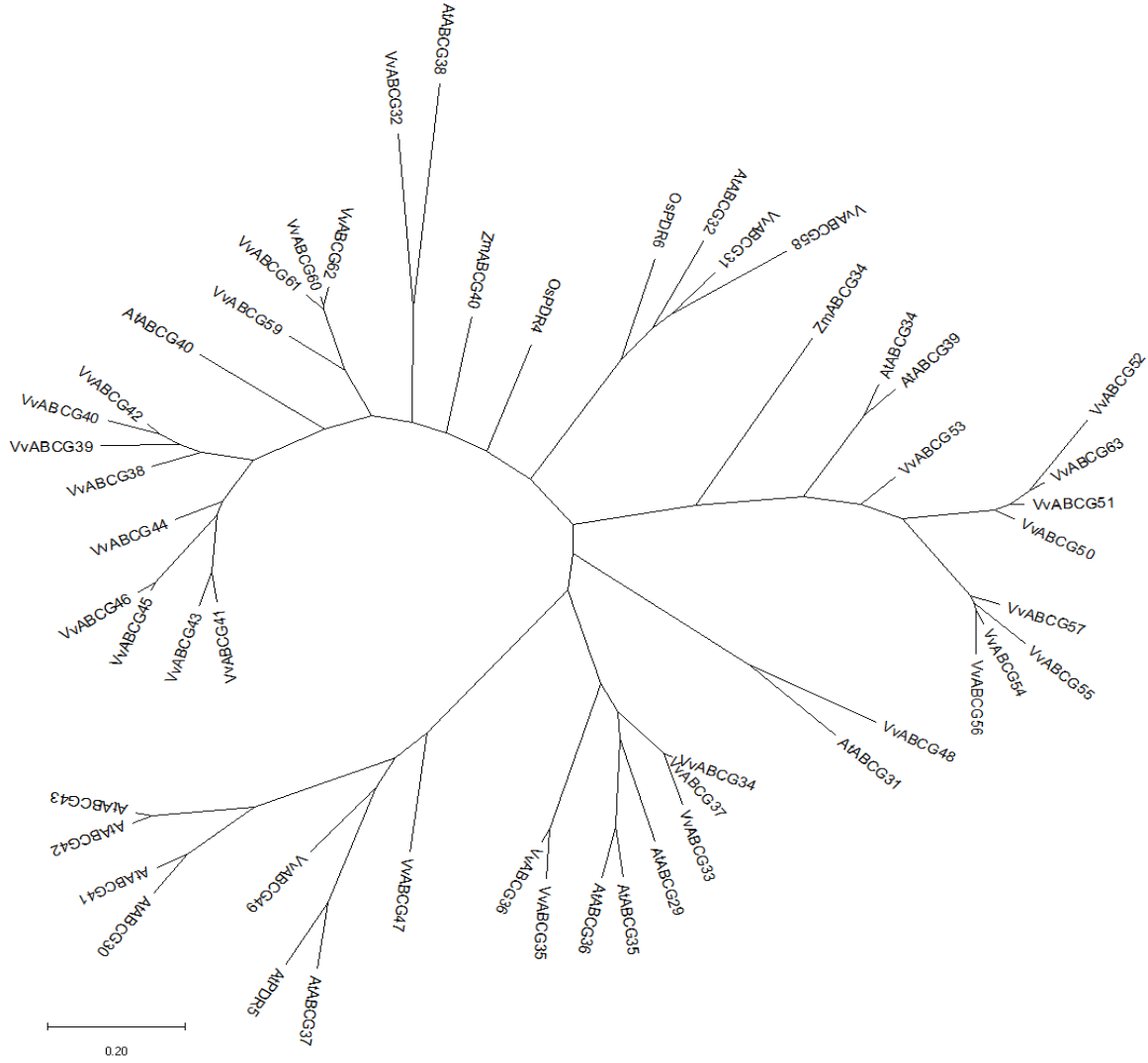
üzerinde yan yana olacak şekilde lokalize olmaktadır. VvABCG37 geni en uzun transkripte sahipken, en kısa transkript uzunluğu VvABCG35 genine aittir.

VvABCG alt ailesine ait 33 birey ve *Arabidopsis* ABCG protein dizilerinin arasındaki akrabalık ilişkisi oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde Şekil 1'de gösterilmektedir (Şekil 1). VvABCG37, *AtABCG36* ve *AtABCG35* çok yakın ortak atadan kökenlenmiştir. *AtABCG29*, *VvABCG45*'in yakın ortak bir ataya sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 2. VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG37 genlerinin özellikleri.

Table 2. Genome, gene, protein characteristics of VvABCG35, VvABCG36 and VvABCG37 genes

Alt aile adı	GenBank ID	Vitis genome X12 browser ID	Lokasyon	Strand	Gen uzunluğu	Transkript uzunluğu	Exon	Intron
VvABCG35	PRGDB00183422	GSVIVT01016993001	chr9:3246544..3252734	+	6191bp	2073bp	13	12
VvABCG36	PRGDB00183424	GSVIVT01016998001	chr9:3318607..3327354	-	8748bp	4368bp	25	24
VvABCG37	PRGDB00183425	GSVIVT01016999001	chr9:3328286..3336959	-	8674bp	4482bp	21	20



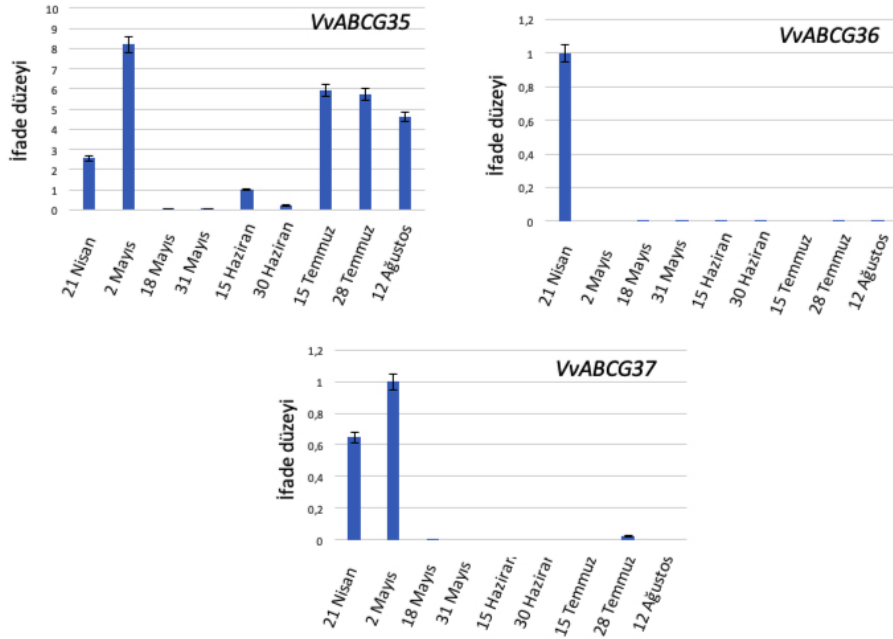
Şekil 1. Farklı ABCG proteinlerine ait filogenetik ağaç
Figure 1. Phylogenetic Tree of different ABCG proteins

3.2. VvABCG Alt Ailesine Ait Genlerin İfade Profilleri

Tane gelişiminin 21 nisan, 02 mayıs, 18 mayıs, 31 mayıs, 15 haziran, 30 haziran, 15 temmuz, 28 temmuz, 12 ağustos tarihlerinde toplanan tanelerden izole edilen mRNA'lar kullanılarak VvABCG ailesine ait VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG37 genlerinin tane gelişim boyunca mRNA değişiminin real time PCR yöntemiyle analiz edilmiş ve ifade profilleri belirlenmiştir (Şekil 2).

VvABCG35 geninin ifadesi 21 nisan ve 2 mayıs tarihlerinde artış göstermiş ve bu tarihten sonra 15

temmuz tarihine kadar olan süreçte bu genin ifadesi baskılanmıştır. Bu tarihten sonra ise genin ifade düzeyinde tekrar artış belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle olgunlaşmanın ilerleyen dönemlerinde bu genin ifadesinin kısmen yüksek bir düzeyde devam ettiği tespit edilmiştir. VvABCG36 geninin ifadesi ise sadece 21 nisan döneminde alınan tanelerde yapılan analizlerde tespit edilmiş ve bu dönemden sonra bu genin ifadesi baskılanmıştır. Bu çalışma kapsamında ifadesi belirlenmeye çalışılan en son gen olan VvABCG37 geninin ifadesi ise 21 nisan döneminden itibaren artış göstermiş, 02 mayıs tarihinde maximum düzeye ulaşmış ve bu dönemden sonra, diğer bir ifadeyle tane tutumundan itibaren ifadesi baskılanmıştır.



Şekil 2. VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG37 genlerine ait ifade profili

Figure 2. Expression profile of VvABCG35, VvABCG36 and VvABCG37 genes

3.3. VvABCG Genlerinin String Analiz Sonuçları

STRING bilgi sahibi olmak istenilen proteinlerin bilinen ve öngörülen protein-protein etkileşimlerini ortaya koyan bir veri bankasıdır. STRING, çok sayıda organizma için kapsamlı, ancak kalite kontrollü bir protein-protein birlikteliği sağlayarak bu bilgiye erişimi kolaylaştırmayı amaçlamaktadır. Sonuçlar, yüksek verimli deneysel verilerden, veritabanları ve literatürlerde yer alan bilgilerden ve genomik analizlere dayanan tahminlerden kaynaklanmaktadır (Christian vd., 2005).

VvABCG proteinlerinin alt ailesine ait proteinlerin etkileşimde bulunduğu proteinler STRING analiziyle tespit edilmiş, bu proteinlerin hangi yollarda ne gibi görevlerde bulunabileceğiyle ilgili ön bilgi sahibi olmaya çalışılmıştır. VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG37 proteinleri yalnızca SKIP (SNW/SKI-interacting protein) post transkripsiyonel modifikasyon faktörü ve PDR alt

grubuna ait diğer proteinler ile etkileşime girmektedirler (Tablo 3).

VvABCG35 proteini, SKIP faktörü ile ilişki göstermektedir. ABCG proteinlerinin hormon taşınımında rol oynadıkları, özellikle ABA metabolizmasında ve taşınmasında rollerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ružicka vd., 2010; Geisler vd., 2017). VvABCG35 proteininin ifade profiline baktığımızda ifadesi meyve gelişimi boyunca ABA hormonu ile paralellik göstermektedir. Bu veriler çerçevesinde VvABCG35 proteininin ABA hormonunun taşınmasında veya ABA hormonuna karşı oluşturulan tepki süreçleri içerisinde görev aldığı düşünülmektedir. ABCG alt ailesinin kutikular lipidlerin ve polen oluşumu sırasında gerekli lipidlerin taşınmasında, petal ve karpellerde çiçeğe özgü kütinlerin taşınmasında görev aldığı gösterilmiştir (Pighin vd., 2004; Teagen vd., 2010). VvABCG36 proteininin SKIP ile ilişkili olması ve ifade profilinde sadece çiçeklenme döneminde ifade göstermesi, petal ve karpellerde çiçeğe özgü kütinlerin taşınmasında

veya polen duvarlarını oluşturan lipidlerin taşınmasında görev alabileceği düşünülmektedir.

VvABCG37 proteininin ise kutikular lipidlerin taşınmasında görev aldığı düşünülmektedir.

Tablo 3. VvABCG35, VvABCG36 ve VvABCG37 proteinlerinin etkileşime girdiği proteinler
Table 3. Proteins interacting with VvABCG35, VvABCG36 and VvABCG37.

Alt aile Adı	Ensemble <i>Vitis Vinifera</i> Protein ID	<i>Vitis Vinifera</i>	<i>Arabidopsis</i> Homolog	Ensemble <i>Arabidopsis</i> ID
VvABCG35	VIT_11s0016g03290.t01	Uncharacterized protein	SNW/SKI-interacting protein, SKIP	AT1G77180
	VIT_09s0002g03580.t01	Uncharacterized protein	pleiotropic drug resistance 5, PDR5	AT2G37280
VvABCG36	VIT_11s0016g03290.t01	Uncharacterized protein	SNW/SKI-interacting protein, SKIP	AT1G77180
	VIT_09s0002g03630.t01	Uncharacterized protein; Belongs to the ABC transporter superfamily. ABCG family. PDR subfamily	ABC transporter G family member 29, ABCG29	AT3G16340
VvABCG37	VIT_11s0016g03290.t01	Uncharacterized protein	SNW/SKI-interacting protein, SKIP	AT1G77180
	VIT_09s0002g03640.t01	Uncharacterized protein; Belongs to the ABC transporter superfamily. ABCG family. PDR subfamily	ABC transporter G family member 29, ABCG29	AT3G16340

4. Sonuçlar

Bu çalışmanın analiz sonuçlarına göre *Vitis vinifera* L. ABCG alt ailesine ait VvABCG35, VvABCG36, VvABCG37 genlerinin ifadeleri; meyve tanesinin 9 farklı tarihteki gelişim döneminde incelenmiştir. Ayrıca STRING analizleriyle etkileşime girdiği proteinler tespit edilerek görevleriyle ilgili çıkarımlar yapılmıştır.

VvABCG35 proteininin ABA taşınmasında veya ABA'ya yanıt oluşturan süreçlerde görev aldığı düşünülmektedir. VvABCG36 proteininin petal ve karpellerde çiçeğe özgü kütinlerin taşınmasında veya polen kesesini oluşturan lipidlerin taşınmasında, VvABCG37 proteininin de kutikular lipidlerin taşınmasında görev aldığı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma yüksek lisans projesi olarak Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (FYL-2018-20042).

Kaynaklar

Böttcher, C., Boss, P.K., Davies, C. (2011). Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.)

berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4267-4280. Doi:10.1093/jxb/err134.

Castellarin, S.D., Gambetta, G.A., Wada, H., Krasnow, M.N., Cramer, G.R., Peterlunger, E., Shackel, K.A., Matthews, M.A. (2015). Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *Journal of Experimental Botany*, 67, 709-722. Doi: 10.1093/jxb/erv483.

Christian von, M., Jensen, L.J., Snel, B., Hooper, S.D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, A.M., Bork, P. (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Research*, 33, D433-D437. Doi:10.1093/nar/gki005.

Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J-P., Latché, A., Lamon, J., Bouzayen, M. (2004). Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*, 167 (6), 1301-1305. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.026.

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., C.P., Dias A., Tavares, Rui M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food Biophysics*, 1(1), 1-22.

Crouzet, J., Trombik, T., Fraysse, A. S., and Boutry, M. (2006). Organization and function of the plant

- pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Letters*, 580, 1123-30.
- Çakır, B., Kılıçkaya, O. (2013). Whole-genome survey of the putative ATP-binding cassette transporter family genes in *Vitis vinifera*. *PLoS One*, 8(11): e78860. Doi: 10.1371/journal.pone.0078860.
- Davies, C., Robinson, S.P. (1996). Sugar accumulation in grape berries (Cloning of Two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant Physiology*, 111, 275.
- Dokoozlian, N.K. (2000). Grape berry growth and development, Vol. 3393, Agricultural and Natural Resources Publication, University of California, Oakland, CA, Raisin Production Manual, Christiansen, L. P. (Ed.), 0-37.
- Do, T.H.T., Martinoia, E., Lee, Y. (2018). Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 41, 32-38. Doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.003.
- Garcia, O., Bouige, P., Kolukisaoglu, U., Forestier, C., Müller, A., Ansoorge, M., Becker, D., Mamnun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., Mueller-Roeber, B., Martinoia, E. (2004). Inventory and comparative analysis of rice and Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) systems. *Journal of Molecular Biology*, 343(1), 249-265.
- Geisler, M., Aryal, B., Donato, M., Hao, A.P. (2017). Critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant Cell Physiology*, 58(10), 1601-1614. Doi:10.1093/pcp/pcx104.
- Gennis, R.B. (1989). Biomembranes: molecular structure and function, Springer-Verlag, 1st Edition, ISBN: 978-1-4757-2065-5, New York, 533.
- Higgins, C.F. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell*, 82, 693-696.
- Higgins, C.F., Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Natural Structural Molecular Biology*, 11, 918-926.
- Holland, I.B., Cole, S.P.C., Kuchler, K., Higgins, C.F. (2003). ABC proteins from bacteria to man, Academic Press, 1st Edition, ISBN: 9780080481876, San Diego, 530.
- Keller, M. (2010). Botany and anatomy, 1-47, The Science of grapevines, Keller, M. (Ed.), Academic Press, San Diego.
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery and Vineyard Journal*, 1-5.
- Khare, D., Choi, H., Huh, S.U., Bassin, B., Kim, J., Martinoia, E., Sohn, K.H., Paek, K.H., Lee, Y. (2017). Arabidopsis ABCG34 contributes to defense against necrotrophic pathogens by mediating the secretion of camalexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: E5712-E5720.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y. (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant Journal*, 50, 207-18.
- Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1461, 237-62.
- Klokouzas, A., Shahi, S., Hladky, S.B., Barrand, M.A., van Veen, H.W. (2003) ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 301-317.
- Kılıçkaya, O. (2014). Asma Bitkisinde (*Vitis vinifera*) ABA Taşıyıcılarının izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Lefèvre, F., Boutry, M. (2018). Towards identification of the substrates of ATP-binding cassette transporters. *Plant Physiology*, 178(1), 18-39. Doi: 10.1104/pp.18.00325.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M.P. (2013). Biomembrane structure. *Molecular Cell Biology*, New York, 5th Edition, 64-472.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. (1992). Biology of the grapevine, Cambridge, UK, ISBN 0521305071, 9780521305075, 239.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., Samuels, A.L. (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science*, 306,702-704.
- Potdukhe, R.M., Bedi, P., Sarangi, B.K., Pandey, R.A., Thul, S.T. (2018). Root transcripts associated with arsenic accumulation in hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Journal of Biosciences*, 43, 105-115.
- Ružicka, K., C. Strader, L., Bailly, A., Yang, H., Blakesle, J., Łangowski, Ł., Nejedlá, E., Fujitag, H., Itoh, H., Syono, K., Hejátko, J., Gray, W.M., Martinoia, E., Geisler, M., Bonnie, B. (2010). Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10749-10753. Doi: 10.1073/pnas.1005878107.
- Sadava, D., Hillis, D., Heller, H.C., Berenbaum, M. (2011). Cell membranes, Life - The Science of Biology, W. H. Freeman and Company, ISBN10: 0716799014, 8th Edition, 105-127.
- Sánchez-Fernández, R., Davies, T.G.E., Coleman, J.O.D., Rea, P.A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory.

- Journal of Biology and Chemistry*, 276, 30231–30244.
- Scienza, A., Miravalle, R., Visai, C., Fregoni, M. (1978). Relationships between seed number, gibberellin and abscisic acid levels and ripening in Cabernet Sauvignon grape berries. *Vitis*, 17, 361–8.
- Symons, G.M., Davies, C., Shavrukov, Y., Dry, I.B., Reid, J.B., Thomas, M.R. (2006). Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology*, 140, 150–158.
- Sun, L., Zhang, M., Ren, J., Qi, J., Zhang, G., Leng, P. (2010). Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. *BMC Plant Biology*, 10:257. Doi: 10.1186/1471-2229-10-257.
- Suzuki, M., Jasinski, M., Martinoia, E., Nakabayashi, R., Suzuki, M., Saito, K., Shiratake, K. (2014). Molecular cloning and characterization of ABCG/PDR-type ABC transporter in grape berry skin. *Advances in Horticultural Science*, 28(2), 53–63. <https://doi.org/10.13128/ahs-22795>.
- Teagen, D.Q., Michael C.F., Lacey Samuels, A., Douglas C.J. (2010). ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(2), 678–690. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.110.161968>.
- Xiong, J., Mao, D.A., Liu, L.Q. (2015). Research Progress on the Role of ABC transporters in the drug resistance mechanism of intractable epilepsy. *Biomedical Reserach International*, 194541. Doi: 10.1155/2015/194541.
- Zhang, M., Leng, P., Zhang, G., and Li, X. (2009). Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1241–1252. Doi: 10.1016/j.jplph.2009.01.013.